



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

L. PARACASEİ'NİN ENKAPSÜLASYONU VE
İNSTANT TOZ ÇİKOLATALI İÇECEK ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OSMAN YILMAZ

ŞUBAT

OSMAN YILMAZ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2022

***L. PARACASEI*'NİN ENKAPSÜLASYONU VE
İNSTANT TOZ ÇİKOLATALI İÇECEK ÜRETİMİ**

Osman YILMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Şirin OBA İLTER

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2022

Yüksek Lisans Tezi Kabul ve Onay Sayfası

Osman YILMAZ tarafından hazırlanan “*L. paracasei*’nin Enkapsülasyonu ve İntant Toz Çikolatalı İçecek Üretimi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman:Dr. Öğr. Üyesi Şirin OBA İLTER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan : Prof. Dr. Nevzat KONAR

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye : Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 11/02/2022

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç.Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasını, beni sürekli destekleyen çok değerli aileme ithaf ediyorum...

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

(İmza)

Osman YILMAZ

11/02/2022

L. PARACASEI'NİN ENKAPSÜLASYONU VE INSTANT TOZ ÇİKOLATALI İÇECEK ÜRETİMİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Osman YILMAZ

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2022

ÖZET

Bu çalışmada farklı enkapsülasyon duvar malzemelerinin optimum formül kombinasyonlarının belirlenmesi ile *Lactobacillus paracasei*'nin dondurarak kurutma yöntemi ile mikroenkapsüle edilmesi ve elde edilen bu mikrokapsüllerin prebiyotik bileşenleri optimize edilen toz çikolatalı içecek formülüne ilavesi ile canlılık düzeyi araştırılmıştır. Tez çalışmasının ilk aşamasında Yanıt Yüzey Metodu'nun merkezi karmaşık tasarımı kullanılarak enkapsülasyon duvar materyali sodyum aljinat (X1, %1-5), inülin (X2, %1-7), kitosan (X3, %0,5-2) ve kalsiyum karbonat (X4, %0,5-1,5) bağımsız değişken olacak şekilde belirlenmiştir. Optimizasyon yanıtları olarak enkapsülasyon etkinliği (%), simüle mide suyunda (SGJ) kapsüllenmiş bakterilerin canlılık düzeyi (%) ve simüle safra çözeltisinde bakterilerin canlılık düzeyi (%), ısı toleransı verileri kabul edilmiştir. Deney sonuçlarına göre, enkapsüle edilen *L. paracasei* için %3,125 sodyum aljinat, %5,503 inülin, %1,001 kitosan, %1,457 kalsiyum karbonat ile kapsüle edilmiş bakteri örneklerinin en uygun model olduğu tespit edilmiştir. Optimum noktaya ait enkapsülasyon etkinliği, mide sıvısı toleransı ve safra sıvısı toleransı verileri sırasıyla $90 \pm 0,23$; $0,4 \pm 0,00$ ve $3,9 \pm 0,56$ olarak bulunmuş ve sonuçlar doğrulanmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında çikolatalı toz karışımının kıvam artırıcı bileşenlerinin prebiyotik bileşenlerle ikamesinin ürün kalitesinde oluşturduğu etkiler araştırılmıştır. Araştırma kapsamında inülin (X1;0-1), poli-dekstrozu (X2;0-1) ve maltodekstrin (X3;0-1) kullanılarak üç bileşenli simple-mixture tasarımı $X1 + X2 + X3 = 1$ olacak şekilde geliştirilmiştir. Oluşturulan formülasyonların kütle yoğunluğu analizi sonuçları değerlendirildiğinde Hausner oranları (HO), Carr indeksi (CI) değerleri belirlenmiş ve sırasıyla $1,3 \pm 0,00$ - $1,39 \pm 0,03$ ile $22,25 \pm 1,16$ - $28,18 \pm 1,92$ aralığında tespit edilmiştir. Optimum prebiyotik toz kakaolu içecek formülasyonuna enkapsüle *L. paracasei* ilave edilmiş ve 70°C'de 2 dk süreyle ısıya maruz kalan ve daha sonra gastroentestinal asit, enzim şartlarına maruz kalması ile enkapsüle bakterilerin sayısı 5.10^5 olarak belirlenmiştir ve böylece prebiyotik probiyotik toz kakaolu içecek üretimi sağlanabileceği gösterilmiştir.

Sayfa Adedi : 146

Anahtar Kelimeler : Enkapsülasyon, Optimizasyon, Toz İçecek, *L. paracasei*

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Şirin OBA İLTER

L. PARACASEI'S ENCAPSULATION AND
INSTANTS PRODUCTION OF CHOCOLATE POWDER BEVERAGE
(M. Sc. Thesis)

Osman YILMAZ

AMASYA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
January 2022

ABSTRACT

In this study, the viability of *Lactobacillus paracasei* was investigated by determining the optimal formulation combinations of the different encapsulation wall materials for microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by freeze-drying. The ratio and viability of capsule *L. paracasei* to prebiotic powdered cocoa beverages were investigated. In the first phase of the dissertation, using the central complex design of the response surface method, sodium alginate (X1, 1-5%), inulin (X2, 1-7%), chitosan (X3, 0.5-2%), and calcium carbonate (X4, 0.5-1.5%) was the independent variable. Encapsulation efficiency (%), the viability of encapsulated bacteria in simulated gastric juice (SGJ), and viability of bacteria in simulated bile solution (%) and heat tolerance data were accepted as optimization responses. According to the experimental results, the bacterial samples encapsulated with 3.125% sodium alginate, 5.503% inulin, 1.001% chitosan, and 1.457% calcium carbonate were the most suitable model for encapsulated *L. paracasei*. Encapsulation efficiency, gastric fluid tolerance and bile fluid tolerance data of the optimum point were determined as 90 ± 0.23 , $0.4 \pm 0.00\%$ and $3.9 \pm 0.56\%$, respectively, and the results were confirmed. In the second phase of the study, the effects of replacing the thickening components of the chocolate powder mixture with prebiotic components on product quality were investigated. In the study, a simple mixture design was developed with three components (inulin, polydextrose, and maltodextrin) whose sum would equal one. The Hausner ratios (HO) and Carr index (CI) of the formulations were determined, and values of 1.3 ± 0.00 - 1.39 ± 0.03 and 22.25 ± 1.16 - $28.18 \pm$ were obtained, respectively. It was found to be in the range of 1.92. Encapsulated *L. paracasei* were added to the optimal prebiotic powder cocoa beverage formulation. The number of encapsulated bacteria was determined to be 5,105 after exposure to gastric acid and enzymes for 2 minutes at 70°C and demonstrated that prebiotic probiotic cocoa powder beverages are possible.

