

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**İKİ FARKLI YÖNTEM KULLANILARAK PROBİYOTİK
BAKTERİ MİKROENKAPSÜLASYONU VE AYRANDA
DEPOLAMA PERİYODU BOYUNCA HÜCRE STABİLİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Elif TİPİGİL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Duygu KIŞLA

İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 17.09.2015

**Bornova- İZMİR
2015**

Elif TİPİGİL tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “İki Farklı Yöntem Kullanılarak Probiyotik Bakteri Mikroenkapsülasyonu ve Ayranda Depolama Periyodu Boyunca Hücre Stabilitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 17.09.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Duygu KIŞLA

Raportör üye : Doç. Dr. Gülten TİRYAKİ GÜNDÜZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Şeniz KARABIYIKLI

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak “İki Farklı Yöntem Kullanılarak Probiyotik Bakteri Mikroenkapsülasyonu ve Ayranda Depolama Periyodu Boyunca Hücre Stabilitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

17 /09/ 2015

Elif TİPİGİL

ÖZET

**İKİ FARKLI YÖNTEM KULLANILARAK PROBİYOTİK BAKTERİ
MİKROENKAPSÜLASYONU VE AYRANDA DEPOLAMA PERİYODU
BOYUNCA HÜCRE STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

TİPİGİL, Elif

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Duygu KIŞLA

İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

Eylül 2015, 67 sayfa

Bu tezde, iki farklı yöntem kullanılarak mikroenkapsüle edilmiş *Lactobacillus plantarum* (VISBYVAC® Serie 1000-Product Nr 40022951, Almanya) ilave edilmiş ayran örneklerinin depolama periyodu boyunca hücre stabilitesi incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle ekstrüzyon ve elektrosprey yöntemleriyle kapsüllerin üretimi gerçekleştirilmiş ve mikroenkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. İki farklı yöntemle oluşturulan kapsüllerde ışık mikroskobu ve inverted mikroskop kullanılarak çap ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ardından, iki farklı yöntemle oluşturulan bu kapsüllerin yapay mide ortamı (SGF) ve yapay bağırsak ortamına (SIF) direnci belirlenmiştir. Ayran örneklerine 60°C’de 15 dak pastörizasyon işlemi uygulandıktan sonra iki farklı yöntemle oluşturulan kapsüller ilave edilmiş ve bu ayran örnekleri +4°C’de 21 gün depolanmıştır. Depolama boyunca 7 günlük periyodlarla alınan ayran örneklerinin süzülmesiyle elde edilen kapsüllerdeki ve süzüntüdeki canlı hücre sayısı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, elektrosprey yönteminde verim %86,35 ekstrüzyon yönteminde ise %84,56 olarak hesaplanmıştır. Çap ölçüm sonuçlarına göre; ekstrüzyon yönteminde ortalama kapsül çapı ışık mikroskobunda 258,7 µm, inverted mikroskopta 275,7 µm, elektrosprey yönteminde ise ışık mikroskobunda ortalama 85 µm, inverted mikroskopta 97,6 µm olarak saptanmıştır. SGF-SIF ortamlarına direnç denemelerinde kontrol örneğinde 3,3 log birim canlılık kaybı olurken; ekstrüzyon yönteminde 0,52 log birim, elektrosprey ile

mikroenkapsülasyonda 1,11 log birim canlılık kaybı gözlenmiştir. Ayrar örneklerinde depolama periyodunun sonunda kontrol örneğinde 4,34 log birim canlılık kaybı olurken, ekstrüzyon yöntemi ile üretilen kapsüllerde 0,5 log birim ve elektrosprey yönteminde üretilen kapsüllerde ise 1,38 log birim canlılık kaybı meydana gelmiştir. Ekstrüzyon kapsüllerinden ayrara hücre salımı 14. günde başlamış olup, 21. günde log 1,61 kob/ml'ye ulaşmıştır. Elektrosprey kapsüllerinden ayrara hücre salımı ise 7. günde başlamış ve 21. günde log 2,52 kob/ml'ye ulaşmıştır.

Anahtar sözcükler: *Lactobacillus plantarum*, mikroenkapsülasyon, ekstrüzyon, elektrosprey, ayrar

ABSTRACT**MICROENCAPSULATION OF PROBIOTIC BACTERIA USING TWO
DIFFERENT METHODS AND COMPARISON OF THE EFFECTS OF
CELL STABILITY IN AYRAN DURING STORAGE PERIOD**

TİPİGİL, Elif

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Duygu KIŞLA

Co-supervisor: Asst. Prof. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

September 2015, 67 pages

In this thesis, *Lactobacillus plantarum* (VISBYVAC® Serie 1000-Product Nr 40022951, Germany) microencapsulation was performed by extrusion and electrospray methods and stability of the cells in ayran samples was evaluated. Firstly, capsules were produced by extrusion and electrospray methods and the microencapsulation yield was calculated. Diameter of the capsules was measured using light and inverted microscopes. Then, the resistance of the capsules to simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) was determined. The capsules were added to ayran samples pasteurized at 60°C for 15 min and stored at +4°C for 21 days. Every seventh day of the storage period, the viable cell count was determined in capsules which were filtered from ayran samples and filtrates.

In conclusion, microencapsulation yield by electrospray method was 86.35% and microencapsulation yield by extrusion method was 84.56 %. The average diameter size of extrusion capsules was 258.7 µm by light microscope and 275.7 µm by inverted microscope and the average diameter size of electrospray capsules was 85 µm by light microscope and 97.6 µm by inverted

microscope. After exposure to SGF-SIF, a loss of 3.3 log units in viable cell counts was determined in control group while they were 0.52 and 1.11 log units by extrusion and electrospray methods, respectively. At the end of the storage period in ayran samples, there was a 4.34-log loss in viability in control group while there were 0.5 and 1.38 log viability losses of the capsules by extrusion and electrospray methods, respectively. During 21 days of storage period, cells were released from the extrusion capsules on 14th day and reached log 1.61 cfu/ml at the end of the storage period. Cells were released from the electrospray capsules on 7th day and reached log 2.52 cfu/ml at the end of the storage period.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, microencapsulation, extrusion, electrospray, ayran

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ihtiyaç duyduğum her türlü bilgiyi sağlayan ve engin tecrübelerini benimle paylaşıp, desteklerini ve hoşgörülerini benden esirgemeyen saygıdeğer danışman hocalarım Prof.Dr. Duygu KIŞLA ve Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ'e, tez çalışmam boyunca görüşlerini ve desteklerini benden esirgemeyen Doç. Dr. Gülten TİRYAKİ GÜNDÜZ ve Doç. Dr. İlkin YÜCEL ŞENGÜN'e, bilimsel katkıları, yardımları ve arkadaşlığından dolayı Ar. Gör. Hatice Pınar YÜKSEL'e ve laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını benden esirgemeyen Tekn. Figen BECERİK ve Tekn. Tülay ÜZEL'e, bu projenin gerçekleştirilmesinde destek sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve son olarak araştırmam boyunca her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGE DİZİNİ	xxi
KISALTMALAR DİZİNİ	xx
 1. GİRİŞ.....	 1
 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	 3
2.1. İnsanda Mikrobiyal Flora.....	3
2.2. Probiyotik Mikroorganizmalar ve İnsan Sağlığına Faydaları.....	5
2.3. Probiyotik Mikroenkapsülasyonu	13
2.4. Probiyotiklerin Süt Ürünlerinde Kullanımı.....	16
 3. MATERYAL	 24
3.1. Probiyotik Bakteri Kültürü	24

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

3.2. Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Malzemeler	24
3.3. Besiyeri ve Kimyasallar	24
3.4. Ayran.....	25
4. METOT	26
4.1. <i>L. plantarum</i> Kültürünün Hazırlanması.....	26
4.2. Kaplama Materyalinin Hazırlanması	27
4.3. Ekstrüzyon ve Elektrosprey ile Mikroenkapsülasyon.....	27
4.4. Mikroenkapsülasyon Verimi	31
4.5. SGF ve SIF Ortamlarına Direnç.....	31
4.6. Kapsüllerin Ayran Örneklerine İlavesi	33
4.7. Mikrobiyolojik Analiz (Canlı Hücre Sayımı)	34
4.8. pH Ölçümü.....	34
4.9 SEM Görüntülemesi.....	35

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

4.10. Mikroskopik Yöntemlerle Çap Ölçümü.....	36
4.11. İstatistiksel Analiz.....	36
5. BULGULAR.....	37
5.1. Çalışma Kültürdeki Hücre Sayım Sonuçları	37
5.2. Kapsül Materyalinde Uygun Aljinat Konsantrasyonunu Belirlemek Amacıyla Yapılan Kapsül Çap Ölçümü Sonuçları	37
5.3. Ekstrüzyon ve Elektrosprey Yöntemleri ile Mikroenkapsülasyon Verimi Sonuçları.....	40
5.4. SGF ve SIF Ortamlarına Direnç Sonuçları.....	41
5.5. Ayranda Depolama Periyodu Boyunca Canlı Hücre Sayım Sonuçları	42
5.6. Ayranda pH Ölçüm Sonuçları.....	44
5.7. SEM Görüntülemesi	45
5.8. Mikroskopik Yöntemlerle Çap Ölçümü Sonuçları.....	46
6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	50

İÇİNDEKİLER (DEVAM)Sayfa

KAYNAKLAR DİZİNİ 56

ÖZGEÇMİŞ 67

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Ekstrüzyon yöntemi ile oluşturulan ıslak kapsül formları	28
4.2. Elektrosprey yöntemi ile oluşturulan ıslak kapsül formları	29
4.3. Ekstrüzyon yöntemi ile oluşturulan liyofilize kapsül formları.....	30
4.4. Elektrosprey yöntemi ile oluşturulan liyofilize kapsül formları.....	30
4.5. Süzülen kapsüllerin stomacher torbasında parçalanması.....	32
4.6. İki katlı cerrahi maske ve kapsüllerin ışık mikroskobu görüntüsü.....	32
4.7. Depolanan ayran örneklerinin mikrobiyolojik analizi şeması.....	34
5.1. %0,75 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsüllerin çap ölçümü sonuçları	37
5.2. %1 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsüllerin çap ölçümü sonuçları.....	38
5.3. %2 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsüllerin çap ölçümü sonuçları.....	38
5.4. %0,75 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsüllerin inverted mikroskop görüntüsü.....	39
5.5. %1 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsüllerin inverted mikroskop görüntüsü.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.6. %2 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsüllerin inverted mikroskop görüntüsü.....	40
5.7. Depolama periyodu boyunca ayıranda pH ölçümü	45
5.8. Elektrosprey kapsülünün SEM görüntüsü.....	45
5.9. Ekstrüzyon kapsülünün SEM görüntüsü.....	46
5.10. Enkapsüle edilen <i>L. plantarum</i> hücrelerinin kapsül yüzeyindeki görünümü.....	46
5.11. Elektrosprey (a) ve ekstrüzyon (b) metodu ile oluşturulan liyofilize kapsüllerin ışık mikroskobu görüntüsü.....	47
5.12. Ekstrüzyon metodu ile oluşturulan kapsüllerin ışık mikroskobu ile yapılan çap ölçümü sonuçları.....	47
5.13. Elektrosprey metodu ile oluşturulan kapsüllerin ışık mikroskobu ile yapılan çap ölçümü sonuçları.....	48
5.14. Ekstrüzyon metodu ile oluşturulan kapsüllerin inverted mikroskop ile yapılan çap ölçümü sonuçları.....	49
5.15. Elektrosprey metodu ile oluşturulan kapsüllerin inverted mikroskop ile yapılan çap ölçümü sonuçları.....	49

ÇİZELGE DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Probiyotik ürün üretiminde kullanılan probiyotik mikroorganizmalar	8
2.2. Klinik çalışmalarda etki gösterdiği bilinen bazı probiyotik türleri.....	10
2.3. Ülkelere göre tüketilen bazı probiyotik fermente süt ürünleri.....	18
5.1. Mikroenkapsülasyon öncesi ve sonrası canlı hücre sayıları.....	41
5.2. SGF-SIF ortamlarına direnç öncesi ve sonrası hücre sayıları.....	42
5.3. Ayrandaki kapsüllerden depolama periyodu boyunca geri kazanılan canlı hücre salımı sonuçları.....	43
5.4. Ayrandaki kapsüllerden depolama periyodu boyunca salınan canlı hücre salımı sonuçları.....	44

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
GRAS	Generally Regarded As Safe (Genellikle Güvenli Kabul Edilen)
SEM	Scannig Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskobu)
SGF	Simulated Gastric Fluid (Yapay Mide Ortamı)
SIF	Simulated Intestinal Fluid (Yapay Bağırsak Ortamı)
kob	Koloni Oluşturan Birim
cfu	Colony Forming Unit

1. GİRİŞ

Probiyotikler bağırsak sisteminde kolonize olduklarında insan sağlığını destekleyen ve bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkileri olan mikroorganizmalardır. Probiyotiklerin insan sağlığı üzerinde olumlu etki gösterebilmesi için bağırsak sistemindeki sayısının 10^6 - 10^9 hücre/g olması gerekmektedir (Ouwehand et al., 2002; Chavarri et al., 2010). Ancak stres, antibiyotik kullanımı, kötü beslenme alışkanlıkları, hastalıklar, cerrahi operasyonlar, vb. olumsuz durumlar bağırsaklardaki probiyotik sayısının azalmasına sebep olmaktadır (Schrezenmeier and De Vrese, 2001). Bağırsaklardaki probiyotik sayısının sağlığa faydalı limitler içerisinde kalmasını sağlamanın en kolay yolu probiyotiklerin taşıyıcı bir gıda ile alınmasıdır. Son yıllarda probiyotiklerin mikrobiyel gıda katkısı olarak çeşitli gıda ürünlerinde kullanımları oldukça yaygınlaşmıştır (Özer ve Akın, 2000).

DSÖ tarafından 2002 yılında hazırlanan rapora göre gıdalarda kullanılan probiyotik mikroorganizmalar sindirim sistemi boyunca canlı kalabilmeli, düşük pH değerine sahip mide sıvısına ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalıdır (Anon, 2005). Buna ilave olarak; hızla gelişebilme ve sindirim sisteminde kolonize olma özelliğine de sahip olmalıdır. Ayrıca, probiyotik mikroorganizmalar etkili ve güvenli olmanın yanı sıra bu özelliklerini ürünün raf ömrü boyunca sürdürebilmelidir (Anon, 2014).

Probiyotik mikroorganizmalar özellikle süt ürünleri içerisinde yüksek asitlik nedeni ile ürünün raf ömrü süresince canlılığını yitirebilmektedir. Ayrıca raf ömrü süresince canlılığını koruyabilse de tüketimi ile birlikte gastrointestinal sistemdeki midenin yüksek asitliği (pH=1,5–3), safra tuzu ve sindirim enzimleri gibi olumsuz

fiziksel koşullarıyla karşı karşıya kalmaktadır. Bu nedenle, probiyotik bakterilerin canlılıklarının koruyabilmesine yönelik çeşitli stratejiler geliştirilmesi için yapılan çalışmalar artmaktadır (Gardiner et al., 1999; Mohammadi et al., 2012). Ürün geliştirmede de probiyotik kültürlerin canlılığının sürdürülmesi ve desteklenmesi için çeşitli teknikler uygulanmaktadır. Örneğin; *Lactobacillus casei* 'yi aside karşı dayanıklı hale getirmek amacıyla karegenan ve aljinat ile mikroenkapsülasyonunun başarıyla uygulandığı bildirilmektedir (Soccol et al., 2010). Mohammadi et al. (2012), *Lactobacillus acidophilus* kültürü ile emülsiyon yöntemi ile enkapsülasyon gerçekleştirilerek mayonezde depolama periyodu boyunca (30 gün 4°C'de) hücre canlılığı değerlendirmiştir. Kalsiyum aljinat dirençli nişasta karışımı ile çift kaplama enkapsülasyonda hücrelerin enkapsüle edilmeyen hücrelere göre canlılıklarını koruduğu bildirilmiştir (Mohammadi et al., 2012).

Bu çalışmada, iki farklı yöntem kullanılarak *Lactobacillus plantarum* (VISBYVAC®Serie 1000-Product Nr 40022951, Almanya) mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ekstrüzyon ve elektrosprey yöntemleriyle kapsüller üretilmiş ve mikroenkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. Ardından oluşturulan kapsüllerin SGF-SIF ortamlarına direnci belirlenmiştir. Pastörize ayran örneklerine kapsüller ilave edilerek +4°C'de 21 gün depolama boyunca 7 günlük periyodlarla kapsüllerdeki ve süzüntüdeki canlı hücre sayısı tespit edilmiştir. İki farklı yöntemle oluşturulan kapsüllerde ışık mikroskobu ve inverted mikroskop kullanılarak çap ölçümü de yapılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. İnsanda mikrobiyal flora

İnsan vücudunun deri, ağız ve burun boşlukları, ürogenital sistem, gastrointestinal sistem gibi dış ortamlarla ilişkili bölümleri bakterilerin tutunma ve yerleşmeleri için özelleşmiş dokulara sahiptir (Whitman et al., 1998). Çoğunlukla insan vücudu için fayda sağlayan ancak bazen patojen (hastalık yapan) özelliklere sahip mikroorganizma toplulukları bu dokularda tutunup gelişirler. Bu çeşitli mikroorganizma gruplarının oluşturduğu komüniteye mikrobiyal flora denmektedir (Ramirez-Farias et al., 2009). Yaklaşık olarak 10^{14} mikroorganizmanın insan vücudunda barındığı, bunun insan vücudunun kendi hücrelerinin sayısından 10 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Bu mikroorganizmalar içerisinde küf ve virüs gibi mikroorganizmaların da bulunduğu ancak büyük kısmının bakteri hücrelerinden oluştuğu bilinmektedir. Yüz ölçümü yaklaşık olarak 200 m^2 olan gastrointestinal sistem insan vücudunda bulunan mikroorganizmaların %70-80'ini barındırmaktadır (Eckburg and Bik, 2005).