Number of pages : 146

Keywords : Encapsulation, Optimization, Powder Beverage, *L. Paracasei*

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Şirin OBA İLTER

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez konusunu bana layık gören, çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, beni yönlendiren ve çalışmalarım sırasında bana zaman ayırarak desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Şirin OBA İLTER'e teşekkürü borç bilirim. Ayrıca tez dönemi boyunca benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim annem, babam, kardeşlerim ve Amasya Üniversitesi MAULAB çalışanlarına teşekkür ederim. Bu tez çalışması FMB-BAP 19-0425 Proje No'su ile Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ.....	xvi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. <i>Lactobacillus Paracasei</i>	5
2.2. Enkapsülasyon Teknolojisi	7
2.3. Probiyotik Hücrelerinin Ekpasülasyonunda Kullanılan Kaplama Materyalleri ...	8
2.3.1. Aljinat	10
2.3.2. Oligosakkaritler.....	11
2.3.3. Lipidler.....	12
2.3.4. Proteinler.....	12
2.3.5. Kitosan	12
2.4. Enkapsülasyon Yöntemleri	17
2.4.1. Püskürtmeyle kurutma	19
2.4.2. Ekstrüzyon	20
2.4.3. Emülsiyon	21
2.4.4 Püskürtmeli dondurarak kurutma.....	22
2.4.5. Dondurarak kurutma	23

	Sayfa
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1 Materyal	27
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1 Kültür aktivasyonu.....	27
3.2.2 Probiyotik mikroorganizmanın hazırlanması.....	28
3.2.3 <i>L. paracasei</i> 'nin enkapsülasyonu.....	28
3.2.4 Dondurarak kurutma enkapsülasyon yöntemi	29
3.2.5 <i>L. paracasei</i> 'nin enkapsülasyon kaplama materyallerinin optimize edilmesi.	31
3.2.6 Enkapsülasyon etkinliği.....	33
3.2.7 Serbest ve kapsüllenmiş <i>L. paracasei</i> 'nin ısı toleransı	33
3.2.8 Serbest ve kapsüllenmiş <i>L. paracasei</i> 'nin düşük pH stabilitesi.....	33
3.2.9 Simüle mide suyunda serbest ve kapsüllü bakterilerin canlılık düzeyi	34
3.2.10 Simüle safra tuzun çözeltisinde serbest ve kapsüllü bakterilerin canlılık düzeyi	34
3.2.11. Nem miktarı	35
3.2.12 Renk tayini	35
3.2.13. SEM (Taramalı elektron mikroskobu).....	35
3.3 Toz Prebiyotik Çikolata Karışımının Hazırlanması.....	35
3.3.1. Toz prebiyotik çikolata karışımının deney tasarımı ve optimizasyonu	36
3.3.2 Probiyotik çikolata karışımı üretimi	39
3.4 Toz İçecek Analizleri.....	39
3.4.1. Toz içecek örneklerinde pH tayini.....	39
3.4.2. Toz içecek örneklerinde su aktivitesi tayini.....	39
3.4.3. Toz içecek örneklerinin ıslanma süresi tayini.....	40
3.4.4. Toz içecek örneklerinde suda çözünür kuru madde tayini.....	40

	Sayfa
3.4.5. Toz içecek örneklerinde çözünmeyen bileşim oranının belirlenmesi.....	40
3.4.6. Toz içecek örneklerinde yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk, carr indeks ve hausner oranı belirlenmesi	40
3.4.7. Toz içecek örneklerinde su tutma ve suda çözünürlük özellikleri.....	41
3.4.8. Toz içecek örneklerinde renk analizi	42
3.4.9. Toz içecek örneklerinde duyu analizi	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Enkapsüle <i>L. paracasei</i> Örneklerinin Su Aktivitesi ve Kuru Madde Özellikleri ..	44
4.2. Enkapsüle <i>L. paracasei</i> Örneklerinin Renk Özellikleri.....	46
4.3. <i>L. Paracasei</i> Enkapsülasyon Kaplama Materyallerinin Optimize Edilmesi	47
4.3.1. Enkapsülasyon etkinliği	48
4.3.2. Simüle mide suyunda serbest ve kapsüllü bakterilerin canlılık düzeyi	55
4.3.3. Serbest ve kapsüllü bakterilerin pH toleransı	62
4.3.4. Simüle safra tuzun çözeltisinde serbest ve kapsüllü bakterilerin canlılık düzeyi.....	67
4.3.5 Serbest ve kapsüllü bakterilerin ısı toleransı	73
4.3.6. SEM (Taramalı elektron mikroskobu).....	78
4.3.7. Optimize formülasyonla üretilen enkapsüle bakteri örneklerinin analiz sonuçları.....	83
4.4. Toz İçeceklerin Prebiyotik Bileşen Oranlarının Optimize Edilmesi	85
4.4.1. Toz içeceklerin pH ve su aktivitesi.....	85
4.4.2 Toz İçeceklerin örneklerinin briks, çözünürlük ve su tutma kapasitesi.....	90
4.4.3. Toz İçeceklerin örneklerinin ıslanma süresi	96
4.4.4. Toz içecek örneklerinde kütle yoğunluk, Carr İndeks ve Hausner Oranı...	100
4.4.5 Toz İçeceklerin örneklerinin renk özellikleri.....	106
4.4.6. Toz İçeceklerin örneklerinin duyu özellikleri	111

	Sayfa
4.4.8. Toz İçeceklerin rneklerinin optimum formülasyonu	119
4.5. Toz İçeceklerin örneklerine <i>L. Paracasei</i> İlavesi Ve Canlılık Düzeyi	120
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	122
KAYNAKLAR	124
ÖZGEÇMİŞ	146



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kapsülleme malzemeleri ve LAB'yi kapsüllemek için kullanılan yöntemler	9
Çizelge 2.2. Probiyotik bakterilerinin enkapsülasyon metodları ve etkileri	18
Çizelge 2.3. Dondurarak kurutma ile kapsüle edilmiş probiyotiklerin simüle gastrointestinal koşullarının canlılığı üzerindeki etkisi	25
Çizelge 3.1. Bağımsız değişkenlerin aralık ve seviyelerinin kod ve aktüel değerleri	31
Çizelge 3.2. Enkapsülasyon kaplama materyali ve aktüel değerleri	32
Çizelge 3.3. Prebiyotik kakaolu içecek formülasyonu	36
Çizelge 3.4. Bağımsız değişkenlerin kod ve gerçek değerleri	37
Çizelge 3.5. Duyusal değerlendirme formu	42
Çizelge 3.6. Kakaolu içeceklerde duyusal özelliklerin tanımlamaları	43
Çizelge 4.1 Enkapsülasüle edilmiş <i>L.paracasei</i> probiyotik bakterisinin kuru madde, su aktivitesi değerleri	45
Çizelge 4.2 Enkapsülasüle edilmiş <i>L.paracasei</i> probiyotik bakterisinin renk özellikleri	47
Çizelge 4.3. Enkapsüle edilmiş <i>L. paracasei</i> bakterisinin enkapsülasyon etkinlik değerleri	49
Çizelge 4.4. Enkapsülasyon duvar malzemelerinin <i>L.paracasei</i> 'nin enkapsülasyon etkinliğine etkisinin varyans analiz sonuçları	51
Çizelge 4.5. Enkapsülasyon kaplama materyallerinin farklı zamanlarda simüle mide sıvısına maruz kalmış kapsüllü <i>L. paracasei</i> 'nin canlılık düzeyi değerleri (%)	56
Çizelge 4.6. Enkapsülasyon duvar malzemelerinin simüle mide suyuna maruz kalmış kapsüllü <i>L.paracasei</i> canlılık düzeyine etkisinin varyans analiz sonuçları	57
Çizelge 4.7. Enkapsülasyon kaplama materyallerinin pH 2,0'de 60 dakikaya maruz kalmış kapsüllü <i>L.paracasei</i> 'nin canlılık düzeyi değerleri (%)	62

Sayfa

Çizelge 4.8. Enkapsülasyon kaplama materyallerinin pH 2,0'de 60 dakikaya maruz kalmış kapsüllü <i>L.paracasei</i> 'nin canlılık düzeyine etkisinin varyans analiz sonuçları	64
Çizelge 4.9. Enkapsülasyon kaplama materyallerinin simule safra tuzu çözeltisine maruz kalmış <i>L.paracasei</i> canlılık düzeyi değerleri (%).....	68
Çizelge 4.10. Enkapsülasyon duvar malzemelerinin <i>L.paracasei</i> simule safra tuzu çözeltisinde canlılık düzeyi üzerine etkisinin varyans analiz sonuçları ..	69
Çizelge 4.11. Enkapsüle edilmiş <i>L. paracasei</i> bakterisinin 70°C 90 saniyede maruziyeti sonunda canlılık düzeyi değerleri.....	73
Çizelge 4.12. Enkapsülasyon duvar malzemelerinin <i>L.paracasei</i> 70°C 90 saniyede maruziyeti sonunda canlılık düzeyinin üzerine etkisinin varyans analiz sonuçları	75
Çizelge 4.13. Genel optimum duvar malzemelerinin seviyesinin belirlemesi.....	83
Çizelge 4.14. Doğrulama deneyinde tahmini değerler (%) tablosu	83
Çizelge 4.15. Toz içeceklerin pH ve su aktivitesi değerleri	86
Çizelge 4.16. Toz içeceklerin su aktivitesi değerleri için varyans analiz sonuçları	88
Çizelge 4.17. Toz içeceklerin çözünür kuru madde, çözünürlük, su tutma kapasitesi değerleri.....	91
Çizelge 4.18. Toz içeceklerin çözünür kuru madde, çözünürlük ve su tutma kapasitesi değerleri için varyans analiz sonuçları	92
Çizelge 4.19. Toz içeceklerin ıslatma süresi değerleri	97
Çizelge 4.20. Toz içeceklerin ıslanma süresi değerleri için varyans analiz sonuçları...	98
Çizelge 4.21. Toz içeceklerin kütle yoğunluğu, HO ve CI değerleri.....	101
Çizelge 4.22. Toz içeceklerin kütle yoğunluğu ve CI değerleri için varyans analiz sonuçları.....	102
Çizelge 4.23. Toz içeceklerin L, a* ve b* değerleri	107
Çizelge 4.24. Toz içeceklerin L, a* ve b* değerleri için varyans analiz sonuçları.....	108
Çizelge 4.25. Toz içeceklerin duyu özelliklerinin değerleri.....	111
Çizelge 4.26. Toz içeceklerin duyu özelliklerinin değerleri (Devamı)	112

Sayfa

Çizelge 4.27. Toz içeceklerin asılı parçacıklar, renk, kıvam, kremsilik, bitter, tatlılık, dengeli ve genel beğeni özellikleri üzerine etkisi	113
Çizelge 4.28. Toz içeceklerin asılı parçacıklar, renk, kıvam, kremsilik, bitter, tatlılık, dengeli ve genel beğeni özellikleri üzerine etkisi (Devamı)	114
Çizelge 4.29. Simüle edilmiş gastrointestinal koşulların her adımında toz içeceklerin içerisine ilave edilmiş enkapsüle <i>Lactobacillus paracasei</i> 'nin canlı sayısı (kob/g)	120



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kitosanın kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.2. Sinbiyotik mikroenkapsülasyonunun şematik gösterimi	15
Şekil 2.3. Püskürtmeyle kurutma yöntemi	20
Şekil 2.4. Ekstrüzyon işlemi	21
Şekil 2.5. Emülsiyon işlemi	22
Şekil 2.6. Enkapsülasyon süreçleri şematik gösterimi	24
Şekil 3.1. Enkapsülasyon prosedürü	29
Şekil 3.2. Anında çözünür çikolata üretimi	39
Şekil 4.1. Enkapsülasyon etkinliği üzerinde faktörlerin interaksiyon etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyler.....	54
Şekil 4.2. Simüle mide suyuna maruz kalmış kapsüllü <i>L.paracasei</i> 'nin canlılık düzeyi üzerinde faktörlerin interaksiyon etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyler.....	61
Şekil 4.3. pH toleransı üzerinde faktörlerin interaksiyon etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyler	66
Şekil 4.4. <i>L.paracasei</i> simüle safra tuzu çözeltisinde canlılık düzeyi üzerinde faktörlerin interaksiyon etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyler	72
Şekil 4.5. <i>L.paracasei</i> 70°C 90 saniyede maruziyeti sonunda canlılık düzeyi üzerinde faktörlerin interaksiton etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyler.....	77
Şekil 4.6 Enkapsüle bakterilerin deneysel analizlerinin optimum sonuç noktaları	84
Şekil 4.7. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin su aktivitesi değerleri üzerindeki etkisi.....	90
Şekil 4.8. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin briks değerleri üzerindeki etkisi	95
Şekil 4.9. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin çözünürlük üzerindeki etkisi	95

	Sayfa
Şekil 4.10. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin su tutma kapasitesi üzerindeki etkisi.....	95
Şekil 4.11. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin ıslanma süreleri üzerindeki etkisi.....	100
Şekil 4.12. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin kütle yoğunluğu üzerindeki etkisi	105
Şekil 4.13. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin CI grafiği	105
Şekil 4.14. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin L üzerindeki etkisi.....	110
Şekil 4.15. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin b* üzerindeki etkisi	110
Şekil 4.16. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin a* üzerindeki etkisi	110
Şekil.4.17. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin duysal özelliklerine etkisi.....	115
Şekil 4.18. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin kremşi yapı üzerindeki etkisi	116
Şekil 4.19. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin renk üzerindeki etkisi	117
Şekil 4.20. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin kıvam üzerindeki etkisi	117
Şekil 4.21. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin bitter tat üzerindeki etkisi	117
Şekil 4.22. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin tatlılık üzerindeki etkisi	118
Şekil 4.23. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin asılı parçacıklar kapasitesi üzerindeki etkisi.....	118
Şekil 4.24. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin genel beğeni üzerindeki etkisi	118
Şekil 4.25. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin düzeylerinin optimizasyonu için yanıt olarak duysal analiz sonucu belirlenen genel beğeni üzerine etkisi..	119

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Lactobacillus paracasei</i> MK1'in ($\times 30.000$) taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	6
Resim 3.1. Enkapsüle bakteri son ürünleri	30
Resim 3.2. Toz prebiyotik kakaolu içecek fotoğrafları.....	38
Resim 4.1. Enkapsüle bakterilerin SEM görüntüleri	82



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmaların açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
CH ₂ OH	glukonik asit
O	oksijen
NH ₂	amin
Ca	kalsiyum
Ba	baryum
Sr	stronsiyum
CaCl ₂	kalsiyum klorür
HCL	hidroklorik asit
ζ	zeta potansiyeli

Kısaltmalar	Açıklama
MFC	Mikrobiyal Gıda Kültürleri
E401	Sodyum Aljinat
E404	Kalsiyum Aljinat
GRAS	Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen Gıda
Mbar	Milibar
LAB	Laktik Asit Bakterisi
CFU	Koloni Oluşturma Birimi
RMS	Tepki Yüzeyleri Metodolojisi

SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
GOS	Galaktooligosakkarit
HR	Hausner Oranı
CL	Carr İndeksi
HLC	Yüksek Işık Telafisi



1. GİRİŞ

Probiyotik mikroorganizmalar uygun dozlarda tüketildikleri takdirde konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (Lilly ve Stillwell 1965; FAO 2002; Martinez, Bedani, ve Saad, 2015; Sanders ve diğerleri, 2013; Aureli ve diğerleri, 2011). Probiyotik mikroorganizmalar vücuda alındığında ağızda, sindirim sisteminde, üst solunum yollarında ve ürogenital sistemde canlılıklarını koruyarak bağırsaklara ulaşp, bağırsaklarda gelişim sağlayarak bağırsak çeperlerinde biyolojik etki gösteren mikroorganizma kültürleridir (Angelis ve Gobbetti 2004). Canlı bakteri sayısının vücutta istenen sağlık parametrelerine etki etmesi için belirli bir düzeyin üzerinde olması ve depolama sırasında canlılıklarını koruması gerekmektedir. Probiyotik kültürün, ürün içerisinde minimum miktarının 10^6 - 10^7 cfu/ml olması gerekmektedir (FAO/WHO 2007; Kneifel ve Salminen, 2011; Plessas ve diğerleri, 2012). Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. Probiyotiklerin büyük bir kısmı insan gastrointestinal mikroflorasının önemli bir parçası olan, zararlı özellik taşımayan laktik asit bakterileri olarak tanımlanmış bir bakteri grubuna dâhildir (Zielińska ve Kolożyn-Krajewska 2018).