İnsanda mikrobiyal flora doğum sırasında anneden bulaşan mikroorganizmalar ve dış ortamla temas ile oluşmaya başlar (Whitman et al., 1998). Öncelikle epidermis (dış deri) üzerinde kolonize olan mikroorganizmalar ardından üst solunum yolu ve gastrointestinal sistem gibi mukozal yüzeylere yayılıp kolonize olur. Bu mikroorganizmalar kişinin yaşamı boyunca varlığını sürdürebileceği gibi, çeşitli dış etmenler sebebiyle geçici de olabilmektedir. Bu nedenle mikrobiyal flora kalıcı ve geçici mikroflora olarak ikiye ayrılmaktadır (Whitman et al., 1998). Kalıcı mikroflora; bulunduğu bölgede süreklilik gösteren mikroorganizmaların oluşturduğu floradır. Kalıcı flora üyesi mikroorganizmaların

bulundukları ortama sağladıkları faydalar mevcuttur (Whitman et al., 1998). Örneğin bağırsak sistemindeki flora üyelerinden olan probiyotik bakterilerden bazıları K vitamini sentezlemek ve bazı besinlerin absorpsiyonunu kolaylaştırmak gibi metabolik görevlere sahiptir (Ramirez-Farias et al., 2009). Ayrıca bazı mikroorganizma grupları bağırsak sistemindeki kolonizasyonu arttırarak patojen bakterilerin tutunmasını engelleme ve bakteriyosin, hidrojen peroksit, vb. antibakteriyel maddeler üreterek patojenleri elimine etme gibi sağlık üzerinde olumlu etkilere sahiptir (Eckburg and Bik, 2005). Geçici mikroflora ise; birkaç saatten birkaç haftaya kadar varlığını sürdüren, bazıları patojen olabilen mikroorganizmaların oluşturduğu floradır (Whitman et al., 1998).

Gastrointestinal sistemdeki mikrobiyal flora intestinal mikrobiyota olarak da isimlendirilmekte ve genellikle doğum sırasında vajinal ve fekal temastan orjinlendiği bilinmektedir (Whitman et al., 1998). Doğumdan sonraki ilk 48 saatte bebek kolonunda bazı *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. oluşmaktadır (Penders et al., 2006). Buna paralel olarak oluşmaya başlayan *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinslerine ait probiyotik türler ilk haftadan sonra gayta florasına hakim olmaktadır. Anne sütünü yeterli miktarda tüketen ve dengeli ek besin ile beslenen 3-4 yaşına erişen çocukta erişkin florası oluşur (Caicedo et al., 2005). Doğumdan sonra intestinal mikrobiyota oluşumuna etki eden faktörler; doğum şekli (vajinal veya cerrahi), annenin beslenmesi, bebeğin anne sütü kullanma durumu, gebelik yaşı, vb. olarak sıralanmaktadır. En önemli etken doğumun vajinal gerçekleşmiş olması ve bebeğin anne sütü ile beslenmesidir. Anne sütü prebiyotik ve probiyotik açısından zengin bileşime sahip olduğundan intestinal mikrobiyota gelişimi açısından oldukça önemlidir (Ramirez-Farias et al., 2009). Yenidoğanlarda yapılan çalışmalar, doğum şeklinin

direkt olarak bebeğin intestinal mikrobiyotası ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Vajinal doğum ile dünyaya gelen bebeklerde bebeğin intestinal mikrobiyotasını anne ürogenital sistem mikroorganizmaları oluştururken, doğum sezaryen ile gerçekleştiğinde bebeğin mikrobiyota sisteminin deri florasına benzer şekilde oluştuğu görülmüştür (Dominguez-Bello et al., 2010).

Beslenme alışkanlıkları, ilaç kullanımı, stres gibi çevresel faktörler ile mikrobiyotada kısa süreli değişiklikler gözlenebildiği gibi, yaş almayla birlikte uzun süreli veya kalıcı değişiklikler de meydana gelebilir (Dominguez-Bello et al., 2010). Özellikle bireyin beslenme alışkanlığı majör faktörlerden birisi olup; probiyotik içeren ürünlerin tüketiminin yanında prebiyotik içeren besinlerin tüketimi de oldukça önemlidir. Prebiyotikler insan bağırsak sisteminde sindirilmeyen ancak probiyotikler tarafından fermente edilen oligosakkaritlerdir (Tuohy et al., 2003). Fruktoligosakkaritler (FOS), galakto-oligosakkaritler (GOS), oligofruktoz, asidik oligosakkaritler, ksilooligosakkaritler, inülin ve dirençli nişasta başlıca prebiyotiklerdir. Özellikle inülin içeren prebiyotik tüketimi ile *Faecalibacterium prausnitzii* ve bazı *Bifidobacterium* cinslerinin mikrobiyal florada daha baskın hale gelmesine neden olduğu bilinmektedir (Ramirez-Farias et al., 2009).

2.2. Probiyotik mikroorganizmalar ve insan sağlığına faydaları

Probiyotik bakteriler, gram pozitif, sporsuz, genellikle çubuk (basil) şeklinde morfolojiye sahip bakteriler olup, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri en önemli üyelerini oluşturmaktadır. Probiyotik bakterilerin çoğu mide asidi, sindirim enzimleri ve safra tuzuna karşı direnç gösterir. Ayrıca probiyotik bakteriler laktik asit, asetik asit, bakteriyosin gibi metabolitler sentezleyerek

antibakteriyel özellik gösterirler (Ewaschuk and Dieleman, 2006). Probiyotik mikroorganizmalar, gastrointestinal sistemin mikrobiyal dengesini düzenleyerek konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan, patojen özellik göstermeyen canlı mikrobiyal gıda katkıları olarak da tanımlanabilmektedir (Lee and Salminen, 1995).

En geniş gruplardan biri olan *Bifidobacterium* üyeleri; (türlerin morfolojik ve fizyolojik özellikleri farklılık gösterse de) hareketsiz, sporsuz, katalaz-negatif, düzensiz çubuk şeklinde, gram pozitif bakterilerdir ve glikozu metabolize ederek, asetik asit ve laktik asit üretirler (Singh et al., 1997).

Bifidobacterium üyesi olan türler anaerobik olarak kabul edilmelerine rağmen, oksijene karşı toleransları açısından oldukça değişkendir. Bir kısmı zorunlu anaerob iken, bir kısmı CO₂ varlığında oksijeni tolere edebilmektedir (Ewaschuk and Dieleman 2006). *Bifidobacterium* üyesi probiyotikler yetişkin bağırsağındaki popülasyonun %20-25'ini, yeni doğan bağırsağındaki popülasyonun ise %80-90'ını oluşturmaktadır (Schell et al., 2002).

En geniş ikinci probiyotik cinsi *Lactobacillus* olup; en önemli özelliği karbonhidratlardan laktik asit üretmesidir. Hareketsiz, spor ve kapsül oluşturmayan, gram pozitif, çubuk şeklinde, mikroaerofil veya anaerob bakterilerdir (Shahani and Ayebo, 1980). *Lactobacillus* grubunun üyeleri olan türler insan ağızı, bağırsak ve vajina da doğal flora üyesi olarak bulunur. İnsanlarda diş çürümesi, endokardit (kalp zarı iltihabı) ve menenjit (beyin zarı iltihabı) enfeksiyon etmeni olan türleri mevcuttur (Shahani and Ayebo, 1980). *Lactobacillus acidophilus* vajina epitelindeki depo glikojenleri metabolize eder ve laktik asit meydana getirerek pH'ı düşürüp (4-4,2) patojen bakterilerin gelişmesini engeller (Vasquez et al., 2002). Ayrıca *L. acidophilus* bağırsakta kolesterolün

emilimini etkileyerek serumda kolesterol düzeyini düşürmektedir (Shahani and Ayebo, 1980). Direnç denemelerinde, *Bifidobacterium* spp.'nin safra tuzuna *Lactobacillus* spp.'den daha dirençli oldukları belirlenmiştir (Dunne, 2001). *Bifidobacterium longum*'un yüksek asitli şartlarda ve % 4'e kadar varan safra tuzu konsantrasyonunda canlı kalabildiği belirtilmiştir (Clark et al., 1993).

Lactobacillus plantarum gram pozitif, çubuk şeklinde, fakültatif anaerobik, homofermentatif laktik asit bakterisidir. Suş bakımından oldukça çeşitlilik göstermekle beraber çoğu asit toleransına sahip olan suşlar probiyotik özellik göstermektedir (Payne et al., 2003). İnsan bağırsak sisteminin doğal florasında bulunan suşları olduğu gibi lahana, salatalık, vb. sebzelerin doğal florasında da bulunan alt türleri mevcuttur (Payne et al., 2003). DSÖ tarafından GRAS olarak tanımlanmaktadır ve gıdalara probiyotik katkı maddesi olarak kullanımına izin verilmektedir (Anon, 2005). Bağırsak epitel yüzeyine tutunup kolonize olma özelliğine sahip olup safra tuzuna direnç geliştirebilmektedir. Laktik asit, asetik asit gibi organik asitler ve hidrojen peroksit üreterek antibakteriyel etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Fukui et al., 2010).

Lactobacillus spp ve *Bifidobacterium* spp. başta olmak üzere, bazı küf ve maya grupları da probiyotik özelliğe sahiptir (Çizelge 2.1; Billoo et al., 2006).

Çizelge 2.1. Probiyotik Ürün Üretiminde Kullanılan Probiyotik

Mikroorganizmalar.

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>L. cellobiosus</i> , <i>L. delbueckii</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. salvarius</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>
<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. lenthus</i> , <i>B. licheniformis</i>
<i>Pediococcus</i> spp.	<i>P. cerevisiae</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Bacteriodes</i> spp.	<i>B. capillus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. ruminicola</i> , <i>B. amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> spp.	<i>P. shermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i>
Küf	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Maya	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida torulopsis</i>

Bir mikroorganizmanın probiyotik olabilmesi için belirli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler; yüksek asit ve safra tuzuna direnç, bağırsak epitel dokularına tutunma ve kolonizasyon, sağlıklı birey orijinli olma, patojenik, karsinojenik, mutajenik ve toksinojenik olmama, patojenlere karşı antimikrobiyel etkinlikte olma, antimutajenik ve antikanserojenik etkinlikte olma, kolesterol yıkımı, laktaz aktivitesi, vitamin üretimi, vb. metabolik etkinliklere sahip olma şeklinde özetlenebilmektedir (Schrezenmeier and De Vrese, 2001; Soccol et al., 2010).

Normal bağırsak mikroflorasının üyelerinden olmalarından dolayı *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterobacterium* cinslerine ait türler insan tüketimi için tasarlanan probiyotik ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bu bakteriler GRAS olarak kabul edilmekte ve geleneksel fermente süt ürünlerinin üretiminde de kullanılmaktadır (Dunne, 2001). Probiyotik

mikroorganizmaların endüsteride kullanılabilir durumda olması için; faja dirençlilik, genetik stabilite gibi özelliklerinin olması istenmektedir (Duncan et al., 2008). Büyük ölçekte üretime uygun üretilebilmesi, ürün duyuşsal özelliklerinde olumsuz etki yaratmaması ve en önemlisi de üründe canlı kalabilme yeteneğinin belirtilmesi gerekmektedir. Probiyotik ürünün içerdığı canlı bakteri sayısı; depolama süresi, nem, sıcaklık gibi koşullardan etkilenmektedir. Bu nedenle probiyotik suşların canlılığı ve stabilitesi üzerine teknolojik süreçlerin etkisinin incelenmesi, son kullanım tarihini belirlemek için zorunludur (Sanders and Veld, 1999).

Bazı probiyotik mikroorganizmalar ürettikleri bazı metabolitlerle doğrudan (toksik maddeler, antibiyotikler, antifungal maddeler, bakteriyosin, vb.) veya dolaylı etkileriyle (ortamın pH'sının, ozmotik basıncının, yüzey geriliminin değişmesi, vb.) diğer mikroorganizmaların üremelerini baskılayabilir veya onları öldürebilir. Bu olay antagonizm olarak tanımlanmaktadır (Lankaputhra ve Sahah, 1995). Gastrointestinal mikrobiyotanın probiyotik bakteri tüketimiyle desteklemesinin sağlık üzerindeki olumlu etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Vücut direncini artırmak, gastrointestinal düzensizliklerle ve hastalıklarla mücadele etmek için probiyotik tüketiminin gerekli olduğu klinik deneylerle ispatlanmıştır (Çizelge 2.2; Laurens-Hattingh and Viljoen, 2001).

Çizelge 2.2. Klinik Çalışmalarda Etki Gösterdiği Bilinen Bazı Probiyotik Türleri.

Suş	Klinik Çalışmalarla Belirlenen Etkiler
<i>Lactobacillus johnsonii</i> LA1	İnsan intestinal hücrelerine tutunma, intestinal floranın düzenlenmesi, immün modülasyon, <i>H. pylori</i> tedavisinde yardımcı ajan
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFB 1748	Fekal enzim aktivitesinin azaltılması, radyoterapi nedenli diyarenin önlenmesi, kabızlığın iyileştirilmesi
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53013)	Rotavirus diyare riskinin azaltılması ve tedavisi, antibiyotik nedenli diyarelere karşı koruma, bebeklerdeki atopik ekzamanın azaltılması, atopik hastalıkların önlenmesi, sistik fibrozis semptomlarının azaltılması, bifidobakteri florasının desteklenmesi, <i>Streptococcus mutans</i> aktivitesinin azaltılması
<i>Str. thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Laktoz intoleransı semptomlarında suşa bağlı iyileştirme
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	İntestinal floranın düzenlenmesi, seyahat diyarelerine karşı koruma, immün modülasyon
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Rotavirüs diyarelerini de içeren viral diyarelerin tedavisi
<i>Lactobacillus gasseri</i> (ADH)	Fekal enzim aktivitesinin azaltılması
<i>Lactobacillus reuteri</i>	İntestinal sisteme kolonizasyon, rotavirüs diyarelerinin tedavisi, intestinal floranın düzenlenmesi
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	İmmün modülasyon, intestinal floranın düzenlenmesi
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> DR 10	İmmün modülasyon, intestinal floranın düzenlenmesi, mukozaya tutunma
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	İmmün modülasyon, intestinal floranın düzenlenmesi
Probiyotik kombinasyon (VSL 3)	İnflamatöz bağırsak hastalıklarında ve rahatsız bağırsak sendromunda pozitif etki, poşitisin önlenmesi, radyoterapi nedenli diyaların önlenmesi ve tedavisi
<i>Escherichia coli</i> NISSLE	İnflamatöz bağırsak hastalıklarında pozitif etki
Probiyotik karışım VSL 3 (<i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Str. thermophilus</i> , <i>Bf. longum</i> , <i>Bf. infantis</i> ve <i>Bf. breve</i>)	Yetişkinlerdeki rahatsız bağırsak sendromu hastalıklarında pozitif etki

L. acidophilus ve *L. casei*, fermentasyon sonucunda laktik asit üretirler.

Probiyotik organizmalar aynı zamanda sitrik asit ve hippürik asit gibi diğer bir takım asitleri de oluştururlar (Dunne, 2001). Laktik asit bakterileri, organik asit üretmelerinin yanında hidrojen peroksit (H_2O_2), diasetil ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler de üretir. Bu antimikrobiyal maddeler, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaları ve gıdalarda bozulmaya sebep olan organizmaları inhibe etmektedir (Ouwehand et al., 2002). Bazı *Bifidobacterium* türleri B1 (tiyamin), B9 (folik asit) ve B12 vitaminleri, niyasin, biyotin, piridoksin, pantotenik asit gibi metabolitler sentezler (Berrad et al., 1991). Yapılan çalışmalarda; probiyotik özellikteki *Bifidobacterium* türlerinin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella dysenteriae* gibi patojen mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etkinlik gösterdiği belirtilmiştir (Ouwehand et al., 2002). Probiyotik bakterilerin gastrointestinal sistemdeki en önemli fonsiyonlarından biri

de konağın doğal florasının patojenler için bir bariyer oluşturmaya yardımcı olmaktır. Bu nedenle probiyotik mikroorganizmaların seçiminde, patojenleri ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etme potansiyeli önemli bir kriterdir (Ouwehand et al., 2002). Bağırsak epitel yüzeyindeki hücrelere tutunma probiyotiklerin kolonizasyonu için gereklidir, ancak bütün probiyotik bakterilerin bağırsak hücre duvarına tutunma özellikleri yoktur (Bernet et al., 1993). Probiyotiklerin gastrointestinal sistemde kolonizasyonu; patojen mikroorganizmaların tutunmasını engellemede, hasarlı mukozanın iyileştirilmesinde kritik önem taşımaktadır (Ross et al., 1996).

Probiyotik bakterilerin gıda kaynaklı patojen bakterileri ve gıdalarda bozulmaya sebep olan bakterileri inhibe etmelerinin yanı sıra bilinen diğer faydaları; gastrointestinal sistem rahatsızlıklarını tedavi ve önleme (laktoz intoleransı, ishal, gastrit, kanda kolesterol artışı, kolon kanseri, vb.) ve bağışıklık sistemini güçlendirme olarak sayılabilir.

Laktoz intoleransı, Afrika ve Asya kıtalarında daha yaygın olup ilerleyen yaş, sindirim sistemi hastalıkları ya da antibiyotik kullanımı gibi bazı tedavilerin neden olduğu bağırsak mukozasının bozulması sonucu, laktozun metabolize edilmesinden sorumlu olan laktaz enzimin azalmasından kaynaklanmaktadır (Zubillaga et al., 2001). Probiyotik bakterilerin klinik preperasyonlarının, laktoz intoleransına sahip hastalara uzun süre verilmesiyle hastalık semptomlarının azaldığı gözlemlenmiştir (Heyman and Menard, 2002).

Payne et al. (2003), *Lactobacillus plantarum* içeren ürünlerin tüketiminin çocuklarda gözlenen kronik ishal ve ağız ülseri (aft) üzerine etkisini

incelemişlerdir. *L. plantarum*'un ilk iki hafta içerisinde doğal bağışık yanıtı artırıcı etkisinin olduğu saptanmıştır (Payne et al., 2003). *C. difficile* kaynaklı ishal tedavisinde çoğunlukla *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* bakteri türlerinin ve *S. boulardii* maya türünün etkili olduğu bildirilmiştir (Gibson, 1998).

Gastrit etmeni olan *Helicobacter pylori*'nin salgıladığı üreaz enzimi ile çevresinde alkali bir ortam yaratarak mide asitinden korunduğu ve böylece kendine gelişme ortamı yarattığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bazı *Lactobacillus* türlerinin *H.pylori*'nin üretmiş olduğu üreaz enziminin aktivitesini azaltan bazı metabolitler ürettiğini ve böylece *H. pylori* 'ye karşı antogonistik etki oluşturulabildiği gösterilmiştir (Billo et al, 2006).

Bazı probiyotik bakterilerinin kolesterolü düşürme etkileri mevcuttur (Gilliand, 1989). Vücutta kolesterol yıkımı sonucunda sarfa asitleri oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda *L. acidophilus*'un oluşan bu safra asitlerini yıkımlama yeteneğine sahip olduğu ve böylece kanda kolesterol miktarının azalmasına neden olduğu bildirilmektedir (Shahani and Ayebo, 1980). *L. acidophilus* ilave edilmiş yoğurdu domuz beslenmesine dahil eden çalıştırıcılar, kanda kolesterol seviyesinin önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuşlardır (Danielson et al., 1989).

Çalışmalar, probiyotik içeren ürünlerinin tüketimine bağlı olarak kolon kanseri insidansının azaldığını göstermektedir (Reddy, 1999). Probiyotikler, kanserojen özellikleri bilinen fenol, nitrozamin gibi bileşiklerin bazılarını inaktive ederek kolon kanseri riskini azaltmaktadır (Danielson et al., 1989). Aynı zamanda probiyotiklerin, kanserojen öncüsü molekülleri kanserojene çeviren nitroredüktazlar ve betaglukoronidazlar gibi enzimlerin aktivitelerini azaltarak antikanserojen etki gösterdikleri belirtilmektedir (Reddy, 1999).

Probiyotik bakteriler, doğal bağışık yanıt ve kazanılmış bağışık yanıt üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Probiyotikler doğal bağışık yanıtta sorumlu makrofaj hücrelerinin aktivasyonunu artırır (Henriksson and Conway, 2001). *Listeria monocytogenes* ile enfekte edilen ve enfeksiyonun 30 gün öncesinden başlanarak *L. casei* ilaveli peynirle beslenen farelerin karaciğerindeki lenfosit sayılarında ve sıvısal bağışıklık etkenlerinden biri olan lenfokin miktarında artış saptanmıştır (Roberfroid, 2000).

2.3. Probiyotik mikroenkapsülasyonu

Probiyotik mikroorganizma içeren gıda üretiminin kısıtlarından en önemlisi, kullanılan mikroorganizmaların canlılığını koruyamamasıdır. Bu kısıtın engellenmesi için son yıllarda mikroenkapsülasyon tekniğinin yeni yöntemlerden biri olduğu bildirilmiştir (Kailasapathy, 2002; Champagne et al., 2015). Mikroenkapsülasyon tekniği ile ilgili yapılan daha önceki çalışmalarda, mikroenkapsüle probiyotiklerin olumsuz koşullardaki canlı kalma sürelerinin arttığı gözlemlenmiştir (Kailasapathy, 2002; Champagne et al., 2015).

Mikroenkapsülasyon tekniği, kapsül veya kaplama maddesi olarak da adlandırılan genellikle yarı geçirgen protein veya karbonhidrat esaslı kaplama materyali içerisine; katı, sıvı ve gaz formundaki maddelerin tutulması işlemidir (Ünal ve Erginkaya, 2010; Champagne et al., 2015). Mikroenkapsülasyondaki temel amaç; gıda bileşenlerini, kötü çevre koşullarından korumak, stabilite sağlamak ve kontrollü olarak kullanımını gerçekleştirmektir. Bu maddeler enkapsüle edildiklerinde bulundukları çevrenin fizikokimyasal, kimyasal ve mekanik etkilerinden korunabilirler (Chavarri et al., 2007). Bazı ilaçlar,

probiyotik mikroorganizmalar, enzim ve katalizörler gibi bileşenlerin kararlı yapılarını korumaları için mikroenkapsülasyon tekniği kullanılmaktadır. Mikroenkapsülasyon teknolojisinde kullanılan kapsül materyalinin genel olarak stabilitesinin yüksek, geçirgenlik boyutlarının istenen düzeyde ve ilave edileceği gıda maddesi ile uyumlu olması istenir. Bu özelliklerin oluşturulabilmesi için çok farklı kaplama materyalleri kullanılmaktadır. Bunlar; karbonhidratlar, gamlar, proteinler ve protein esaslı bileşenler, yağlar ve sentetik polimerlerdir (Dubey et al., 2009). Mikroenkapsülasyon bu bileşenlerin (bazı ilaçlar, probiyotik mikroorganizmalar, enzim ve katalizörler, vb.) açığa çıkmasını sınırlar veya daha hızlı açığa çıkmalarını sağlayabilir. Biyoaktif maddelerin enkapsülasyonu ile bu maddelerin ürün içerisindeki direnci ve biyoyararlılıkları artar (Aloğlu ve Öner, 2010).

Farklı amaç ve kullanım alanları için pek çok mikroenkapsülasyon yöntemi bulunmaktadır. Uygun yöntem, kapsül oluşumunda kullanılacak materyal ve membranın özellikleri göz önüne alınarak seçilmelidir. Mikroenkapsülasyon işleminde kapsüllerin oluşturulması için kullanılan tekniklerden bazıları:

- Püskürterek kurutma,
- Püskürterek soğutma ve dondurma,
- Ekstrüzyon kaplama,
- Lipozom ile kaplama,
- Koazervasyon,

- Emülsiyon polimerizasyonu,
- Çapraz bağlama süspansiyonu,

olarak sıralanabilir (Burgain et al., 2011).

Enkapsüle edilen bileşenler genellikle sıvı formunda oldukları için çoğu yöntem kurutma esasına dayanır. Bu nedenle de probiyotik mikroenkapsülasyonu amacıyla genellikle püskürterek kurutma, emülsiyon ve ekstrüzyon yöntemleri kullanılmaktadır (Chen and Chen, 2007).

Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda, daha çok emülsiyon ve ekstrüzyon tekniklerinin kullanıldığı bildirilmiştir (Donkor et al., 2007). Ekstrüzyon yönteminde, probiyotik kültürü ile karıştırılan ajnat çözeltisi, şırınga yardımıyla katılaştırıcı çözelti (genellikle CaCl_2) içine damlacıklar halinde verilir. Emülsiyon tekniğinin ekstrüzyon tekniğinden farkı ise damlacık oluşumunun bitkisel yağ içerisinde karıştırma ile sağlanmasıdır (Donkor et al., 2007). Jel oluşumu sırasında sodyum iyonları kalsiyum iyonları ile yer değiştirir ve suda çözünmeyen katı formda kalsiyum aljinat kürecikleri oluşur. Yapılan çalışmalarda, emülsiyon ve ekstrüzyon teknikleri ile elde edilen kapsüllerin hücre stabilitesi ve üründe meydana getirdikleri duyuşal özellikler bakımından önemli bir fark olmadığı saptanmıştır (Özer et al., 2009; Papagianni and Anastasiadou, 2009). Ancak gıda ürününde duyuşal açıdan olumsuzluk yaratmayan kapsül boyutunun 100µm ve daha küçük çapa sahip olması gerektiği bildirilmiştir (Kailasapathy, 2002; Chen and Chen, 2007; Fukui et al., 2010). En yaygın mikroenkapsülasyon metodlarından olan püskürtmeli kurutma metodu geleneksel metodlar içerisinde partikül çapı bakımından istenilen büyüklüğü sağlasa da,

yüksek sıcaklıklar kullanıldığı için ısıl direnci düşük olan probiyotik bakterilerin mikrokapsülasyonunda verimi etkileyen bir faktördür (Lopez-Rubio et al., 2012). 100 µm ve daha küçük çapa sahip partikülü oda sıcaklığındaki sistemle oluşturma olanağı sunduğu için son yıllarda enkapsülasyon tekniklerine elektrosprey yöntemi de dahil edilmiştir (Lopez-Rubio et al., 2012).

Elektrosprey, yüksek (10-100 kV) elektrik gerilimi ile oluşturulmuş elektrik alana, hassas debi (0,1-100 ml/saat) oluşturabilecek bir mikropompa ile püskürtülen polimer çözeltisinin beslenmesi ile gerçekleştirilmektedir (Xie and Wang, 2007; Rokka and Rantamaki., 2010). Uygulanan voltaj, debi, kaplama materyali olan polimer çözeltisinin konsantrasyonu, toplama kabının şırıngaya olan uzaklığı, vb. birçok etmen partikül boyutuna etki etmektedir (Rokka and Rantamaki., 2010, Lopez-Rubio et al., 2012). Elektrosprey sistemi oldukça hassas olup, dış ortamın fiziksel koşullarından (sıcaklık, hava akımı, ışık, nem, vb.) etkilenmektedir. Fukui et al. (2010), tasarladıkları sistemde, %1,5 sodyum aljinat çözeltisini 22,5 kV gerilim uygulanarak oluşturulmuş elektrik alana 0,2 mL/saat debiyle besleyerek 5cm uzaklıktaki 0,1M CaCl₂ içeren toplama kabında toplamışlardır. Oluşturulan kapsüllerin çap dağılımı aralığı 130-310 µm olarak hesaplanmıştır.

2.4. Probiyotiklerin süt ürünlerinde kullanımı

Anne sütü, kefir, kımız, yakult, shubat, katyk ve irkit içersinde probiyotik kültür barındırdığı bilinen gıdalardır (Gilliand, 1989; Yaygın, 1995; Özden, 2005). Sebze turşuları, şalgam suyu, yoğurt, peynir gibi fermente ürünler probiyotik olarak nitelendirilmez ancak, içeriğindeki laktik kültürün probiyotik

özelikte olup olmaması ürünün probiyotik niteliğini oluşturur. Probiyotik bakterilerin kaynakları; memeli gastrointestinal ve ürogenital sistemi, bazı sebzeler ve tahıllar, memeli sütleri gibi oldukça çeşitlidir (Berrad et al., 1991). En önemli fermente süt ürünlerinden olan kımız ve kefirin kökeni Orta Asya ve Kafkaslarda yaşayan eski Türk toplumlarına dayanmaktadır. Kefir, kefir danesi (karnabahar görünümünde nohut büyüklüğünde beyaz taneler şeklinde, probiyotik bakterileri de içeren starter kültür) ile koyun, inek veya keçi sütünün 5-23°C de fermente edilmesiyle elde edilen ekşimsi tada sahip süt ürünüdür (Özer ve Akın, 2000). Kımız ise kısrak sütünün fermentasyonu ile oluşan ayran benzeri bir içecektir. Fermentasyon sonucu asit, alkol ve CO₂ oluşmaktadır (Özden, 2005; Soccol et al., 2010). Yakult, 1930 yılında Japon bir hekim tarafından bulunan fermente süt ürünü olup, yağsız sütün *L. casei* ile fermentasyonu ile oluşmaktadır (Gibson, 1998). Shubat deve sütünün fermentasyonu ile üretilen ekşi süt tadında fermente probiyotik üründür (Özer ve Akın, 2000). Kımızdan daha yağlı ancak daha az karbonhidrat içeriği olan bir üründür. Katyk keçi, koyun veya inek sütünün fermentasyonu ile oluşan bir üründür İrkit ise, inek veya koyun sütüne ilave edilen probiyotik kültürünün fermentasyonu ile üretilir (Üstün ve Gökçe, 2005). Klasik yoğurt florasını oluşturan türler *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*'tur ve probiyotik özellikleri olmadığı bilinmektedir. Ancak dünya genelinde özellikle *L.acidophilus* gibi insan orjinli probiyotiklerin ilavesiyle üretilen probiyotik yoğurt ürünlerine rastlamak mümkündür (Çizelge 2.3; Berrad et al., 1991).

Çizelge 2.3. Ülkelere Göre Tüketilen Bazı Probiyotik Fermente Süt Ürünleri.

Ürün	Ülke	Probiyotik kültürü
Asidofiluslu süt	Rusya Amerika Batı Avrupa Çek Cumhuriyeti İskandinav Ülkeleri Japonya	<i>L. acidophilus</i>
Asidofiluslu yoğurt	Amerika Almanya İskandinav Ülkeleri Avustralya	<i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>
Asidofilin	Rusya	<i>S. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>
Bifiduslu süt	Almanya Japonya	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>
Bifiduslu yoğurt	Almanya Amerika Japonya Fransa	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>
Biyogarde	Almanya İngiltere Danimarka	<i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. longum</i>
Biomild	Almanya	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Bifidobacterium</i> spp.
Cultura	Danimarka	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Diphilus süt	Fransa	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Gerilac	Finlandiya	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>
Mil-Mil	Japonya	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>
Miru-Miru	Japonya	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. breve</i>
Ofilus	Fransa	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophilus</i>

Gomes et al. (1998), keçi sütüne *L. acidophilus* ($1,0 \times 10^7$ kob/g) ilave edilmesiyle üretilen peynirin, kimyasal ve tekstürel özellikleri üzerine olgunlaşma sıcaklığı (5°C - 10°C), bağıl nem (% 85 - % 95) ve olgunlaşma süresinin (1 gün - 70 gün) etkilerini incelemişlerdir. Geleneksel flora ile kıyaslandığında probiyotik ilaveli peynirde yüksek olgunlaşma sıcaklığı ve düşük bağıl nemin peynir sertliğini arttırdığı gözlenmiştir. Guerin-Dannan et al., (1998), geleneksel yoğurtlara kıyasla *L. casei* içeren yoğurtların tüketilmesi ile beta-glukosidaz enziminin etkisinin arttığı ve bebek beslenmesinde önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Vinderola et al. (2000), probiyotik peynir üretimi ile ilgili yaptığı çalışmada, probiyotiklerin peynir fermentasyonunda etkisini araştırmışlardır. Fermentasyonda kullanılan starter laktik kültürün yanı sıra peynir

fermantasyonunda *L. casei* ve *L. acidophilus* suşlarının da etkili olduğu anlaşılmıştır. Madkor et al. (2000), Cheddar peyniri üretiminde starter kültür olarak kullandığı *L. helveticus* ve *L. casei*'nin 6 aylık depolama periyodunda sayılarının 10^6 kob/g değerinin altına düşmediğini tespit etmişlerdir.

Corbo et al. (2001), tarafından *Bifidobacterium bifidum* Bb02, *B. longum* Bb46 probiyotiklerinin karışımı (iki suş için 10^7 kob/g hücre) ilave edilerek geleneksel bir İtalyan peyniri üretilmiştir. Peynirlerdeki canlı hücre sayılarının 19. günde 10^7 kob/g olduğu, 56. günde ise *B. bifidum* Bb02 ve *B. longum* Bb46 sayılarının sırasıyla 10^6 ve 10^5 kob/g değerlerine düştüğü belirtilmiştir. Ayrıca, peynire bifidobakterilerin ilavesi olgunlaşma süresince starter olarak kullanılan mezofilik lakobasillerin ve *S. thermophilus*'un canlılığını desteklediği bildirilmiştir.

Guarner and Schaafsma (2005), yaptıkları çalışmada *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, *L. paracasei* NFBC 364, *L. salivarius* NFBC 310, *L. salivarius* NFBC 321, *L. salivarius* NFBC 348 probiyotik hücre kültürlerini kullanarak probiyotik etkili Cheddar peyniri geliştirmeye çalışmıştır. Çalışma sonucunda özellikle *L. paracasei*'nin karışık suşlarının Cheddar peynirinde destek starter olarak kullanımının uygun olacağını belirtmişlerdir. 8 ay olgunlaşma sonunda peynirdeki sayıları *L. paracasei* NFBC 338 $1,4 \times 10^7$ kob/g ve *L. paracasei* NFBC 348 $9,2 \times 10^7$ kob/g olarak bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada, probiyotik bakteri içeren fermente süte turunçgil liflerinin ilave edilmesiyle *L. acidophilus* CECT 903, *L. casei* CECT 475 ve *B. bifidum* CECT 870 bakteri türlerinin kontrol gruplarına göre canlılığını daha iyi

korunduğu ortaya konmuştur. Prebiyotik içeriği kesin olarak ortaya ıkarılmasa da çalışmada kullanılan limon ve portakal liflerinin probiyotik stabilitesi üzerine etkilerinden dolayı fermente süt ürünlerini zenginleştirmede kullanılabileceği belirtilmiştir (Sendra et al., 2008).

Leandro et al. (2013), yaptıkları çalışmada düşük, orta ve yüksek miktarda yağ içeriğine sahip dondurma formülasyonlarına dahil ettikleri probiyotik *L. delbueckii* UFV H2b20 kültürünün -16°C’de 40 günlük depolama periyodu boyunca canlılık stabilitesini araştırmıştır. Depolama periyodu sonunda dondurma örneklerindeki hücrelerin asit ve safra direncini belirlemişlerdir. Asit ve safra tuzuna direnç gösterdiği belirlenen kültürün ayrıca düşük depolama sıcaklığına da direnç gösterdiği bildirilmiştir.

Ranadheera et al. (2013), çalışmalarında *L. acidophilus* LA-5, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ve *Propionibacterium jensenii* 702 ilave edilmiş keçi sütünden dondurma üretimi yaparak; üç farklı ambalaj materyali ile (polipropilen, polietilen ve cam) 52 hafta -20°C’de depolamıştır. Depolama süresince hücre stabilitesini ve farklı paketleme materyalinin ürünün fizikokimyasal ve duysal özelliklerine olan etkisini incelemişlerdir. Depolamanın 12. haftasında farklı paketleme materyali kullanımının duysal özelliklerde farklı sonuçlar oluşturulduğu bildirilmiştir. Ancak depolama periyodu boyunca probiyotik hücre canlılığında düşüş kaydedilmemiştir.