Çalışma kapsamında laktik asit bakterileri içerisinde seçilen *Lactobacillus paracasei* genellikle insan bağırsak yolu, süt ürünleri ve bitki materyali gibi doğal habitatlarda bulunurken, fonksiyonel gıda üretiminde ve (Mantzouraniet ve diğerleri, 2019; Terpou ve diğerleri, 2018) probiyotik ürünlerde yaygın olarak kullanılan gram pozitif, fakültatif olarak heterofermentatif bir laktik asit bakterisi türüdür. *L. paracasei* hücreleri tipik olarak 2.0 ila 4.0 µm genişliğinde ve 0.8 ila 1.0µm uzunluğunda çubuk şeklinde (basil şekli), hareketsiz bir bakteridir. *L. paracasei*, 10 ile 37°C arasındaki bir sıcaklıkta optimum şekilde büyür (Rogan ve diğerleri, 1988; Kinoshita ve diğerleri, 2007). Organizma maksimum 40°C sıcaklıkta yaklaşık 40 saniye hayatta kalabilir. (Wu ve diğerleri, 2009). *L. paracasei*'nin fermentatif özelliklerinden dolayı biyolojik gıda, diyet takviyeleri ve tıbbi bozuklukları tedavi için gastrointestinal sistemde kullanılmasına izin verir (Felten ve diğerleri, 1999). *L. paracasei*'nin sağlık üzerinde pek çok olumlu etkisi tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda *L. paracasei* bakterisi türünün 3-36 ay arasında çocukların diyetine eklendiğinde ishalin düzelme oranını artırmış, ishal süresi ve dışkı çıktıların sayısını azaltmıştır (Passariello ve diğerleri, 2012; Sarker ve diğerleri, 2005; Andriulli ve diğerleri, 2008; Grossi ve diğerleri, 2010). Bir başka çalışmada semptomatik divertikülitte karın ağrısını azalttığı (Annibale ve diğerleri, 2011; Lahner ve

diğerleri, 2012) akut gastroenterit semptomlarının iyileştirildiği (Passariello ve diğerleri, 2012), obezite gibi çeşitli sağlık sorunlarının klinik çalışmalarında ise triasilgliserol seviyelerinin düşürüldüğü (Jones, 2017) ve kronik yorgunluk sendromu tanısı konulmuş 15 hastada *L. paracasei* ve *L. acidophilus* NCFB 1748 ve *B. lactis* Bb12 bakterilerinin tüketilmesi ile genel semptomlarda ve yaşam kalitesi üzerinde iyileşme eğilimi ile nörokognitif fonksiyonların iyileştirdiği (Sullivan, Nord ve Evengard 2009) mod-geç bağırsak bağışıklığı, iltihap ve antijen toleransını, sitokin seviyelerini ve yapışma mekanizmalarını etkileme yeteneğini iyileştirdiği tespit edilmiştir (Rousseaux ve diğerleri ,2007).

Önemli sağlık yararı sağlayan probiyotikler asidik ortam, oksijen ve antimikrobiyal bileşiklerin varlığı gibi çeşitli faktörlere karşı hassas olduklarından bu mikroorganizmalarla fonksiyonel ürünlerin üretimi ve canlılıklarının garanti edilmesi hiç kolay değildir (Champagne ve Kailasapathy, 2008; Zuidam ve Nedovic 2010). Probiyotiklere atfedilen terapötik özelliklerin devam etmesi ve tüketimi için bazı problemler mevcuttur. Bunlar; (i) gıda işleme ve depolama koşulları (ph, sıcaklık, oksidasyon, ozmotik basınç...), (ii) gastrointestinal sistem (yüksek asitlik, sindirim enzimleri, safra tuzu...) ve (iii) kolonda kolonizasyondur (Tripathi ve Giri, 2014; Holkem ve diğerleri, 2016; Li ve diğerleri, 2019). Enkapsülasyon teknolojisinin bu problemlerin üstesinden gelmek için umut verici bir yaklaşım olduğu kanıtlanmıştır (Feng ve diğerleri, 2020). Enkapsülasyon teknolojisinde önemli iki parametreden ilki kapsülün hazırlanması için kapsülleyici malzemeler sistemi ve kapsülleme tekniğidir (Robin ve Sankhla 2013).

Enkapsülasyonu sağlamak için kullanılan ajanların bileşimi genellikle mikrokapsüllerin fonksiyonel özelliklerini etkiler (Hegenbart, 1993). Kullanılan enkapsülasyon kaplama materyali kapsülünün işlevselliğini ve probiyotik mikroorganizmanın performansını belirleyen faktördür. Duvar malzemesinin kimyasal yapıları ve monomer zincirlerinin konformasyonu onlara jel oluşturma yeteneği gibi spesifik işlevsellik kazandırır (Renard ve Reddy 2007). Probiyotik kapsülleme için kullanılan en yaygın biyomateryal aljinattır (Krasaekoopt, Bhandari ve Deeth 2003; Anal ve Singh 2007). Diğer destekleyici biyomalzemeler arasında inülin (Gandomi ve diğerleri, 2016), kitosan (Krasaekoopt ve Watcharapoka 2014), selüloz asetat fitalat, keçiboyunuza zankı ve benzeri ürünler bulunmaktadır (Anal ve Singh 2007). Son yıllarda probiyotikler ve prebiyotiklerin kombinasyonu, probiyotik hücrelerin canlılığını arttıran ve insan bağırsaklarındaki büyümelerini destekleyen "sinbiyotik" bir kombinasyon olarak bilinmektedir (Peredo ve diğerleri, 2016). Depolama sırasında probiyotiklerin canlılığını

arttırmak ve sürdürmek için prebiyotikler ile kapsüllemenin birlikte kullanımı yönünde araştırma eğilimleri artmaktadır (Ningtyas ve diğerleri 2019). Uygun biyomalzemenin seçilmesi, titiz bir metodolojik yaklaşım gerektiren bir ön çalışmadır (Lee ve Heo 2000).

Bu çalışmanın amacı, mikroorganizmaların stabilitesinin koruması amacı ile farklı enkapsülasyon kaplama materyallerinin farklı oranlarda kullanımı ile *L. paracasei* probiyotik bakterisinin liyofilizasyon yöntemi kaplanmasını sağlamaktır. Kaplama materyalinin oran ve bileşenlerinin simule gastroentistinal sistmede canlılık düzeyi, pH toleransı ve ısı toleransı üzerindeki etkilerinin belirlenmesidir. Bu çalışma ile Amasya ilinden toplanan çiğ sütlerinden izole edilen *L. paracasei* bakterisinin enkapsülasyon kaplama materyali bileşiminin optimizasyonu ile uygulanan kurutma işleminin etkinliğini incelemek için denemeler gerçekleştirilmiştir.