Yerlikaya and zer (2014), probiyotik *S. thermophilus* suşu ilave edilerek üretilmiş taze beyaz peynirde 28 gün boyunca hücre stabilitesini incelemiş ve

depolama periyodunun sonunda hücre canlılığında 2,3 log birimi düşüş meydana geldiğini gözlemlemiştir.

Oliveira et al (2014), keçi peynirine ilave ettikleri probiyotik *L. acidophilus* suşlarının *S. aureus* ve *L. monocytogenes* patojenlerine karşı antibakteriyel etkinliğini incelemiştirler. Depolamanın *S. aureus* canlılığı üzerinde 14. günde % 7,87 oranında, 21. günde % 23,63 oranında; *L. monocytogenes* canlılığı üzerine ise, sırasıyla % 12,96 ve % 32,99 oranında inhibisyon sağlandığı belirtilmiştir.

Silva et al. (2015), *B. animalis* ilave edilmiş süttten üretilerek depolanan dondurma örneklerinde -18°C'de 120 günlük depolama periyodu boyunca canlılık oranının % 84,7 oranında korunduğunu belirtmişlerdir.

Caicedo et al. (2005), tarafından yapılan bir çalışmada *B. bifidum* aljinat, pektin ve peyniraltı suyu jeli kullanarak emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile kaplanmıştır. Laboratuvar koşullarında yapılan deneme sonuçlarına göre kaplama işlemi uygulanmayan hücreler canlılıklarını kaybederken kaplama işlemi uygulananlar pH 2,5'te 2 saate kadar canlılıklarını koruyabilmişlerdir. Mandal et al. (2006), yaptıkları çalışmada, farklı aljinat yüzdeleri (%2, %3 ve %4) kullanarak ekstrüzyon ile mikroenkapsüle edilmiş *L. casei* NCDC-298 türünün yapay mide ortamında canlılık stabilitesi üzerine etkisini incelemişler ve artan aljinat konsantrasyonuna bağlı olarak bakterinin gastrointestinal koşullara dayanımının arttığını saptamışlardır. Muthukumarasamy and Holley (2007), aljinat kullanılarak ekstrüzyon ile *L. reuteri*'yi mikroenkapsüle etmişlerdir. Çalışmada, kurutma işlemi ile birlikte kapsüle edilmemiş *L. reuteri* kontrol örneğinde 2,6 log birimi azalış meydana gelirken, mikroenkapsüle edilen

L. reuteri sayısında 0,5 log birimi azalış meydana gelmiştir. Allan-Wojtas et al. (2008), yaptıkları çalışmada artan aljinat konsantrasyonunun hücre canlılığını korumada etkili olduğunu ancak kapsül boyutunu da arttırdığı sonucuna ulaşmışlardır.

Kaşar peynirinin olgunlaşması süresince *L. acidophilus* ve *B. bifidum*'un mikroenkapsülasyonun hücre canlılığına etkisinin incelenmesi üzerine yapılan çalışmada; ekstrüzyon - emülsiyon tekniği ile mikroenkapsüle edilen *L.acidophilus* ve *B. bifidum* kaşar peynirine ilave edilmiş ve 90 gün boyunca kaşar peynirinin mikrobiyolojik, biyokimyasal ve duyusal özellikleri incelenmiştir (Özer et al., 2009). Sonuçta, kontrol örneğinde *L.acidophilus* sayısında 2.1 log birimi, *B. bifidum* sayısında 3,1 log birimi azalış meydana gelirken, mikroenkapsüle edilen *L. acidophilus* ve *B. bifidum* sayısında sırasıyla 0,5 ve 1,2 log birimi azalış meydana gelmiştir.

Sandoval-Castilla et al. (2010), ise ekstrüzyon yönteminde kullanılan aljinata ilave edilen farklı polimerlerin kompozitleri ile gerçekleştirdikleri enkapsülasyonun *L. casei* canlılığı üzerine etkinliğini incelemişlerdir. Toplam polimer konsantrasyonu arttıkça enkapsülasyon etkinliğin arttığını belirlemişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, *Bifidobacterium animalis* kullanılarak yapılan elektrosprey ile enkapsülasyonda, kapsül materyali olarak peyniraltı suyu proteini ve pullulan kullanılmıştır. Çalışmada yağsız süttozu kullanılarak liyofilize edilen kültür ile enkapsüle edilen kültürlerin 4°C ve 20°C sıcaklıklarda 50 günlük depolama periyodunun ardından hücre stabilitesi karşılaştırılmıştır. Depolama

sonunda liyofilize kültürde hücre sayısında 5,2 log birimi düşüş gözlenirken, enkapsüle formlarda 2,7 log birimi düşüş gözlenmiştir (Lopez-Rubio et al., 2012). Çalışmada oluşturulan enkapsül formlarının çapı 10µm civarlarında olup, kullanılan kaplama materyali konsantrasyonu %40 ve %50 olarak seçilmiştir. Kaplama maddesinin konsantrasyonu arttırıldıkça kapsül çapı küçülmektedir. Ancak konsantrasyonu yüksek olan çözeltinin şırıngadan besleme hızının düşük olduğu bilinmektedir (Lopez-Rubio et al., 2012).

Champagne et al. (2015), probiyotik dondurma üretimi yapmak üzere püskürtmeli kurutucu ile *L. rhamnosus* R0011 mikroenkapsülasyonu gerçekleştirmiş ve depolama periyodu boyunca -16°C’de kapsül örneklerinde 0,43 log birimi azalma olurken, kapsüle edilmemiş kontrol örneklerinde ise 3 log birimi azalma olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL

3.1. Probiyotik bakteri kültürü

Çalışmada; probiyotik kültür olarak *Lactobacillus plantarum* (VISBYVAC® Serie 1000-Product Nr 40022951, Almanya) kullanılmıştır.

3.2. Mikroenkapsülasyonda kullanılan malzemeler

Çalışmada, enkapsülasyon oluşturmak amacıyla kaplama materyali olarak sodyum aljinat (Sigma-Aldrich, 100184928, İngiltere) kullanılmıştır. %1,5 konsantrasyonlarda hazırlanan sodyum aljinat çözeltisi 121°C’de 15 dak steril edilerek kullanılmıştır (Krasaekoopt et al., 2004). Enkapsülasyonda katılaştırıcı çözelti olarak 121°C’de 15 dak steril edilmiş 0,1 M CaCl₂ (Merck, Almanya) çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmada prebiyotik olarak %2’lik inülin (Santa Cruz, 221760, ABD) kullanılmıştır.

3.3. Besiyerleri ve kimyasallar

Çalışma kültürünü geliştirme amacıyla Man, Rogosa Sharpe-MRS (Merck 110661, Almanya, pH: 5,7 ± 0,2) sıvı besiyeri kullanılmıştır. Canlı hücre sayımı amacıyla, MRS sıvı besiyerine %1,5’luk agar (Merck 115029, Almanya) ilave edilmiş MRS katı besiyeri kullanılmıştır. Hücre kültürünün ve kapsüllerin yıkanması amacıyla ise % 0,1’lik peptonlu su (Merck 91079388, Almanya, pH: 6.3 ± 0,2) kullanılmıştır. Enkapsülasyonun etkinliğinin belirlenmesi için gerçekleştirilen geri kazanım işlenminde enkapsül formlarını parçalamak amacıyla 0,1M fosfat tamponu (Merck 7447407, Almanya, pH=7,0±0,2) kullanılmıştır.

Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin sterilizasyonu 121°C’de 15 dak gerçekleştirilmiştir.

SGF ortamı için; 450 ml ultrasaf suya 1 g NaCl (Merck 106404, Almanya) ilave edilmiştir. Ardından bu çözeltiliye 1,6 g pepsin (Sigma-Aldrich P7000-25G, ABD) ilave edilerek çözölmüştür. HCl ile pH= 2,0±0,2 ayarlanarak toplam hacim 500 ml ye tamamlanmıştır. SIF ortamı için; 125 ml utrasaf su içerisinde 3,4 g KH₂PO₄ (Merck 7447-407, Almanya) çözölmüştür. 38,5 ml 0,2N NaOH (Merck, Almanya) 250ml ultrasaf su ile karıştırılarak bu iki çözöltinin iyice karışmaları sağlanarak birleştirilmiştir. Bu çözöltiye 0,625 g pankreatin (Sigma-Aldrich P1750-25G, ABD) ve 1,5 g safra tuzu (Difco Ovgall 212820, İngiltere) ilave edilerek pH= 6,8±0,2 olacak şekilde 0,2 N NaOH ve 0,2 N HCl ile ayarlanıp son hacim 500 ml tamamlanmıştır (Amine et al., 2014). Bu şekilde hazırlanan SGF ve SIF stok çözöltileri enzim içeriği nedeniyle ısı sterilizasyon uygulanamayacağından, kullanım sırasında tek kullanımlık steril filtreden (Sartorius Stedim 50459103- 0,2µm) geçirilerek kullanılmıştır.

3.4. Ayran

Çalışmada pastörize, homojenize, tam yağlı Yörsan (Gıda Mamöller San. Tic. A.Ş., Balıkesir) ayran kullanılmıştır.

4. METOT

4.1. *L. plantarum* kültürünün hazırlanması

Mikroenkapsülasyon için kullanılacak olan çalışma kültürü 115°C’de 10 dak steril edilmiş % 10’luk yağsız süttozu (Pınar Süt Mamülleri San. A.Ş., İzmir) besiyerinde bulunan kültürden MRS sıvı besiyerine % 4 inokülasyon oranıyla, 30°C’de 24 saat inkübe edilerek elde edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından gelişen kültür santrifüj işlemi için falkon tüpüne aktarılmış, Hettich 320R model santrifüj cihazında 5000×g devirde 15 dak yapılan ilk santrifüjün ardından iki kez peptonlu su ile 5000×g devirde 15 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. (Iyer and Kailasapathy, 2005). Yıkamanın ardından başlangıç hacmine peptonlu su ile tamamlanarak steril cam tüpe aktarılan kültürde Grant–DEN1 İngiltere cihazı ile McFarland okuması yapılmıştır.

Stok kültür hazırlama aşamasında 300µl %50’lik gliserol (121°C 15 dak steril edilmiş) ile 700µl MRS sıvı besiyerinde geliştirilen probiyotik kültürü steril 2ml ependorf tüplerine aktararak -20°C’de depolanmıştır (Anon, 2013).

4.2. Kaplama Materyalinin Hazırlanması

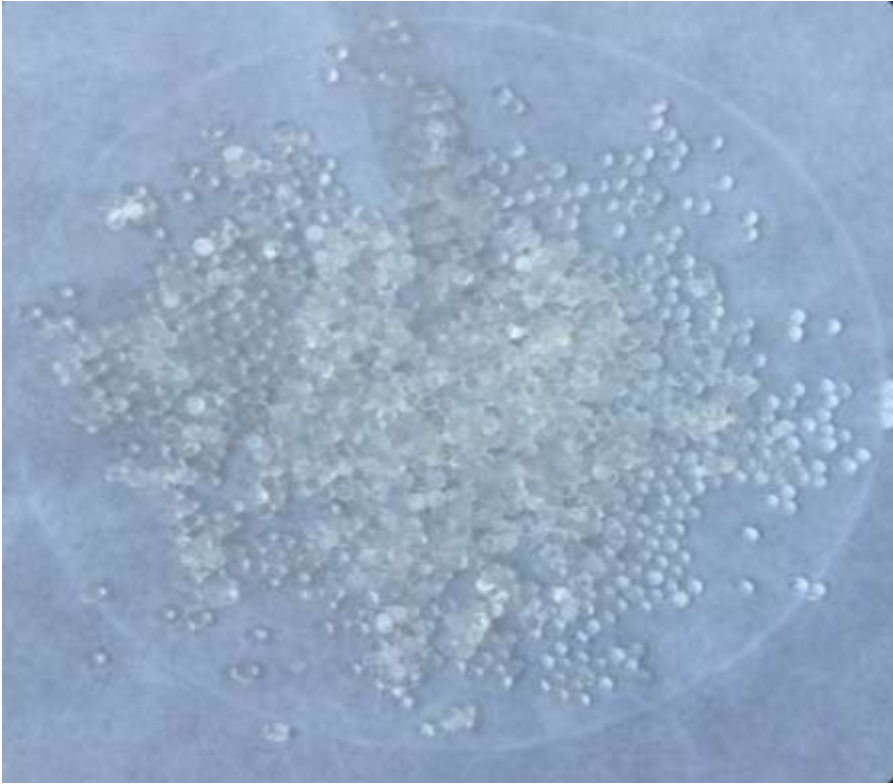
Probiyotik mikroenkapsülasyonu amacıyla öncelikle kullanılan kaplama materyalinin (aljinat) konsantrasyonunu belirlemek için ultra saf su ile hazırlanan % 0,75, % 1 ve % 2 aljinat çözeltilerine hücre kültürü ilave edilmeden elektrosprey metodu ile ön denemeler yapılmıştır. Olympus CK40 - F200 (2G06320, Japonya) inverted mikroskop ile alınan elektrosprey kapsüllerinin görüntülerinde ImageJ (Version 1.49t 12 Mayıs 2015) programı ile çap ölçümü gerçekleştirilmiştir. Çap ölçümü sonuçlarına göre, artan aljinat konsantrasyonunun kapsül çapını azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak %2'lik aljinat konsantrasyonunda viskozite artışının kapsül üretim işlemlerini güçleştirmesinden dolayı % 1,5 aljinat konsantrasyonu çalışmak için seçilmiştir.

Kaplama materyali olarak belirlenen %1,5'luk aljinat çözeltisi 20 saat manyetik karıştırıcıda (Spin-Master 4803-02 ABD) karıştırılmıştır (Krasaekoopt et al., 2004). Karıştırmanın ardından homojen hale geldiği gözlenen aljinat çözeltisine, %2 konsantrasyon olacak şekilde toz inülin (Santa Cruz 221760, ABD) ilave edilerek 1saat daha karışması sağlanmıştır (Muthukumarasamy and Holley, 2007). Hazırlanan kaplama materyali çözeltisinin sterilizasyonu 121°C'de 15 dak yapılmıştır.

4.3. Ekstrüzyon ve elektrosprey ile mikroenkapsülasyon

Bölüm 4.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan çalışma kültürü ile, Bölüm 4.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan kaplama materyali 1:5 (hücre kültürü:kaplama materyali) oranında karıştırılmıştır. Bu karışım her iki yöntemde de kullanılmıştır.

Ekstrüzyon yöntemi ile mikroenkapsülasyonda; steril tek kullanımlık 10 ml'lik şırınga içerisine alınan kaplama materyali hücre kültürü karışımı steril tek kullanımlık şırınga ucu 26 G (0,45 x 13 mm, Genjet) kullanılarak steril 0,1M CaCl_2 çözeltisine 17 cm yükseklikten damlatılmıştır (Krasaekoopt et al., 2004; Muthukumarasamy and Holley, 2007). CaCl_2 çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletilen kapsüller ardından 121°C 'de 15 dak steril edilmiş Whatman kağıdından (Life Sciences, 10300211, 125mm mavi) steril cam huni yardımıyla süzülerek steril petrilere aktarılmıştır (Şekil 4.1). Oluşturulan kapsüller liyofilizasyon işlemi yapılana kadar -20°C 'de depolanmıştır.



Şekil 4.1. Ekstrüzyon yöntemi ile oluşturulan ıslak kapsül formları.

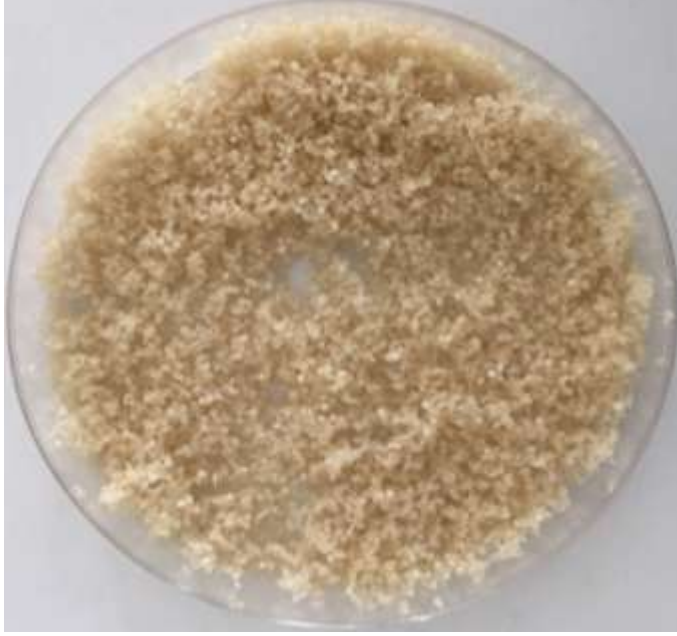
Elektrosprey tekniği ile mikroenkapsülasyon için kullanılan parametreler; Güç= 6,8 kV, Debi=9 ml/saat, Uzaklık=25 cm olarak ayarlanarak (Fukui et al., 2010), steril tek kullanımlık 10 ml'lik şırınga içerisine alınan kaplama materyali hücre kültürü karışımı steril tek kullanımlık şırınga ucu (0,80 x 22 mm = 21G küt uçlu, Sterican) ile steril 0,1 M CaCl₂ içerisine beslenmiştir. CaCl₂ çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletilen kapsüller ardından steril Whatman kağıdı ile süzülerek steril petri kaplarına aktarılmıştır (Şekil 4.2). Süzülen kapsüller liyofilizasyon işlemi yapılana kadar -20°C'de depolanmıştır.



Şekil 4.2. Elektrosprey yöntemi ile oluşturulan ıslak kapsül formları.

Ekstrüzyon ve elektrosprey yöntemleri ile oluşturulup -20°C'de donmuş kapsül örnekleri 0,01mbar basınç altında -50°C'de 23 saat liyofilize edilmiştir

(CRIST Gamma 2-16 LSC, İngiltere). Liyofilizasyonun ardından bir petride toplanan kapsüller +4°C’de depolanmıştır. Liyofilize kapsüller Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 3. Ekstrüzyon yöntemi ile oluşturulan liyofilize kapsül formları.



Şekil 4. 4. Elektrosprey yöntemi ile oluşturulan liyofilize kapsül formları.

Kapsül formlarının morfolojisinin belirlenmesi amacıyla yapılan ön denemelerde, her iki yöntemle oluşturulan ıslak kapsüller 37°C’de 72 saat kurutularak Bölüm 4.9’da anlatıldığı gibi SEM görüntülemesi yapılmıştır.

4.4. Mikroenkapsülasyon verimi

Bu amaçla stomacher torbasına aseptik teknikle aktarılan 0,5 g kapsül, 49,5 ml 0,1 M steril fosfat tamponu (pH: 7,0±0,2) ilave edilerek Seward-Stomacher-400 (Brinkmann, ABD) cihazında oda sıcaklığında, orta hızda 15 dak parçalanmıştır (Sheu and Marshall, 1993). Bu aşamanın ardından Bölüm 4.7’de anlatıldığı şekilde canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

4.5. SGF ve SIF ortamlarına direnç

SGF ve SIF ortamları tek kullanımlık steril filtreden (Sartorius Stedim 50459103- 0,2 µm) geçirilerek 121°C’de 15 dak sterilizasyonu uygulanmış cam şişelerin her birine (biri kontrol olmak üzere 3 örneğin her biri için; bir SGF bir SIF ortamı hazırlanması amacıyla toplamda 6 ayrı şişe kullanılmıştır) 12,5ml olacak şekilde aktarılmıştır. Öncelikle ilk kullanılacak olan ortam olan SGF ortamı 60 dak 37°C’de su banyosunda enzim aktivitesini arttırmak amacıyla bekletilmiştir (Amine et al., 2014). Ardından aseptik tekniklerle tartılan 0,5’er g kapsül (kontrol örneği için Bölüm 4.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kültürden 0,5 ml) 12,5’ar ml SGF ye ilave edilerek 37°C karıştırmalı su banyosunda (Köttermann GR.612, Almanya) 150 rpm hızda 90 dak karışmaya bırakılmıştır. 90 dak sonunda steril Whatman kağıdı ile süzülen örnekler, önceden 37°C’de 60 dak bekletilmiş 12,5ml steril SIF ortamına aktararak 37°C karıştırmalı su banyosunda 150 rpm hızda 180 dak karışmaya bırakılmıştır (Amine et al., 2014). Kontrol örneği ise SGF ortamının uzaklaştırması amacıyla falkom tüpüne aktararak 5000xg devirde 15 dak satrifüjün ardından 12,5 ml steril SIF ortamı ilave edilir.

Cam şişeye aktarılarak 37°C karıştırılmalı su banyosunda yaklaşık 150 rpm hızda 180 dak karışmaya bırakılmıştır. 180 dak sonunda kapsüllerin Bölüm 4.4’de anlatıldığı gibi parçalanması amacıyla SIF ortamından iki katlı steril cerrahi maske (Fortune-201015, İstanbul) yardımıyla süzölmüştür (Şekil 4.5). Kapsöl kaybını önlemek için süzölen kapsüllerle birlikte steril cerrahi maskenin tamamı steril stomacher torbasına aktarılarak Bölüm 4.7’de anlatıldığı şekilde canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.5. Süzölen kapsüllerin stomacher torbasında parçalanması.

Kapsüllerin süzölmesi amacıyla cerrahi maske kullanılmasının nedeni lifli yapısı sayesinde (Şekil 4.6) kapsüllerin geçemeyeceği büyüklükte por çapına sahip olmasıdır. Bu şekilde süzöntüye kapsöl geçişinin engellendiği düşünülmüştür.



Şekil 4.6. İki katlı cerrahi maske ve kapsüllerin ışık mikroskobu görüntüsü.

Kontrol örneği ise SIF ortamının uzaklaştırması amacıyla falkon tüpüne aktararak 5000xg devirde 15 dak satrifüjün ardından 5 ml steril peptonlu su ilave edilerek Bölüm 4.7’de anlatıldığı şekilde canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

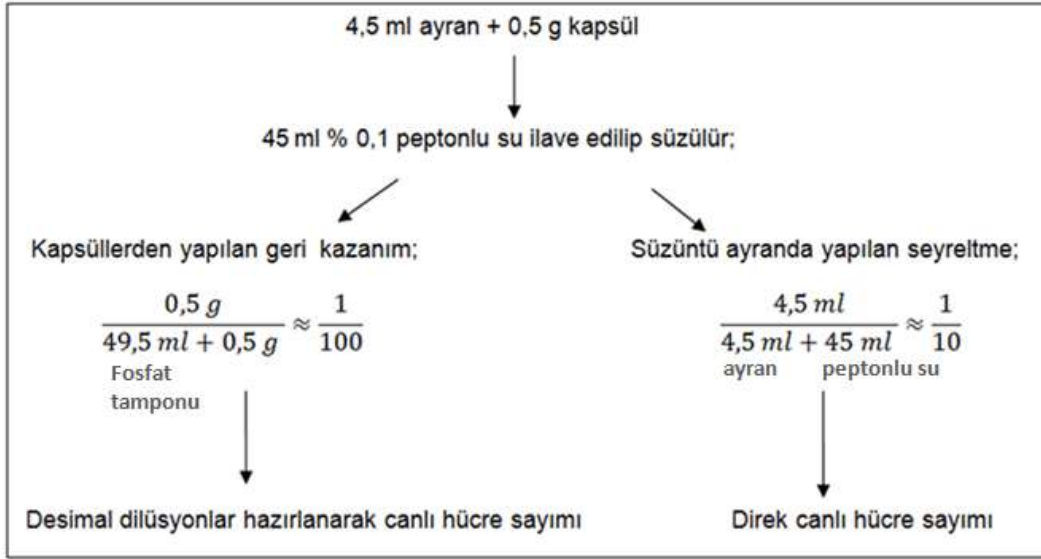
4.6. Kapsüllerin ayran örneklerine ilavesi

15ml’lik falkon tüplerine aktarılan 4,5 ml ayran örneklerine her iki yöntemle oluşturulmuş kapsüller aseptik teknikle 0,5 g ilave edilip (kontrol örneği için 4,5 ml ayrana Bölüm 4.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kültürden 0,5 ml) +4°C’de 21 gün depolamaya bırakılmıştır. Ayran örneklerine kapsüller ilave edilmeden önce 60°C’de 15 dak pastörizasyon uygulanmıştır (Şeker ve Patır, 2011).

Depolama periyodu boyunca 0., 7., 14. ve 21. günlerde gerçekleştirilen mikrobiyolojik analizlerde, ayran örneklerinden süzülen kapsül içerisindeki hücrelerin canlılığı ile birlikte ayrandan kapsül dışına salınan canlı hücre sayısı Bölüm 4.7’de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir.

Bu kapsamda, 0,5 g kapsül içeren 4,5 ml ayran örnekleri 45 ml steril peptonlu su ilave edilerek seyreltilmiştir (seyreltmenin amacı ayran örneklerinin kolay süzülmesini sağlamaktır). Süzme işlemi Bölüm 4.5’de belirtildiği şekilde steril çift katlı cerrahi maske kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Süzülen kapsüller Bölüm 4.4’de bahsedilen parçalama işlemine tabi tutularak canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7).

Kontrol örenklerinde ise Bölüm 4.7’de anlatıldığı gibi mikrobiyolojik analiz gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.7. Depolanan ayran örneklerinin mikrobiyolojik analiz şeması.

4.7. Mikrobiyolojik analiz (Canlı hücre sayımı)

Mikrobiyolojik analiz yapılacak örneklerden 1ml örnek alınmış ve 9ml %0,1'lik steril peptonlu suya ilave edilerek seyreltme yapılmıştır. Bu dilüsyondan diğer desimal dilüsyonlar hazırlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan dökme plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyer 30°C'de 48-72saat inkübasyona bırakılmıştır (Payne et al., 2003).

4.8. pH ölçümü

Kontrol grubu örneklerinin 0, 7, 14 ve 21. günlerinde pH ölçümü, NEL (mod 821 Türkiye) probunun ayrana doğrudan daldırılması yoluyla yapılmıştır.

4.9. SEM görüntülemesi

SEM fiksasyonunda 1. basamaktan 4. basamağa kadar +4 °C’de, diğer basamaklar oda sıcaklığında yapılmıştır. Sırası ile uygulanması gereken basamaklar (Lin et al., 1999);

1. Örnekler serum fizyolojik [% 0,85 NaCl (Merck 106404, Almanya)] ile yıkanmıştır.
2. 30 dk tampon A’da [0,1 M sodyum kakodilat (Sigma-Aldric C4945) içinde %5 gluteraldehit (% 25’lik pH: 7.2) (Sigma-Aldric G2305)] bekletilmiştir.
3. Ardından örnekler tampon B’ye [0,1 M sodyum kakodilat (Sigma-Aldric C4945)] içinde %7 süktroz (7g/100ml) alınarak 30 dk bekletilmiştir.
4. Daha sonra örnekler tampon C’ye [0,1 M sodyum kakodilat(Sigma-Aldric C4945) içinde %2 ozmiyum tetraoksit (Sigma-Aldric 201030)] alınarak 30 dk bekletilmiştir.
5. Süre sonunda örnekler tampon C’den alınarak iki kez 5’er dk distile su ile yıkanmıştır.
6. Yıkama sonrası örnekler artan derecelerdeki etanol serilerinde (sırasıyla %35,%50, %70, %85, %95 ve %96, %96’lık) 5’er dk bekletilerek susuzlaştırılmıştır.
7. Alkol serileri tamamlandıktan sonra örnekler (HMDS) Hekzametildisilan (Merck 4325, Almanya) solüsyonunda 5 dk bekletilmiştir.
8. Ardından HMDS uzaklaştırılarak kurtma amacıyla örnekler oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir.

9. Kuruma tamamlandıktan sonra SEM görüntülemesine kadar desikatörde bekletilmiştir.

Hazırlanan örnekler İYTE MAM (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi)'ne götürülerek hizmet alımı gerçekleştirilmiştir.

4.10. Mikroskopik yöntemlerle çap ölçümü

Işık mikroskobu ile liyofilize kapsüllerin çapları; OLYMPUS (67776-2, Japonya) ışık mikroskopunda ölçekli lam (CARL ZEISS, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Çap ölçümü 30 farklı kapsülde yapılmıştır.

Inverted mikroskop ile ıslak ve liyofilize kapsüllerin çapları; OLYMPUS CK40 - F200 (2G06320, Japonya) inverted mikroskop ile alınan görüntüler sonucunda ImageJ (Version 1.49t 12 Mayıs 2015) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.11. İstatistiksel analiz

Tez kapsamında üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen analiz sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi için SPSS 18.0 Windows paket programı kullanılmıştır. Bağımsız iki grubun ortalamaları arasındaki farklılık (0,95 güven aralığında) t-testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

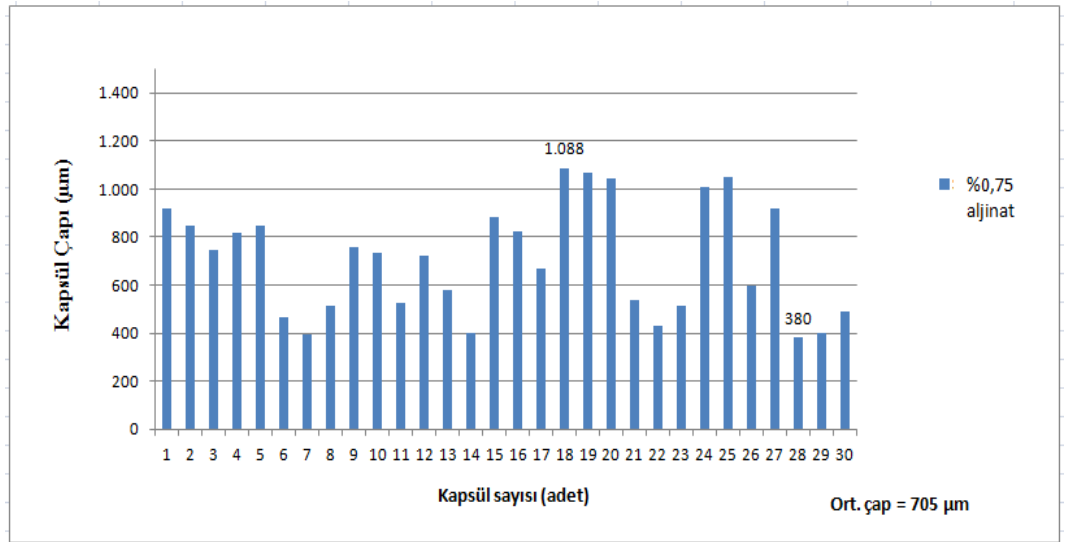
5. BULGULAR

5.1. Çalışma kültüründeki hücre sayım sonuçları

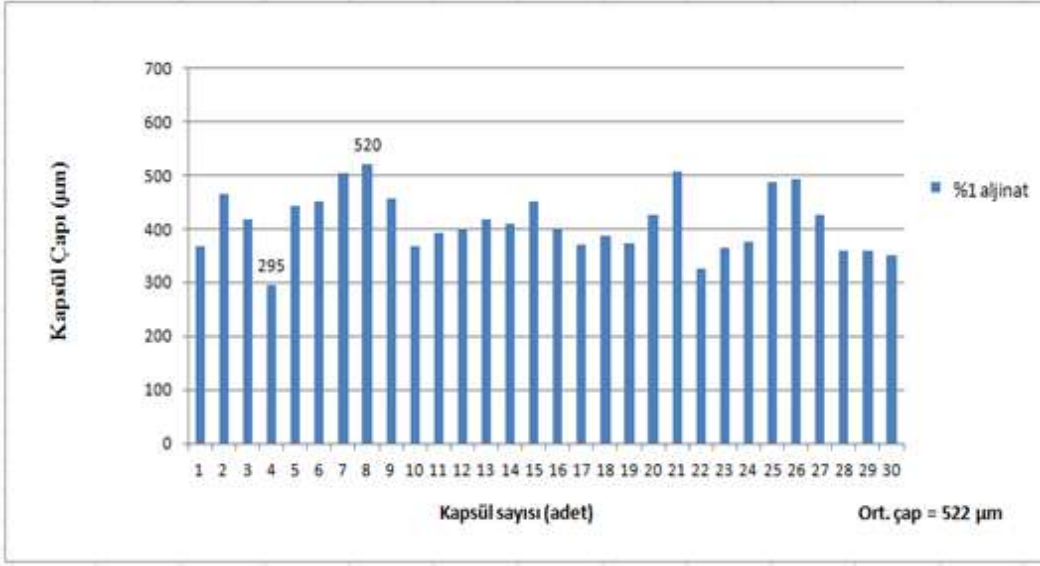
Yapılan canlı hücre sayımının sonucunda, enkapsüle edilmek üzere hazırlanmış olan çalışma kültürünün McFarland değeri 11 ($1,46 \times 10^9$ kob/ml *L. plantarum*) bulunmuştur.

5.2. Kapsül materyalinde uygun aljinat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla yapılan kapsül çapı ölçüm sonuçları

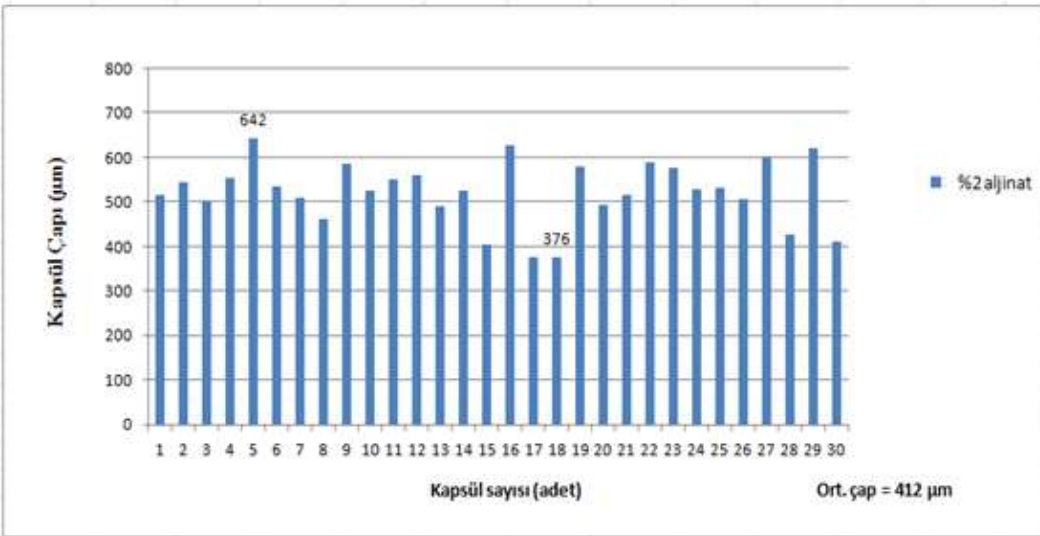
Ön denemelerin sonucunda, inverted mikroskop ile alınan görüntülerden yapılan çap ölçümü sonuçları Şekil 5.1, Şekil 5.2, Şekil 5.3’de verilmiş olup ortalama çap değerleri; %0,75 aljinat =705 μ m, %1 aljinat =522 μ m, %2 aljinat =412 μ m olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.1. %0,75 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsül çap ölçüm sonuçları.