Lactobacillus paracasei, endüstriyel olarak ilgili laktobasiller sınıfında yer alır ve mikrobiyal gıda kültürleri (MFC) probiyotik olarak kullanılmaktadır (Zotta, Parente ve Ricciardi, 2017). Önceki çalışmalarda, *L. paracasei*'nin yoğurt (Bosnea, Moschakis ve Biliaderis, 2017), et ürünleri (Rahman, Khan, Sohaib, Sahar ve Ishaq, 2016), İspanyol PDO peynir (González ve diğerleri, 2015), fonksiyonel fermente sütler (Patrignani ve diğerleri, 2017), kozmetik krem (Htwe ve diğerleri, 2019), portakal suyu (Soares ve diğerleri, 2019), şeftali suyu (Rodrigues ve diğerleri, 2012), fermente soya yemeği (Mondrago'n-Bernal ve diğerleri, 2017), salata sosu (Mantzouridou ve diğerleri, 2013), soya sütünün (Rani ve Pradeep, 2015) işlevsel özelliklerini iyileştirmek için önerilmiştir. Bu bağlamda, süt ürünü olmayan probiyotik gıdalar arasında içecekler, hazır karışımlar ve içecek tozları gibi hazır ürünlerin küresel olarak tüketicilerin ihtiyaçlarını karşılamak için olağanüstü bir potansiyele sahiptir (Chaturvedi, Khartad ve Chakraborty, 2021). Artırılmış raf ömrü ve hazırlama, toplu taşıma ve nakliye kolaylığı ile probiyotik süt ürünü olmayan hazır içecek tozu, bu yeni ve yenilikçi konseptle gıda endüstrisine hizmet edebilir. Süt ürünü olmayan içecekler arasındaörneğin hazır çikolatalı içeceklerin toz halinde saklanması azaltılmış su aktivitesi nedeniyle hassas mikrobiyal bozulmayı da önlemektedir. Hazır sıcak çikolata içeceklerinin bileşenleri, şeker, kakao tozu, yağsız süt tozu, peynir altı suyu tozu, nişasta, aroma, tuz ve hidrokolloidlerin yanı sıra farklı amaçlarla kullanılan kıvam arttırıcılar, stabilizatörler, jelleştiriciler doku değiştiriciler (Doğan ve diğerleri, 2007) ve kakao partiküllerinin tortulaşmasını önlemek için gıda ürünlerinde kullanılan bileşenler tercih edilmektedir.

Bu çalışma ile kakaolu toz karışımının kıvam artırıcı bileşenlerinin prebiyotik bileşenlerle ikamesi ile yeniden formüle edilen toz içeceğin kapsül *L. paracasei* ilavesi ile probiyotik olarak geliştirilmesine yönelik üretimi sağlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Lactobacillus paracasei*

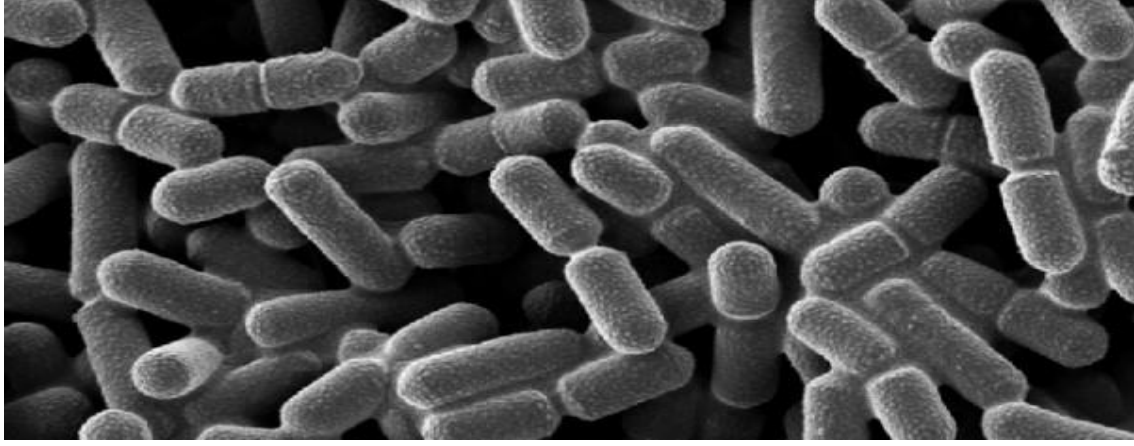
L. paracasei, sırasıyla "Firmicutes" bölümünün, Bacilli sınıfının, *Lactobacillales* takımının ve Lactobacillaceae familyasının bir parçasıdır. *L. casei* veya *L. paracasei* olarak profillendirilen türlerin çoğu aynı türün parçası olduğu bulunmuştur. 1989 yılında *L. paracasei*, DNA homolojisini paylaştığı türleri açıklamak için bir alt tür (*paracasei*) olarak adlandırılmıştır. İsimlerinin bilimsel literatürde birbirinin yerine kullanıldığı gösterilmiştir. 16S RNA homolojisi, bu türler arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır (Colins ve diğerleri, 1989).

Tarihsel olarak, *L. paracasei* ile diğer *Lactobacilli* arasındaki fark biyokimyasal özelliklere dayanmaktadır. *Casei*, *paracasei* ve *ramnosus* arasında yaklaşıklık %90 sekans özdeşliği vardır. Ancak aralarında ayırım yapmak için yaygın olarak kullanılan bazı farklı kriterler bulunmaktadır. Bu farklı kriterler beslenme gereksinimleri ve büyüme ortamını kapsamaktadır. *L. paracasei*'nin diğer *Lactobacillus* spp. bakterilerine göre biraz daha ısıya dayanıklılığı peynir olgunlaşmasında ve yüksek proteolitik aktiviteye sahip olmasına katkı sağlamıştır (Kumar, 2013). *L. paracasei*'nin 34 suşa sahip olduğu bulunmuştur (Smokvina ve diğerleri, 2013). Bu suşlar dünyanın çeşitli ülkelerinden izole edilmiştir. *Lactobacillus paracasei*, genellikle süt ve probiyotik içeren ürünlerde yaygın olarak bulunan bir laktik asit bakteri türüdür. Gram pozitif, fakültatif heterofermentatiftir. *L. paracasei*, genellikle ağız mukozası ve bağırsak florasında kommensalizm bir yaşam sürdürmektedir (Colins ve diğerleri, 1989).

Şimdiye kadar kırka yakın birbirinden farklı *L. paracasei* türü izole edilmiştir. Bu türler süt ürünleri, bitki, insan ve hayvan, mide-bağırsak florasından izole edilmiştir. Fermantasyon profilleri ile diğer *L. paracasei* türlerinden kolaylıkla ayrıştırılabilmektedir (Ward ve Timmins, 1999). Fermantasyon özellikleri diyet, gıda işleme ve takviye gıda olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (Rogan ve diğerleri, 1988).

Lactobacillus paracasei, gram pozitif, fakültatif heterofermentatif, spor oluşturmeyen bir türdür (Hessle, Hanson ve Wold, 1999) Organizma hareketsiz, çubuk şeklinde olup 4.0µm genişliğinde ve 0.8-1.0µm uzunluğuna sahip bir basil grubudur. Resim 2.1.'de gösterildiği

gibi *L. paracasei* hücreleri genellikle kare uçlara sahiptir ve tek formda veya zincirlerde var olabilir (Rogan ve diğerleri, 1988; Colins ve diğerleri, 1989).