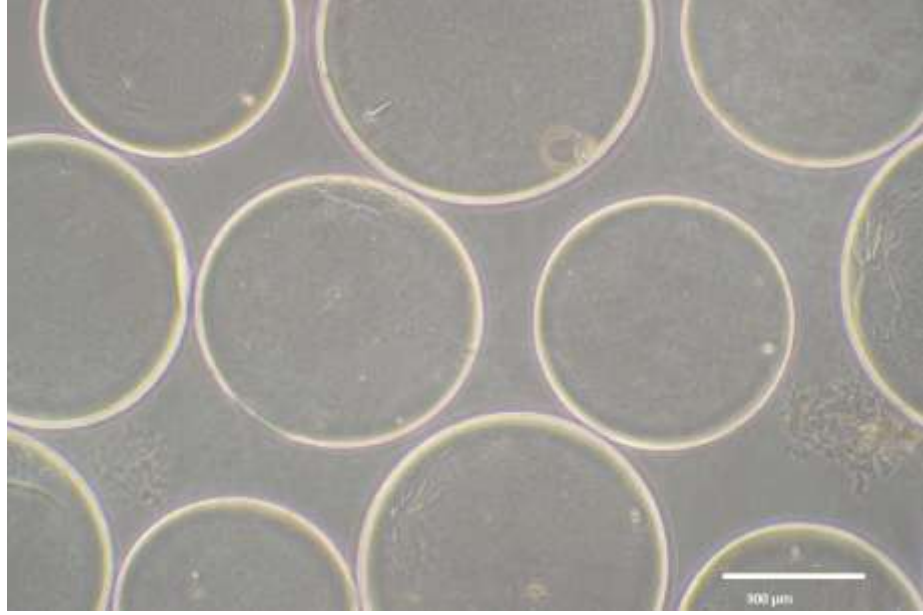


Şekil 5.2. %1 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsül çap ölçüm sonuçları.

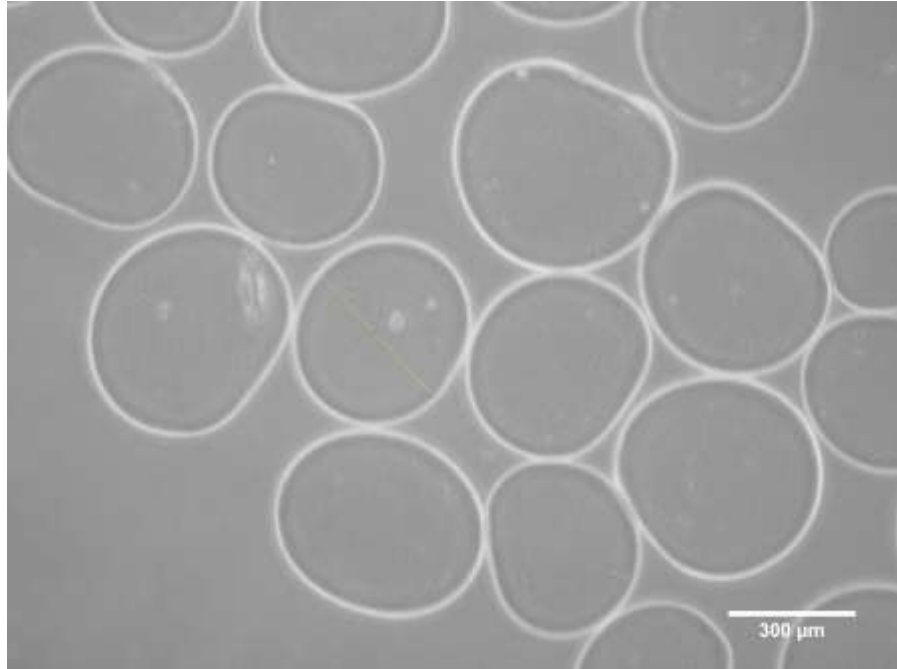


Şekil 5.3. %2 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsül çap ölçüm sonuçları.

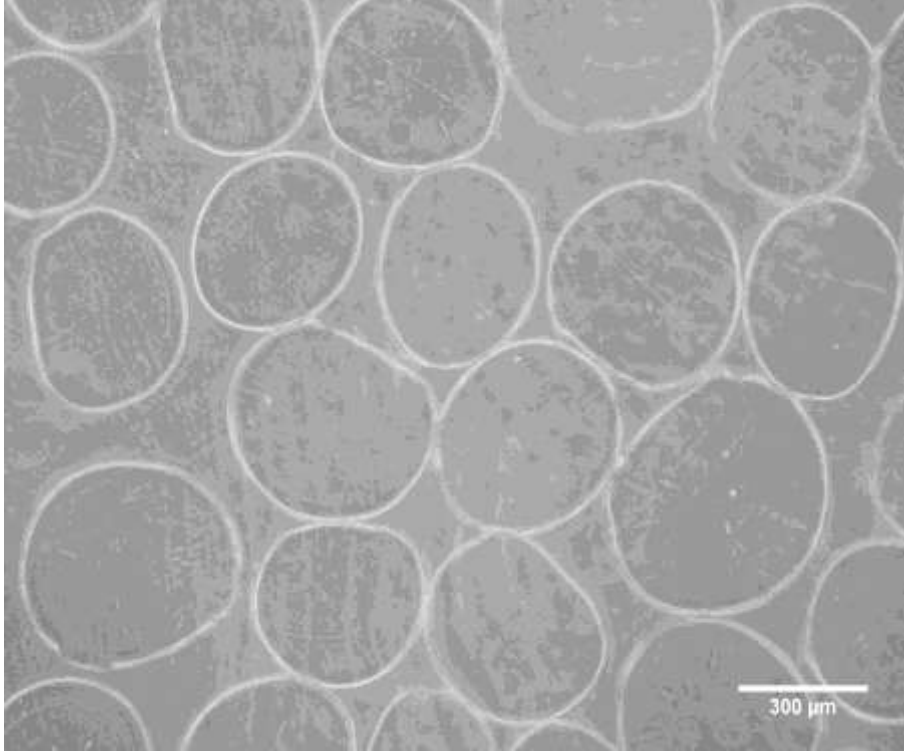
Ön deneme kapsamında % 0,75, % 1 ve % 2 konsantrasyonlarındaki aljinat çözeltileri ile hücre kültürü ilave edilmeden elektrosprey ile oluşturulan kapsül formlarının inverted mikroskop görüntüleri Şekil 5.4, Şekil 5.5 ve Şekil 5.6'de gösterildiği gibidir.



Şekil 5.4. %0,75 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsüllerin inverted mikroskop görüntüsü.



Şekil 5.5. %1 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsüllerin inverted mikroskop görüntüsü.



Şekil 5.6. %2 aljinat konsantrasyonu ile elde edilen ıslak kapsüllerin inverted mikroskop görüntüsü.

5.3. Ekstrüzyon ve elektrosprey yöntemleri ile mikroenkapsülasyon verimi sonuçları

Mikroenkapsülasyon işleminden önce hücre kültüründen ve liyofilize kapsüllerin parçalanmasıyla elde edilen örneklerden yapılan canlı hücre sayımı sonuçları Çizelge 5.1.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre iki yöntemle gerçekleştirilen mikroenkapsülasyonun verimi;

Mikroenkapsülasyon verimi = $(N / N_o) \times 100$ formülü ile hesaplanmıştır (Chavarri et al., 2010).

N: Geri kazanımla elde edilen hücre sayısı

No: Mikroenkapsülasyon öncesi hücre sayısı

Ekstrüzyon ile mikroenkapsülasyon verimi = $7,56 / 8,94 = \% 84,57$

Elektrosprey ile mikroenkapsülasyon verimi = $7,72 / 8,94 = \% 86,33$

Sonuçlara göre ekstrüzyon ile mikroenkapsülasyonda verim $\% 84,57$, elektrosprey ile mikroenkapsülasyonda verim $\% 86,33$ olarak hesaplanmıştır. İki farklı yöntemin verimi arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli değildir ($P \leq 0,05$).

Çizelge 5.1. Mikroenkapsülasyon öncesi ve sonrası canlı hücre sayıları.

	Enkapsülasyon öncesi	Enkapsülasyon sonrası
	hücre sayısı (log-kob/g)	hücre sayısı (log-kob/g)
Ekstrüzyon	$8,94 \pm 0,01^{aA}$	$7,56 \pm 0,30^{bA}$
Elektrosprey	$8,94 \pm 0,01^{aA}$	$7,72 \pm 1,47^{bA}$

Ortalama $\pm$ SD (n=3)

^{a,b} Aynı satırdaki değerler için farklı indis ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P \leq 0,05$).

^A Aynı sütundaki değerler için farklı indis ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P \leq 0,05$).

5.4. SGF ve SIF ortamlarına direnç sonuçları

Liyofilize kapsüllerin SGF ve SIF ortamlarına maruz kaldıktan sonra canlı hücre sayım sonuçları Çizelge 5.2’de verilmiştir. SGF-SIF ortamlarına direnç denemesinde kontrol örneğinde mikroenkapsülasyon öncesinde $7,5 \pm 0,20$ log-kob/ml hücre bulunurken, direnç denemelerinin ardından 3,3 log birimi canlılık kaybı meydana gelmiştir. Ekstrüzyon ile mikroenkapsülasyonda direnç denemesinden önce $7,42 \pm 1,21$ log-kob/ml hücre bulunup, SGF-SIF denemesinin ardından 0,52 log birimi düşüş gözlenmiştir. Elektrosprey ile mikroenkapsülasyonda ise direnç denemesinden önce $7,16 \pm 1,05$ log-kob/ml

hücre bulunup direnç denemesinin ardından 1,11 log birimi canlılık kaybı meydana gelmiştir. SGF-SIF direnç denemelerindeki canlı hücre kaybı bakımından iki yöntem arasındaki fark ve yöntemlerin ayrı ayrı kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,05$).

Çizelge 5.2. SGF-SIF ortamlarına direnç öncesi ve sonrası hücre sayısı.

	SGF-SIF direnç öncesi hücre sayısı (log-kob/g)	SGF-SIF direnç sonrası hücre sayısı (log-kob/g)
Ekstrüzyon	$7,42 \pm 1,21^{aA}$	$6,90 \pm 0,30^{bA}$
Elektrosprey	$7,16 \pm 1,05^{aA}$	$6,05 \pm 1,20^{bB}$
Kontrol	$7,5 \pm 0,20^{aA}$	$4,2 \pm 0,20^{bC}$

Ortalama $\pm$ SD (n=3)

^{a,b} Aynı satırdaki değerler için farklı indis ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P \leq 0,05$).

^{A,B,C} Aynı sütundaki değerler için farklı indis ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P \leq 0,05$).

5.5. Ayranda depolama periyodu boyunca canlı hücre sayımı sonuçları

21 günlük depolama periyodunda 7 gün arayla alınan ayran örneklerindeki kapsüllerden geri kazanımla elde edilen canlı hücre sayım sonuçları Çizelge 5.3’de verilmiştir.

Depolama periyodunun 0. gününde kontrol örneklerinde canlı hücre sayısı $7,66 \pm 1,20$ log-kob/ml iken; 21. günde $3,32 \pm 0,97$ log-kob/ml olarak sayılmış ve depolama periyodu boyunca kontrol örneğinde 4,34 log birimi canlılık kaybı gözlenmiştir.

Ekstrüzyon ile mikroenkapsülasyonda depolama periyodu boyunca canlı hücre sayısında 0,5 log birimi kayıp meydana gelmiştir. Canlılık kaybında meydana gelen en ciddi düşüş 14. gün ile 21. gün arasında meydana gelmiştir (0,2 log-kob/ml). Elektrosprey ile mikroenkapsülasyonda depolama periyodu boyunca 1,38 log birimi canlılık kaybı meydana gelmiştir. Meydana gelen canlılık kaybındaki en fazla düşüş 0. gün ile 7. gün arasında gerçekleşmiştir (0,85 log-kob/ml). Bu sonuçlar doğrultusunda, iki farklı yöntemin depolama periyodu boyunca hücre stabilitesi üzerine etkileri bakımından ayrı ayrı ve kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,05$).

Çizelge 5. 3. Ayrandaki kapsüllerden depolama periyodu boyunca geri kazanılan canlı hücre sayım sonuçları.

	0.gün hücre sayısı (log-kob/g)	7.gün hücre sayısı (log-kob/g)	14.gün hücre sayısı (log-kob/g)	21. gün hücre sayısı (log-kob/g)
Ekstrüzyon	7,32 ± 0,51 ^{aA}	7,13 ± 0,30 ^{aA}	7,02 ± 0,47 ^{aA}	6,82 ± 1,02 ^{bA}
Elektrosprey	7,50 ± 0,05 ^{aA}	6,65 ± 2,40 ^{bB}	6,54 ± 2,30 ^{bB}	6,12 ± 0,97 ^{bB}
Kontrol	7,66 ± 1,20 ^{aA}	6,20 ± 0,30 ^{bB}	4,61 ± 1,41 ^{cC}	3,32 ± 0,97 ^{dC}

Ortalama ± SD (n=3)

^{a,b,c,d} Aynı satırdaki değerler için farklı indis ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P \leq 0,05$).

^{A,B,C} Aynı sütundaki değerler için farklı indis ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P \leq 0,05$).

21 günlük depolama periyodunda 7 gün arayla alınan ayran örneklerinde kapsüllerden salınan canlı hücre sayım sonuçları Çizelge 5.4’de verilmiştir. Ekstrüzyon örneklerinden ayrana hücre salımı 14. günde başlamış ve

depolamanın sonunda 1,61 log-kob/ml hücre sayısı saptanmıştır. Elektrosprey örneklerinden ayran hücre salımı ise 7. günde başlamış ve 21. günde hücre sayısı 2,52 log-kob/ml olarak saptanmıştır. İki yöntem arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,05$).

Çizelge 5. 4. Ayrandaki kapsüllerden depolama periyodu boyunca salınan canlı hücre sayım sonuçları.

	0.gün hücre sayısı (log-kob/g)	7.gün hücre sayısı (log-kob/g)	14.gün hücre sayısı (log-kob/g)	21. gün hücre sayısı (log-kob/g)
Ekstrüzyon	-	-	$0,82 \pm 3,17^{aA}$	$1,61 \pm 1,32^{aA}$
Elektrosprey	-	$1,45 \pm 1,09^a$	$2,04 \pm 1,38^{bB}$	$2,52 \pm 0,97^{bB}$

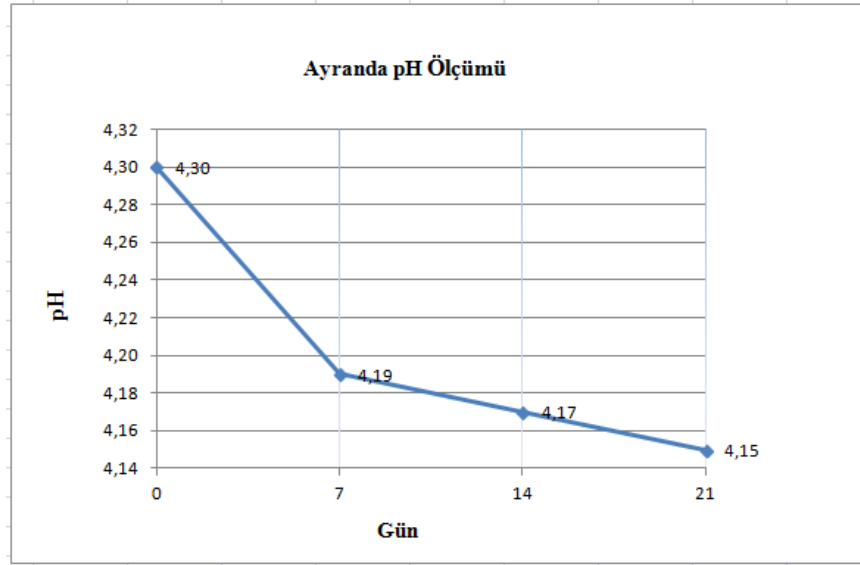
Ortalama $\pm$ SD (n=3)

^{a,b} Aynı satırdaki değerler için farklı indis ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P \leq 0,05$).

^{A,B} Aynı sütundaki değerler için farklı indis ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P \leq 0,05$).

5.6. Ayranda pH ölçüm sonuçları

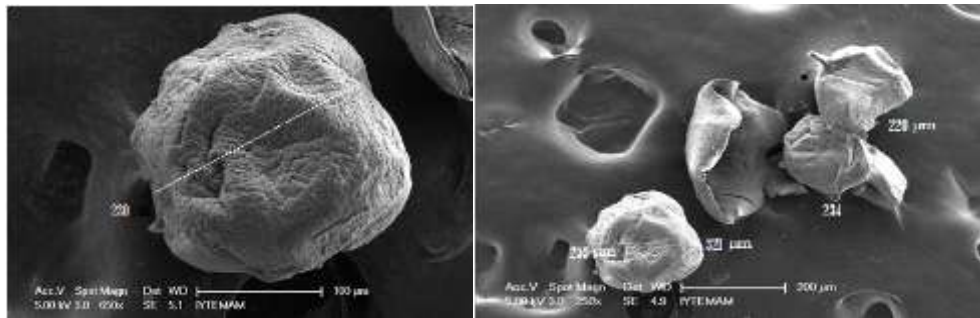
21 günlük depolama periyodu boyunca kontrol örneklerinde yapılan pH ölçümü sonuçları Şekil 5.7’de gösterilmektedir. Depolama periyodu boyunca ayran örneklerinde pH 0. günde 4,30, 7. günde 4,19; 14. günde 4,17 ve 21. günde 4,15 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre kontrol örneğindeki başlangıç ile son gün arasındaki pH düşüşü 0,15 birim olarak hesaplanmıştır. Depolama sonunda kontrol örneğindeki düşüş ihmal edilebilecek seviyede olduğundan, kapsül içeren örneklerde pH ölçümüne gerek duyulmamıştır.