Resim 2.1. *Lactobacillus paracasei* MK1'in ($\times 30.000$) taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Lee ve diğerleri, 2013)

L. paracasei'nin genomu dairesel DNA içerir ve izole edilen farklı suşlardan biraz farklılık gösterir. Ortalama olarak genomlar 2,9 ila 3,0 milyon baz çiftidir. %46,2 ile 46,6 arasında bir GC içeriğine sahiptir ve yaklaşık 2800 ila 3100 proteini kodladığı tahmin edilmektedir. Bu suşların genomlarındaki fark, varyant hücre zarfları, sekretuar proteinler ve polisakkaritlerde yatmaktadır. Yaygın olarak kodlanan proteinlerin çoğu, hücreyi apoptoza karşı koruyan hücre yüzeyiyle ilişkili hücre duvarı hidrolazlarıdır. Bu enzimlerin insan epiteline hücreSEL koruma sağladığını göstermiştir (Smokvina ve diğerleri, 2013).

L. paracasei, normal insan bağırsak mikrobiyotasının bir parçasıdır (Molin ve diğerleri, 1993; Makras, Van Acker ve De Vuyst, 2005). *L. paracasei* IMPC2.1, gastrointestinal hücrelerde kemoprofilaktik olabilir (Viazis ve diğerleri, 2012). Gastrointestinal hücreler, hem ısıyla öldürülen hem de canlı IMPC2.1 suşlarından apoptoza ve hücre büyümesine karşı hassas olan hücrelerdir. *L. paracasei* 8700:2, sağlıklı insan gastrointestinal mukozasından ve insan dışkılarından izole edilebilir. Suş 8700:2'nin ayrıca gastrointestinal sistemde yaygın olarak bulunan iki patojen olan *Salmonella enterica* ve *Helicobacter pylori*'yi inhibe ettiği bulunmuştur. Suş 8700:2, oligofruktoz ve inülini parçalarken, her ikisinde de hızla büyür ve son ürün olarak laktik asit üretir (Makras, Van Acker ve De Vuyst, 2005).

L. paracasei de dahil olmak üzere canlı bakteri formülasyonu, ülseratif koliti tedavi etmek için geleneksel tedavilerle kombinasyon halinde kullanılabilir (Ghouri ve diğerleri, 2014). Isı ile öldürülen *Lactobacillus paracasei* D3-5'in hücre duvarından gelen lipoteikoik asit, farelerde yaşlanmaya bağlı sızdıran bağırsakları, iltihabı, fiziksel ve bilişsel işlevleri iyileştirdiği tespit edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2020).

2.2. Enkapsülasyon Teknolojisi

Sağlığı ve zindeliği teşvik ettiği kabul edilen probiyotiklerin patojenik mikroorganizmaların inhibisyonu yoluyla bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesi, anti kanserojen bileşiklerin üretimi, bağışıklık tepkilerinin modülasyonu vb. (Prakash, Tomaro-Duchesneau, Saha ve Cantor, 2011; Reis ve diğerleri, 2017; Markowiak ve Ślizewska, 2017) gibi olumlu etkilerinden dolayı sağlığa faydalı olduğu bilinmektedir. Probiyotikler yeterli miktarda uygulandığında konakçıya yarar-sağlayan canlı organizmalar olarak tanımlanır (Hotel ve Cordoba, 2001)

Bununla birlikte, probiyotik mikroorganizmalar yararlı sağlık etkilerini teşvik etmek için çevresel faktörlere maruz kaldıklarında insan bağırsak sisteminde metabolik aktiviteyi sürdürebilme ve kolonileşebilme özelliklerini korumalıdır (Collins, Thornton ve Sullivan, 1998; Saarela ve diğerleri, 2000). Bu anlamda, hücre kapsülleme, hidrokolloid matrislerde kapsüllenmiş mikroorganizmaların hücre kayıplarını azaltarak olumsuz koşullara karşı probiyotik mikroorganizmaların direncini artırabilir (Rodrigues ve diğerleri, 2020). Halihazırda, farklı özelliklere sahip parçacıkların elde edildiği farklı probiyotik kapsülleme teknikleri kullanılmaktadır (Cavalheiro ve ark., 2015). Probiyotik hücreleri kapsüllemek için kullanılan ana teknikler arasında ekstrüzyon (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014; Rodrigues et al., 2017; Kim et al., 2017; Silva et al., 2018a; Dimitrellou et al., 2019), emülsiyon (Zhang, Lin ve Zhong, 2016; van der Ark ve diğerleri, 2017; Raddatz ve diğerleri., 2020), püskürtmeli kurutma (Rajam ve Anandharamakrishnan, 2015; Bustamante, Oomah, Rubilar ve Shene, 2017; Santos ve diğerleri, 2019; Aragon-Rojas, Hernandez, Alvarez, Mainville, Arcand, ve Quintanilla-Carvajal, 2020), püskürtmeli soğutma (Pedroso, Thomazini, Heineemann, ve Favaro-Trindade, 2012; Bampi ve diğerleri, 2016; Arslan-Tontul ve Erbas, 2017; Silva ve diğerleri, 2018; Arslan-Tontul, Erbas ve Gorgulu, 2019) ve akışkan yatak (Silva ve diğerleri, 2018a; Horison ve Surono, 2020) gibi teknikler bulunmaktadır.

Uygun kapsülleme malzemelerinin seçimi de üretilen partiküllerin stabilitesi için esastır. Bu materyaller toksisite göstermemeli ve hücre yaralanmasını destekleyen ortamlarda kapsülleme ile mikrobiyal hücreleri korumalıdır. Ek olarak, insan mide ve bağırsak yolundan geçiş sırasında salınımı kontrol etmelidirler (Rathore ve diğerleri, 2013; Chen, Wang, Liu ve Gong, 2017a).

2.3. Probiyotik Hücrelerinin Ekspansiyonunda Kullanılan Kaplama Materyalleri

Mikrobiyal hücrelerin kapsüllemesi için uygun materyalin seçimi, üretilen partiküllerin stabilitesi ve özellikleri için esastır (Çizelge 2.1). Kapsülleyici ajan, partiküllerin morfolojisini, çapını ve geçirgenliğini doğrudan etkileyebileceğinden malzeme seçimi önemlidir. Taşıyıcı materyaller probiyotikler için koruma görevi görmeli ve aynı zamanda tüketim için güvenli olmalıdır. Genel Olarak Güvenli Kabul Edilmeli (GRAS) ilkesine dayanmalıdır (De Vos ve diğerleri, 2010).

Ayrıca mikrobiyal hücreleri çevresel faktörlere karşı korumalı ve kontrollü salımda yeterince tatmin edici olmalıdır (Rathore ve diğerleri, 2013; Chen ve diğerleri, 2017a). Probiyotik partikül depolama sırasında, hem sıcaklık hem de nem içeriği, esas olarak hücre zarı lipid oksidasyonu nedeniyle hücre canlılığını etkileyebilir.

Bu nedenle, nem tutma kapasitesine sahip malzemelerin kullanılması, kapsüllenmiş hücrelerin hayatta kalmasını artırır. Ek olarak, mide suları içinde süspansiyon edildiğinde kapsüllenmiş hücreleri tamamen salan materyaller, gastrointestinal sistemden geçiş sırasında hücreleri korumak için uygun olmayabilir (Rajam ve Anandharamakrishnan, 2015). Probiyotik hücreleri kapsüllemek için farklı polisakkaritler, proteinler ve lipidler kullanılmış ve (Rajam ve Anandharamakrishnan, 2015; Rodrigues ve diğerleri, 2017; Arslan-Tontul ve Erbaş, 2017) özellikle suda çözünür doğal polimerler ve bunların kombinasyonları da bu amaç için yaygın olarak benimsenmiştir.