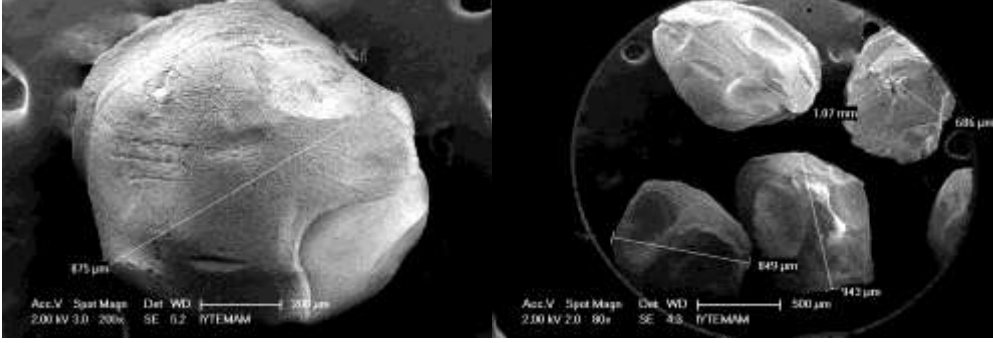
Şekil 5. 7. Depolama periyodu boyunca ayranda pH ölçümü.

5.7. SEM görüntülemesi

Yapılan ön deneme sonuçlarına göre, SEM görüntülemesi ile kapsül morfolojisi gözlemlenmiş olup, her iki yöntemle *L. plantarum* mikroenkapsüle edilerek 37°C inkübatörde kurutulan kapsül formları Şekil 5.8 ve Şekil 5.9’da gösterildiği gibidir.

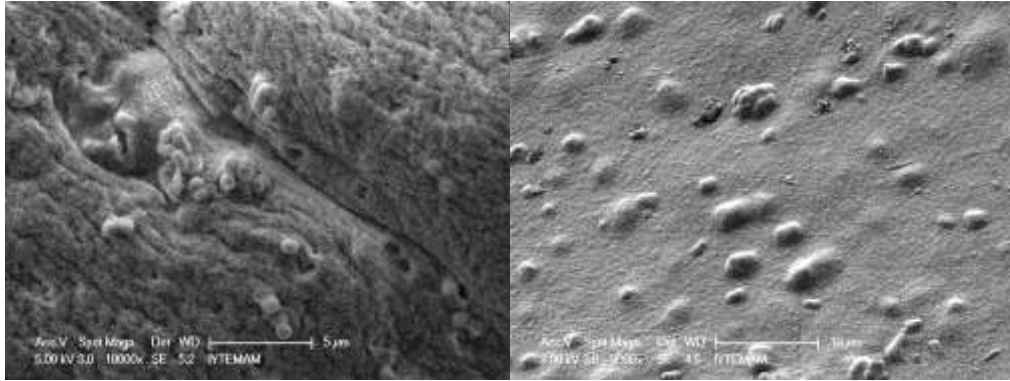


Şekil 5. 8. Elektrosprey kapsülünün SEM görüntüsü.



Şekil 5. 9. Ekstrüzyon kapsülünün SEM görüntüsü.

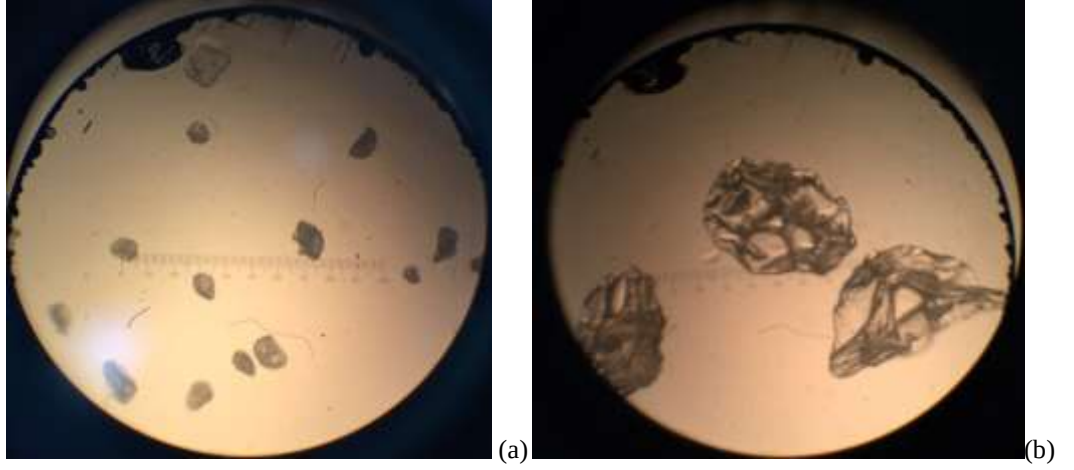
Kapsül formlarının yüzeyine yakın bölgelerinde ve yüzeyinde tutunmuş olan *L. plantarum* hücrelerinin SEM görüntüsü Şekil 5.10’da verilmiştir.



Şekil 5. 10. Enkapsüle edilen *L. plantarum* hücrelerinin kapsül yüzeyindeki görünümü.

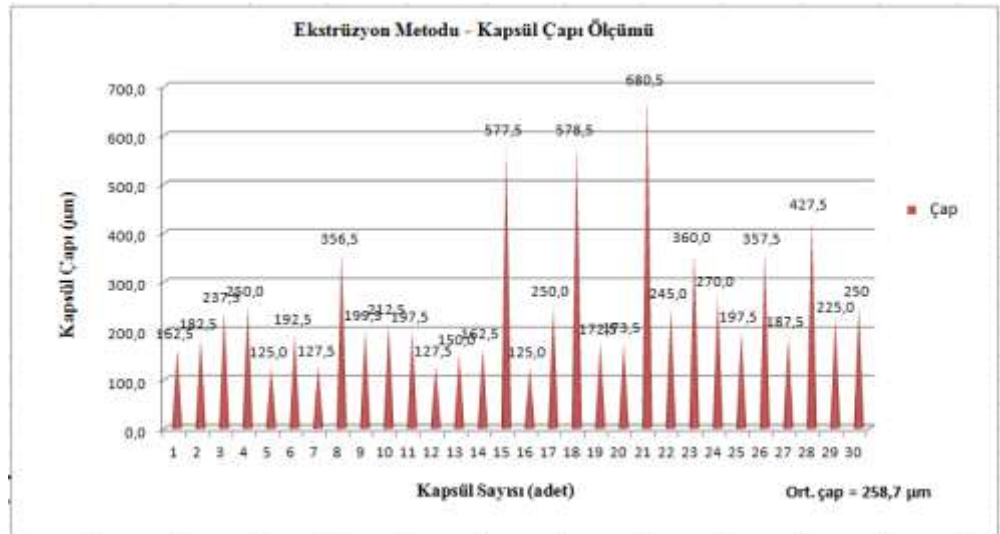
5.8. Mikroskobik yöntemlerle çap ölçümü sonuçları

İki yöntemle oluşturulan liyofilize kapsüllerin ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 5.11’de verilmiştir.



Şekil 5. 11. Elektrosprey (a) ve ekstrüzyon (b) metodu ile oluşturulan liyofilize kapsüllerin ışık mikroskobu görüntüsü (görüntüler 40 kez büyütülmüştür).

Işık mikroskobu ile yapılan çap ölçümü sonuçları Şekil 5.12 ve Şekil 5.13’de verildiği gibidir.



Şekil 5. 12. Ekstrüzyon metodu ile oluşturulan kapsüllerin ışık mikroskobuyla yapılan çapı ölçümü sonuçları.

Sonuçlara göre ekstrüzyon yönteminde ortalama çap = 258,7 µm bulunmuş olup, en küçük kapsül çapı=125,0 µm en büyük çap=680,5 µm olarak ölçülmüştür.



Şekil 5.13. Elektrosprey metodu ile oluşturulan kapsüllerin ışık mikroskopuyla yapılan çapı ölçümü sonuçları.

Sonuçlara göre ekstrüzyon yönteminde ortalama çap = 258,7 µm bulunmuş olup, en küçük kapsül çapı=125,0 µm en büyük çap=680,5 µm olarak ölçülmüştür. Elektrosprey yönteminde ise ortalama çap = 85,0 µm bulunmuş olup, en küçük kapsül çapı=25,0 µm en büyük çap=250,0 µm olarak ölçülmüştür.

Enkapsüle formlarının inverted mikroskop ile yapılan çap ölçüm sonuçları ise, Şekil 5.14 ve Şekil 5.15’de verilmiştir. Ölçümler sonucunda ekstrüzyon yönteminde ortalama çap = 275,7 µm olup, örneklerde en küçük kapsül çapı=156,0 µm en büyük kapsül çapı=549,0 µm olarak ölçülmüştür. Elektrosprey yönteminde ise ortalama çap = 97,633 µm olup, örneklerde en küçük kapsül çapı=32,0 µm en büyük kapsül çapı= 246,0 µm olarak ölçülmüştür.



Şekil 5. 14 Ekstrüzyon metodu ile oluşturulan kapsüllerin inverted mikroskop ile yapılan çapı ölçümü sonuçları.



Şekil 5. 15 Elektrosprey metodu ile oluşturulan kapsüllerin inverted mikroskop ile yapılan çapı ölçümü sonuçları.

6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Tez kapsamında öncelikle, probiyotik mikroenkapsülasyonu amacıyla uygun kapsül boyutunun ayarlanması için kullanılması gereken aljinat konsantrasyonu belirlenmiştir. %0,75, %1, %1,5 ve %2 konsantrasyonlarında ön denemeler yapılarak oluşan kapsüllerde mikroskopik yöntemlerle çap ölçümü gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda aljinat konsantrasyonu arttıkça kapsül çapının küçüldüğü anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, Allan-Wojtas et al. (2008), tarafından yapılan çalışma sonuçları ile desteklenmekte olup, araştırmacılar artan aljinat konsantrasyonunun kapsül boyutunu küçülttüğünü belirtmişlerdir. Chavarri et al. (2010), yaptıkları çalışmada kapsül materyali olarak aljinat ve aljinat-kitosan karışımı ile denemeler yaparak kapsüllerin boyut ve etkinliklerini incelenmişlerdir. Mikroskopik yöntemlerle, aljinat-kitosan ile oluşturdukları kapsüllerin ortalama çapını; 145,43 μm , aljinat ile oluşturulan enkapsüllerin çapını; 362,05 μm olarak ölçülmüşlerdir. Tez çalışmasının sonuçları bu çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir. Benzer şekilde Chen and Chen (2007), yaptıkları çalışmada probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda, kullanılacak olan kaplama materyallerinin en uygun kombinasyonunu saptamaya çalışmışlardır. Etkin mikroenkapsülasyon için uygun kombinasyonun %1 peptit ve %3 fruktooligosakkarit ile karıştırılmış olan %3'lük sodyum aljinat olduğunu göstermişlerdir.

Deneme sonuçlarına göre %2 aljinat konsantrasyonunda daha küçük kapsüller elde edilse de viskozitenin artışı nedeniyle tercih edilememiştir. Ekstrüzyon yönteminin manuel yapılması nedeniyle yoğun çözeltinin enjeksiyonu güçlük yaratmıştır. Aynı zamanda elektrosprey yöntemi için ise, besleme hızını

düşüren bir faktör olması sebebiyle %2 ve üzerindeki konsantrasyonlar seçilmemiştir.

Tez çalışmasında uygun aljinat konsantrasyonu belirlendikten sonra ekstrüzyon ve elektrosprey yöntemleri ile enkapsülasyon yapılmıştır. Sonuç olarak, elektrosprey yöntemi ile mikroenkapsülasyonda verim %86,35 ekstrüzyon yönteminde ise verim %84,56 olarak hesaplanmıştır. Brinques and Ayub (2011), yapmış oldukları çalışmada kaplama materyali olarak yalnızca %2 aljinat kullanıldığı durumda, %2 aljinat ve pektin karışımı kullanıldığı duruma göre verimde %12 artış meydana geldiğini bildirmiştir. Çalışmada yalnızca aljinat kullanılarak yapılan enkapsülasyonun verimi % 82,5 olup, tez çalışmasında kullanılan aljinat yüzdesi ile verim sonuçlarına paralel olduğu söylenebilir. Sandoval-Castilla et al., (2010), ekstrüzyon ile enkapsüle edilen probiyotiklerin veriminin %69,2 olduğunu bildirilmiştir. Kaplama materyalindeki aljinat konsantrasyonunun %10'dan %2'ye indirilip, dirençli nişasta eklenerek yapılan enkapsülasyonda ise verimin %84'e ulaştığını bildirmişlerdir. Verimde meydana gelen bu artışın aljinat konsantrasyonu ile ilişkili olduğu söylenmiştir. Literatürde en yaygın kullanılan aljinat konsantrasyonu %1-2 aralığında olup, kapsül parçalanması ile hücrelerin geri kazanımını kolaylaştıran konsantrasyonlar olduğu düşünülmüştür (Kailasapathy, 2006; Brinques and Ayub, 2011; Amine et al., 2014; Madureira et al., 2015).

Çalışma kapsamında ayrıca kapsül materyallerin probiyotikleri yapay mide ortamındaki yüksek asitlik, bağırsak ortamındaki safra tuzu ve pepsin pankreatin gibi sindirim enzimlerine karşı direnci de araştırılmıştır. SGF-SIF ortamlarına direnç denemelerinde kontrol örneğinde 3,3 log birimi canlılık kaybı olurken; ekstrüzyon ile mikroenkapsülasyonda 0,52 log birimi, elektrosprey ile

mikroenkapsülasyonda 1,11 log birimi canlılık kaybı gözlenmiştir. Amine et al., (2014) yaptıkları çalışmada, ekstrüzyon metodu kullanılarak % 1,6'lık O-palmitoylatin aljinat ile enkapsüle edilmiş *B. longum* hücrelerinin 90 dakika SGF ardından 180 dakika SIF ortamında karıştırıldıktan sonra 1 log birimi azalma olduğu bildirilmiştir. Sonuçlardaki farkın kullanılan aljinatın moleküler içeriğinin farklı olması ve kullanılan probiyotik bakterinin farklı olmasının neden olduğu söylenebilmektedir. Mandal et al. (2006), yaptıkları çalışmada, farklı aljinat yüzdeleri (%2, %3 ve %4) ile mikroenkapsüle edilmiş *L. casei* NCDC-298 türünün yapay mide ortamında canlılık stabilitesi üzerine etkisini incelemişler ve artan aljinat konsantrasyonuna bağlı olarak bakterinin gastrointestinal koşullara dayanımının arttığını saptamışlardır. Chavarri et al. (2010), *B. bifidum* ve *Lactobacillus gasseri* probiyotiklerinin mikroenkapsülasyonunda yalnızca aljinat ve aljinat kitosan çift kaplama tekniklerini uygulamışlardır. SGF ortamına 120 dakika ardından SIF ortamına 120 dakika maruz bırakılan kapsüllerden yapılan canlılık ölçümünde aljinat kapsülünde 2 log birim azalma gözlenirken, çift kaplama uygulanan kapsülde 0,2 log birim azalma gözlemlendiği bildirilmiştir. Çift kaplama ile oluşturulan kapsüllerin hücreleri stres koşullarına karşı daha iyi koruduğu belirtilmiştir. Yalnızca aljinat kullanılarak yapılan mikroenkapsülasyonun SGF-SIF direnç denemeleri sonucu tez çalışması ile kıyaslandığında aradaki farkın SGF-SIF uygulama sürelerinden ve kullanılan probiyotik suşlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sultana et al. (2000), yaptıkları çalışmada kalsiyum aljinat-mısır nişastası karışımı ile emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile kaplanmış *L. acidophilus* ve *B. bifidum* kültürlerinin yapay gastrointestinal sistemdeki canlılık düzeylerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda kaplama işleminin yüksek asit ve safra tuzu

ortamında hücre canlılığını korumada önemli bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Emülsiyon polimerizasyonunun probiyotiklerin fiziksel stres koşullarına karşı korunmasında etkili bir yöntem olmadığı, bunun yerine enkapsülasyonun uygulanması tavsiye edilmektedir.

Oluşturulan kapsül formları SGF ve SIF ortamlarına direnç denemelerinden geçirildikten sonra ayranı ilave edilerek örnekler 21 gün +4°C’de depolanmıştır. Depolama periyodunun sonunda kontrol örneğinde 4,34 log birim canlılık kaybı olurken, ekstrüzyon ile mikroenkapsülasyonda 0,5 log birim ve elektrosprey ile mikroenkapsülasyonda 1,38 log birim canlılık kaybı meydana gelmiştir. Çizelge 5.3’de verilen sonuçlara göre; depolama periyodunun sonunda ekstrüzyon ile mikroenkapsülasyonda 6,82 log-kob/ml, elektrosprey ile mikroenkapsülasyonda ise 6,12 log-kob/ml canlı hücre bulunmaktadır. Türk Gıda Kodeksi ‘Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliği (2006/34, Resmi Gazete: 07.07.2006-26221)’nde belirtildiğine göre, bir gıda ürününün probiyotik özelliğe sahip olabilmesi ürünün raf ömrü boyunca en az 6 log-kob/ml probiyotik içermesi gerekmektedir. Buna göre her iki yöntemle yapılan mikroenkapsülasyon ile Türk Gıda Kodeksi kriterlerine uygun probiyotik içerikli ayran elde edildiği söylenebilmektedir.

Tez çalışmasında ise depolama periyodu boyunca kontrol grubundaki pH; 4,30-4,15 olarak ölçülmüştür. Kontrol örneğinde meydana gelen 0,15 birimlik düşüş dikkate değer bulunmamıştır. Bu nedenle kapsüllerin bulunduğu örneklerde pH ölçümüne gerek duyulmamıştır. Kailasapathy (2006), ekstrüzyon ile mikroenkapsülasyon yaparak aljinat kapsüllerinin yoğurtta 6 haftalık depolama periyodunda hücre canlılığına etkisini araştırmıştır. Çalışmada depolama periyodunun 1. ve 42. günlerinde, kapsüllerin bulunduğu yoğurt örneğindeki pH;

4,48-4,25 kontrol örneklerinde (enkapsüle edilmeden yoğurda ilave edilen probiyotik kültürü) pH; 4,49-3,95 şeklinde bildirmiştir. Kapsül içeren örneklerde 0,23 birim, kontrol örneğinde 0,54 birim pH düşüşü meydana geldiğini bildirmiştir. Tez çalışmasındaki pH düşüşünün bu çalışmadaki pH düşüşünden farklı olmasının nedenleri; olarak depolama periyodlarının ve kullanılan probiyotik suşlarının farklı olması gösterilebilir.

Tez çalışmasının son basamağında kapsül materyallerinin ışık mikroskobu ve inverted mikroskop ile çap ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Çap ölçüm sonuçlarına göre, ekstrüzyon ile mikroenkapsülasyonda ortalama çap, 258,7 μm (ışık mikroskobu) ve 275,6 μm (inverted mikroskop); elektrosprey ile mikroenkapsülasyonda ise ortalama çap, 85 μm (ışık mikroskobu) ve 97,6 μm (inverted mikroskop) olarak bulunmuştur. Chavarri et al. (2010), yaptıkları çalışmada yalnızca aljinat ile ve aljinat-kitosan kompoziti ile yapılan enkapsülasyonların boyut ve etkinliklerini incelenmiştir. Çalışmada aljinat ile oluşturulan enkapsüllerin ortalama çapı; 145,43 μm aljinat-kitosan kompoziti ile oluşturulan enkapsüllerin çapı; 362,05 μm olarak ölçülmüştür. Muthukumarasamy and Holley (2007), yaptıkları çalışmada ekstrüzyon yöntemi ile 2-4 mm çapında, emülsiyon yöntemi ile 20-1000 μm çapında kapsül formları oluşturmuştur. Kapsül çapı arttıkça hücre canlılığının arttığı bildirilmiştir. Ancak kapsül boyutunun artması duyuşal açıdan istenmeyen bir durum olduğundan kapsül boyutunun mümkün olduğu kadar küçük olması gerekmektedir.

Sonuç olarak, probiyotik mikroenkapsülasyonu ile probiyotik özellik kazandırılmak istenen ayranın depolama periyodu boyunca ve tüketildiğinde hücre stabilitesinin her iki yöntemle de korunduğu gösterilmiştir. İki farklı

yöntemin; SGF-SIF direnci, depolama periyodu boyunca ayran örneklerinde hücre stabilitesi ve kapsülden ayrana geçen canlı hücre sayısı bakımından farklı olduğu istatistiksel analizlerle gösterilmiştir. Elektropsrey yöntemi ile edle edilen kapsüllerin 100 µm altında çapa sahip olması iki yöntemden birinin tercih edilmesinde etkili bir kriter olup, probiyotik içerikli ürün üretiminde elektropsrey yönteminin kullanımı tavsiye edilmektedir. Probiyotik özellik kazandırılması amaçlanan ayran örnekleri kalite kriterleri açısından değerlendirildiğinde, kapsüllerin istenmeyen doku oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, probiyotik içeren kapsüllerin kefir, yoğurt veya peynir gibi süt ürünlerine katılarak tüketilmesi tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR DiZiNi

Allan-Wojtas, P., Truelstrup Hansen, L. and Paulson, A.T., 2008, Microstructural studies of probiotic bacteria loaded alginate microcapsules using Standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation, *LWT-Food Sci Technol*, 41: 101-108pp.

Aloğlu, H. ve Öner, Z., 2010, Peyniraltı suyu proteinlerinin mikrokapsülasyon teknolojisinde kaplama materyali olarak kullanım olanakları, *Akademik Gıda*, 8(3): 38-42ss.

Amine, K.M., Champagne, C.P., Raymond, Y., Britten, M., Fustier, P., Salmieri, S. and Lacroix, M., 2014, Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage, *Food Control*, 37:193-199pp.

Anon, 2005, Modern food biotechnology human health and development: an evidence-based study, *Food Safety Department World Health Organization* http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_en 09.09.2015.

Anon, 2006, Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ, Yayımlandığı R.Gazete 07.07.2006-26221.

Anon, 2013, Preparation of glycerol cultures for long term storage, Department of Mikrobiology, Lab 016 instructions, <http://mibio.wzw.tum.de/> 21.03.2015.

Anon, 2014, GRAS notification for *Lactobacillus fermentum*, <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM422874> 09.09.2015.

KAYNAKLAR DiZiNi (DEVAM)

Bernet, F.M., Brassart, D., Neeser, J.R. and Servin, A., 1993, Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interaction, *Applied Environmental Microbiology*, 59: 4121-4128pp.

Berrad., Lemeland, J-F., Laroche, G., Thouvenot, P. and Piaia, M., 1991, *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit, *Journal of Dairy Science*, 74:409–413pp.

Biloo, A.G., Memon, M.A., Khaskheli, S.A., Murtaza, G., Iqbal, K., Shekhani, M.S. and Siddiqi, A.Q. 2006, Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea, *World Journal of Gastroenterology*, 12:4557-4560pp.

Brinques, B.G. and Ayub, M.A.Z., 2011, Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration and yogurt, *Journal of Food Engineering*, 103: 123–128pp.

Burgain, J., Gaiani, M. and Linder, J., 2011, Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, *Journal of Food Engineering*, 104: 467–483pp.

Caicedo, R.A., Schanler, R.J., Li, N. and Neu, J., 2005, The developing intestinal ecosystem: implications for the neonate, *Pediatric Research*, 58: 625-628pp.

Champagne, C.P., Raymond, Y., Guertin, N., and Belanger, G., 2015, Effects of storage conditions microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream, *International Dairy Journal*, 47: 109–117pp.

KAYNAKLAR DiZiNi (DEVAM)

Chavarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibanez, F.C., Marzo, F. and Villaran, M.C., 2010, Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 142: 185-189pp.

Chen, M.J. and Chen, K.N., 2007, Applications of probiotic encapsulation in dairy products, *Encapsulation and Controlled Release, Technologies in Food Systems*, 12: 83–107pp.

Clark, P.A., Cotton, L.N. and Martin, J.H., 1993, Selection of *Bifidobacteria* for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II. Tolerance to simulated pH of human stomachs, *Culture of Dairy Products Journal*, 28: 11-14pp.

Corbo, M.R., Albenzio, M., De Angelis, M., Sevi, A. and Gobbetti, M., 2001, Microbiological and biochemical properties of canestrato pugliese hard cheese supplemented with *Bifidobacteria*, *J. Dairy Sci.* 84: 551-561pp.

Danielson, A., Shahani, K. and Amer, A. 1989, Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* fed to mature boars., *Journal Dairy Science*, 67:966-974pp.

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K. and Contreras, M., 2010, Delivery mode shapes the Acquisition and structure of the initial microbiotaa cross multiple body Habitats in newborns, *International Journal of Microbiology*, 107:5p.

Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, P., Vasiljevic, T. and Shah, N.P., 2007, Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage, *International Dairy Journal*, 17: 657-665pp.

Dubey, R., Shami, T.C. and Bhasker Rao, K.U., 2009, Microencapsulation technology and applications, *Defence Science Journal*, 59: 82-95pp.

KAYNAKLAR DiZiNi (DEVAM)

Duncan, S.H., Lobley, G.E. and Holtrop, G., 2008, Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss, *International Journal of Obesity*, 32:1720p.

Dunne, C., 2001, Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder, *Inflammatory Bowel Disorder*, 7: 136-145pp.

Eckburg, P.B., and Bik, E.M., 2005, Diversity of the human intestinal microbial flora, *Journal of Science*, 308:1635p.

Ewaschuk, J.B. and Dieleman, L.A., 2006, Probiotics and prebiotics in choronic inflammatory bowel diseases, *World Journal of Gastroenterology*, 12:5941-5950pp.

Fukui, Y., Maruyama, T., Iwamatsu, Y., Fujii, A., Tanaka, T., Ohmukai, Y. and Matsuyama H., 2010, Preparation of monodispersed polyelectrolyte microcapsules with high encapsulation efficiency by an electrospray technique, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 370: 28–34pp.

Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. and Ross, R.P., 1999, Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strains to the gastrointestinal tract, *Journal of Dairy Science*, 7: 1379–1387pp.

Gibson, G.R., 1998, Dietary modulation of the human gut microflora using probiotics, *British Journal of Nutrition*, 80:209-212pp.

Gilliand, E. 1989, Acidophilus milk products a review of potential benefits to consumers, *Journal Dairy Science*, 72:2483-2494pp.

KAYNAKLAR DiZiNi (DEVAM)

Gomes, A. M. P., Silva, M. L. P. C. and Malcata, F. X., 1998, Caprine Cheese With Probiotic Starins: The Effect of Ripening Temperature and Relative Humidity on Proteolysis and Lypolysis, *Z. Lebensm Unters Forsch*, 207: 386-394pp.

Guarner, F. and Schaafsma G.J. 2005, Effects of *Lactobacillus* spp. Cheddar cheese fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 41: 337–342pp.

Guerin-Dannan, C., Chabenet, C., Pedone, C. and Popot, F., 1998, Milk fermented with yogurt cultures and *L. casei* compared with yogurt and gelled milk influence on intestinal microflora in healthy infants, *Journal of Clinical Nutritional*, 67:111-117pp.

Henriksson, A. and Conway, P., 2001, Isolation of human faecal bifidobacteria which reduce signs of *Salmonella* spp. infection when orogastrically dosed to mice, *Journal of Applied Microbiology*, 90:223-228pp.

Heyman, M. and Menard, S., 2002, Probiotic microorganisms how they affect intestinal patophysiology, *Cell Molecular Life Science*, 59:1151.

Iyer, C. and Kailasapathy, K., 2005, Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics in increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt, *Journal of Food Science* 70: 18–23pp.

Kailasapathy, K., 2002, Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and Potential Applications, *Current Issue Intested Microbiology*, 3:39-48pp.

Kailasapathy, K., 2006, Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yogurt, *LWT*, 39:1221-1227pp.

KAYNAKLAR DiZiNi (DEVAM)

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H., 2004, The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survival of microencapsulated probiotic bacteria, *International Dairy Journal*, 18:737-743pp.

Lankaputhra, W.E.V. and Shah, N.P., 1995, Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in the presence of acid and bile salts, *Culture Dairy Products Journal*, 30: 2-7pp.

Laurens-Hattinh, A. and Viljoen, B.C., 2001, Yogurt as probiotic carrier food, *International Dairy Journal*, 11:1-17pp.

Leandro, E.S., Araujo, E.A., Conceição, L.L., Moraes, C.A. and Carvalho A.F., 2013, Survival of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 in ice cream produced with different fat levels and after submission to stress acid and bile salts, *Journal of Functional Foods*, 503-507pp.

Lee, Y.K. and Salminen, S., 1995, The coming age of prebiotics, *Trends Food Science and Technology*, 6: 241-245pp..

Lopez-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., and Lagaron, J.M., 2012, Electrospinning as a useful technique for encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids, *Food Hydrocolloides*, 28:159-167pp.

Madkor, S. A., Tong, P. S. and El Soda, M. 2000, Ripening of Cheddar Cheese With Added Attenuated Adjunct Cultures of Lactobacilli, *J. Dairy Sci*, 83: 1684-1691pp.

Madureira, A.R., Soares J.C., Soares, J.C., Pintado, M.E., Gomes, A.M.P., Freitas, A.C. and Malcata, X., 2015, Effects of the incorporation of salted additives on probiotic whey cheeses, *Food Bioscience*, 10:8-17pp.

Mandal, S., Puniya A.K. and Singh, K., 2006, Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16: 1190-1195pp.

KAYNAKLAR DiZiNi (DEVAM)

Mohammadi, R., Sohrabvandi, S. and Mohammad, A., 2012, The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks, *Eng. Life Science*, (4):1-11pp.

Muthukumarasamy, P. and Holley, R.A., 2007, Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing microencapsulated probiotic lactic acid bacteria, *Food Microbiology*, 24: 82–88pp.

Oliveira, M.E.G., Garcia, E.F., Gomes, A.M.P., Pintado, M.M.E., Madureira, A.R.M.F., Conceicao, M.L. and Souza, E.L., 2014, Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions inhibitory effect against pathogenic bacteria, *Food Research International*, 64:241-247pp.

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. and Salminen, S., 2002, Probiotics: mechanisms and established effects, *International Dairy Journal*, 9:43-52pp.

Özden, A., 2005, Gastrointestinal sistem ve prebiyotik, sinbiyotik, *Güncel Gastroenteroloji*, 9:124-130s.

Özer, B., Kırmacı, H.A., Senel, E., Atamer, M. and Hayaloglu, A., 2009, Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation, *International Dairy Journal* 19: 22-29pp.

Özer, D. ve Akın, M.S., 2000, Probiyotik fermente süt ürünleri ve probiyotikler, VI. Süt ve Süt Ürünleri Senpozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve katkı maddeler) 273-278ss.

Papagianni, M. and Anastasiadou, S., 2009, Encapsulation of *Pediococcus acidilactici* cells in corn and olive oil microcapsules emulsified by peptides and stabilized with xanthan in oil-in-water emulsions: studies on cell viability under gastrointestinal simulating conditions, *Enzyme Microbiology Technology*, 45:514–522pp.

KAYNAKLAR DiZiNi (DEVAM)

Payne, S., Gibson, G., Wynne, A., Hudspith, B., Brostoff, J. and Tuohy, K., 2003, In-vitro studies on colonization resistance of the human gut microbiota to *Candida albicans* and the effects of tetracycline and *Lactobacillus plantarum*, *Food Microbial Sciences*, 4:1-8pp.

Penders, J., Thijs, C. and Vink, C., 2006, Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy, *Pediatrics*, 118: 51-210s.

Ramirez-Farias, C., Slezak, K. and Fuller, Z., 2009, Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*, *Journal of Science*, 101: 500-541pp.

Ranadheera, C.S., Evans, C.A., Adams, M.C., and Baines, S.K., 2013, Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on production quality, *Small Ruminant Research*, 122:174-180pp.

Reddy, B. 1999, Possible mechanisms by which pro and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth, *Journal Nutritional*, 129:1478-1482pp.

Roberfroid, MB., 2000, Prebiotics and probiotics, *American Journal of Clinical Nutritional*, 71:162-168pp.

Rokka, S., and Rantamaki, P. 2010, Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications, *European Food Research and Technology*, 231: 1-12pp.

Ross, S., Aleljung, P., Robert, N., Lee, B., Wadstrom, T., Lindberg, M. and Jonsson, H., 1996, A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter system, *FEMS Microbiology Letters*, 144: 33-38pp.

KAYNAKLAR DiZiNi (DEVAM)

Sanders, M.E. and Veld, J.H., 1999, Bringing a probioticcontaining functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues, *Antonie van Leeenhoek*, 76: 293-315pp.

Sandoval-Castillaa, O., Lobato-Callerosb, C., García-Galindoc, H.S., Alvarez-Ramírezd, J. and Vernon-Carter A.J., 2010, Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *L. caseii* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *Food Research International*, 43(1):111–117pp.

Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. and Desiere, F., 2002, The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract, *National Academy of Sciences of the United States of Ameraca*, 22:144-157pp.

Schrezenmeier, J. and De Vrese, M., 2001, Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2: 361-364pp.

Sendra, E., Fayos, P., Lario,Y., Fernandez-Lopez, J. and Perez-Alvarez J.A., 2008, Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiol*, 25(1):13-21pp.

Shahani, K.M. and Ayebo, A.D., 1980, Role of dietary *Lactobacilli* spp. in gastrointestinal microecology, *American Journal of Clinical Nutrition*, 33:2448-2457pp.

Sheu, T.Y. and Marshall, R.T., 1993, Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels, *J. Food Sci.* 58: 557-561pp.

Silva, P.D.L., Bezerra, M.F., Santos, K.M.O. and Corriea, R.T.P., 2015, Potentially probiotic ice cream from goat's milk:Characterization and cell viability during processing storage and simulated gastrointestinal conditions, *Food Science and Technology*, 62:452-457pp.

KAYNAKLAR DiZiNi (DEVAM)

Singh, J., Riveson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N. and Reddy, B.S., 1997, *Bifidobacterium longum*, a lactic acid producing intestinal bacterium, inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 18: 833–841pp.

Soccol, C.R., Vandenberghe, L. P.S., Spier, M.R., Medeiros, A.B.P., Yamaguishi, C.T., Lindner, J.D., Pandey, A. and Thomaz-Soccol, V., 2010, The Potential of Probiotics, *Food Technol. Biotechnology*, 48 (4):413–434pp.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K., 2000, Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *International Journal of Food Microbiology*, 62: 47- 55pp.

Şeker, P., ve Patır, B., 2011, Kısa ve uzun ömürlü ayranlarda potasyum sorbat uygulamasının kimyasal ve duyusal kaliteye etkisi, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Dergisi*, 25 (2): 71-81ss.

Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W. and Gibson, G.R., 2003, Using probiotics and prebiotics to improve gut health, *Drug Discov.*, 8: 692-700pp.

Üstün, Ö., ve Gökçe, R., 2005, Yurtdışında Üretilen Fermente Süt İçecekleri, Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, *Gıda Mühendisleri Dergisi*, 24-29s.

Vasquez, A., Jakobsson, T., Ahrne, S., Forsum, U. and Molin, G., 2002, Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women, *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8):2746–2749pp.

KAYNAKLAR DiZiNi (DEVAM)

Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J. A, 2000, Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco cheese, *J. Dairy Sci.* 83: 1905- 1911pp.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998, Prokaryotes: the unseen majority, *International Journal of Microbiology*, 95:78-83pp.

Xie, J. and Wang, C-H., 2007, Electrospray in the dripping mode for cell microencapsulation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 312:247-255pp.

Yaygın, H., 1995, Kefir ve özellikleri, III. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Ankara, 1994:246-256s.

Yerlikaya, O. And Ozer, E., 2014, Production of probiotic fresh White cheese using co-culture with *Streptococcus thermophilus*, *Food Science and Technology*, 34(3):471-477pp.

Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R. And Boccio, J. 2001, Effects of probiotics and functional foods and their use in different diseases, *Nutrition Res.*, 21: 569-578pp.

ÖZGEÇMİŞ

Elif TİPİGİL, Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olup 10 Mart 1986 yılında Erzurum’da doğmuştur. Lise eğitimini Uşak Üftade Lisesinde tamamlamıştır. 2008 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümünde lisans eğitimine başlamış ve 2013 yılında lisans eğitimini tamamlamıştır. 2013 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.