Enkapsülasyon duvar malzemelerinin maliyeti uygun olmalıdır. Düşük maliyetli taşıyıcı maddeler arasında nişastalar, inulin, pektin ve çoğu karbonhidrat bulunmaktadır. Aljinat ve trehaloz gibi diğer malzemeler sıklıkla kullanılır ancak daha yüksek bir maliyete ihtiyaç duyulmaktadır. Kapsülleme için kullanılan ana malzeme olarak aşağıdakiler açıklanmıştır (Rodrigues ve diğerleri, 2017).

Çizelge 2.1. Kapsülleme malzemeleri ve LAB'yi kapsüllemek için kullanılan yöntemler

Laktik Asit Bakterileri	Enkapsülasyon Tekniği	Enkapsülasyon Malzemesi	Referanslar
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Ekstrüzyon	Peynir altı suyu proteini	Doherty ve diğerleri, 2011.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 547, <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 1994 y <i>Lactobacillus casei</i> 01	Ekstrüzyon	Kitosan, poli-L-lisin, sodyum aljinat.	Krasaekoopt ve diğerleri ,2004
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> (Bb-12)	Püskürtmeyle kurutma	Selüloz asetat ftalat	Favaro-Trindade ve Grosso, 2002
<i>Bifidobacterium breve</i> R070 y, <i>Bifidobacterium longum</i> R023	Püskürtmeyle kurutma	Peynir altı suyu proteini	Picot ve Lacroix, 2004.
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Sprey dondurarak kurutma	Maltodekstrin ve trehaloz	Semyonov ve diğerleri, 2010
<i>L. plantarum</i> 299v, <i>L. plantarum</i> 800 y <i>L. plantarum</i> CIP A159	Liyofilizasyon	Sodyum aljinat - peynir altı suyu proteini	Gbassi ve diğerleri, 2010
<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i>	Emülsiyon	Sodyum aljinat ve modifiye nişasta	Kailasapathy, 2006
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> .	Emülsiyon	Susam yağı	Hou ve diğerleri, 2003
<i>Lactobacillus casei</i> NCDC-298	Emülsiyon	Sodyum aljinat – soya fasulyesi yağı	Mandal ve diğerleri, 2006.
<i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. acidophilus</i> NCFM	Ters akım sprej	Sodyum aljinat - kitosan	Sohail ve diğerleri, 2011
<i>Lactobacillus paracasei</i> NFBC	Püskürtmeyle kurutma	Akasya sakızı - sulandırılmış yağsız süt	Desmond ve diğerleri, 2002
<i>Bifidobacterium</i> PL1	Püskürtmeyle kurutma	Nişasta	O’Riordan ve diğerleri, 2001
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Emülsiyon- Sprej kurutma	Kanola yağı - sodyum kazeinat - fruktooligosakkarit - su-suz glikoz şurubu	Crittenden ve diğerleri, 2006
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Liyofilizasyon	Yağsız süt - sorbitol - monosodyum glutamat	Carvalho ve diğerleri, 2003
<i>Carnobacterium divergens</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> y <i>Lactobacillus sakei</i>	Püskürtmeyle kurutma	Yağsız süt tozu	Silva ve diğerleri, 2002
<i>Lactobacillus reuteri</i> C10	Liyofilizasyon	Yağsız süt - sakaroz-laktoz	Khoramnia ve diğerleri, 2011
<i>Lactobacillus</i> F19 <i>Bifidobacterium</i> Bb12	Emülsiyon - Liyofilizasyon	Sodyum kazeinat - transglutaminaz - ayçiçek yağı	Heidebach ve diğerleri, 2010

2.3.1. Aljinat

Agar, sodyum aljinat, karragenan, arap sakızı, kitosan, dekstran, nişasta ve selüloz (etil-selüloz, asetil-selüloz, metil-selüloz, karboksimetil-selüloz, nitroselüloz) kapsülleme için kullanılan başlıca taşıyıcı maddelerdir. Bunlar arasında sodyum aljinat, en sık kullanılan ve neredeyse tüm kapsülleme yöntemleriyle uyumlu ve genellikle diğer bileşenlerle birlikte kullanılmaktadır (Burgain ve diğerleri, 2011). Kahverengi alglerden (*Phaeophyceae*) ekstrakte edilen aljinat, β -(1 $\rightarrow$ 4) bağları ile birleştirilmiş D manuronik asit (M) ve α -(1 $\rightarrow$ 4) bağı ile birleştirilmiş L-guluronik asit monomerlerinden (G) oluşan lineer bir heteropolisakkarittir. Bu nedenle, aljinatın temel yapısı, alternatif M-G birimlerinin kimyasal bileşimi ve sırası farklı olmakla birlikte birlikte dallanmamış polimer birimlerinden oluşur. Bir sodyum aljinat sıralamasının kimyasal bileşimi ve dağılımı, ekstraksiyonda kullanılan türlerin ve alglerin kısımlarına bağlıdır (Fu ve diğerleri., 2011). M ve G birimleri arasındaki oran ve polimerde bulunan üç bloğun miktarı, kaynağa göre değişebilir ve bu polimerden oluşturulan jellerin özelliklerini etkileyebilir. Daha yüksek G blok yüzdesine sahip aljinatlar, daha sert ve kırıl-gan jellere yol açma eğilimindeyken, daha yüksek miktarlarda M blokları daha az sert ve daha esnek jeller oluşturabilmektedir. Aljinat jel özelliklerinin salınımı ayrıca polimer konsantrasyonuna, pH'a ve aljinatta bulunan anyonik bloklarla moleküller arası iyonik bağları destekleyen iki değerlikli katyonların varlığına da bağlıdır.

Sodyum aljinat, iki değerli katyonlarla hidrojel oluşturma kabiliyetinden dolayı, jelleştirici bir madde olarak yaygın şekilde kullanılır. Ca^{+2} , Ba^{+2} ve Sr^{+2} ile hidrojel oluşturabilmektedir. Böylece guluronik asit blokları katyonlarla bağlanır ve iyonik etkileşimlerle bir arada tutulan üç boyutlu bir aljinat filamentleri ağı oluşturur. Ancak, toksisite sergileyen katyonların kullanımı sınırlıdır ve farmasötik veya gıda amaçlı kullanılmamalıdır. Bu nedenle toksik olmayan Ca^{+2} iyonu, kalsiyum aljinat jellerinin oluşumunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Haug ve Smidsrød, 1970; Mørch, Donati ve Strand, 2006). Bu ağı en iyi tanımlayan model "yumurta kutusu modeli" olarak ifade edilmektedir (Simpson ve diğerleri, 2004).

Aljinatın probiyotik kapsülleme çalışmalarında; gıda ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmasının nedenleri arasında, polimerin Avrupa Birliği (E401 ve E404) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanım için güvenli olarak sınıflandırılmasından kaynaklanmaktadır (GRAS, 21 CFR 184.1187 ve GRAS, 21 CFR 184.1724). Bu nedenle fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılabilir (Qin ve diğerleri, 2018).

Aljinatlar yaygın olarak mikrobiyal hücre kapsüllemesi için kapsülleyici malzemeler olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu polimerin kullanımı, aşırı monovalent iyonların ve Ca^{+2} şelatlama maddelerinin mevcudiyetinde parçalanmaya duyarlı olan gözenekli matrislerin oluşumu ile sonuçlanır. Bu nedenle birçok araştırmacı, partikül özelliklerini iyileştirmek için doğal polisakkaritler gibi farklı polimerlerle aljinatı harmanlamıştır (Rodrigues ve diğerleri, 2017; Chen ve diğerleri, 2017a; Dokoohaki, Sekhavatizadeh ve Hosseinzadeh, 2019).

Aljinat kullanılarak literatürde birçok kapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Gbassi ve diğerleri, (2010) tarafından yapılan çalışmada 10 g/L'de peynir altı suyu proteini ile birlikte 20 g/L konsantrasyonda sodyum aljinat varlığında dondurarak kurutma (liyofilizasyon) ile *L. plantarum* 299v, *L. plantarum* 800 ve *L. plantarum* CIP A159'u kapsüllenmiştir. Bu çalışmada serbest ve enkapsüle bakterilerin simüle mide suyunda bekletilmesi sonucunda kapsüllenmiş suşların serbest bakterilerden daha fazla canlılığa sahip olduğunu ve bağırsak ortamına dayanabileceğini göstermektedir.

Kailasapathy ve diğerleri (2006) tarafından yapılan çalışmada; yoğurt içersinde *L. acidophilus* ve *B. lactis*'i aljinat ve modifiye nişasta karışımı duvar malzemesi ile emülsiyon tekniği kullanılarak kaplanması sağlanmıştır. Kapsüllenmiş probiyotikler, serbest hücrelere kıyasla depolama esnasında daha fazla canlılık göstermiş ve duyuşsal analiz sonuçlarına göre kapsüllenmiş hücrelerin yoğurtta kullanılmasının renk, asitlik veya lezzet özelliklerini değiştirmediği tespit edilmiştir. Favaro-Trindade ve Grosso, (2002) çalışmalarında; selüloz asetat ftalat, püskürtmek için kurutma yöntemiyle *L. acidophilus* (La-05) ve *B. lactis* (Bb-12) içeren mikrokapsülleri hazırlamak için taşıyıcı bir malzeme olarak kullanılmıştır. Mikroorganizmaların kuru sıcaklıktaki direncini, insan mide ve bağırsak ortamına benzer pH ve safra tuzları ile hazırlanmış ortama uyumu incelemesi sonucunda, *B. lactis* canlılığının azalmasına neden olmamıştır (Favaro Trindade ve Grosso 2002).

2.3.2. Oligosakkaritler

Mısır şurubu, sukroz ve maltodekstrin yaygın olarak kullanılır. Uygun bir maltodekstrin ve trehaloz karışımı, *L. paracasei*'nin spreyle soğutulma veya dondurulma uygulaması ile kaplanması için taşıyıcı ortam olarak kullanıldığında, yüksek bakteriyel canlılık elde edilmiştir.

Trehaloz konsantrasyonu, yüksek ozmotik basıncından dolayı hücre canlılığının artmasına yardımcı olmuştur (Semyonov ve diğerleri, 2010).

2.3.3. Lipidler

Mumlar, parafin, digliseritler, monogliseritler, stearik asit, triestearinler ve yağlar esas olarak kullanılır. Susam yağının *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ile olan emülsiyonu, soğutma koşullarında serbest hücrelere karşı hücrelerin canlılığında %5.4 artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kapsüllenmiş bakterilerin simüle edilmiş bağırsak ortamında hücreler için daha iyi yaşanabilir ortam olduğu saptanmıştır (Hou ve diğerleri, 2003).

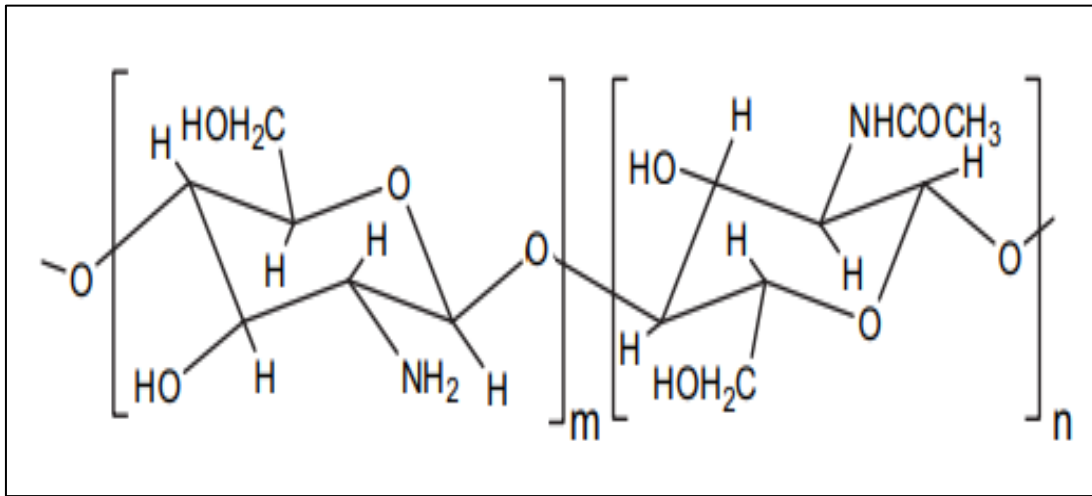
2.3.4. Proteinler

Gluten, kazein, peynir altı suyu proteini, albümin, yaygın olarak protein bazlı kapsülleme malzemeleri olarak kullanılmaktadır. Picot ve Lacroix (2004), *Bifidobacterium breve* R070 ve *Bifidobacterium longum* R023'ü yoğurt içerisine püskürtmüşler daha sonra püskürtürerek kurutma için taşıyıcı madde olarak peynir altı suyu proteini ile çalışmışlardır. Sonuçlar, peynir altı suyu proteininin bakterilerin asidik pH'a toleransını arttırabildiğini, bu nedenle peynir altı suyu proteinlerinin gastrointestinal sisteme ulaşmasında büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Picot ve Lacroix, 2004). Aynı zamanda, peynir altı suyu proteinleri, simüle edilmiş bir gastrointestinal sistemde ekstrüzyon yoluyla *L. rhamnosus*'un kapsüllenmesi için tercih edilmiş ve protein kapsülleri, asidik pH'da *L. rhamnosus*'a koruma sağlayan bir matris oluşturmuş, daha sonra yerinde bir emilim ile kontrollü ve etkin bir biyomolekül salınım üretmiştir. (Doherty ve diğerleri, 2011). Kapsülleme malzemeleri ve LAB'yi kapsüllemek için kullanılan yöntemler Çizelge 2.2'de sunulmuştur.

2.3.5. Kitosan

Mikrokapsülasyon kararlı olmalı ve kapsül parçalanmadan sindirim sistemi geçişi boyunca bütünlüğünü korumalıdır (Vodnar ve diğerleri, 2010). Kaplama, mikrokapsül yüzeyine ekstra koruyucu bir tabaka sağlar, bu nedenle gelişmiş mekanik mukavemet ve güçlü bir bariyer görevi görür. Bu işlem, hidrojel parçacıklarının bir kaplama polimeri çözeltisine daldırılmasını içermektedir (Heidebach, Först ve Kulozik, 2012).

Kitosan kaplamanın başlıca avantajları, benzersiz katyonik karakter, yüksek biyouyumluluk, toksik olmama ve biyolojik olarak parçalanabilirliktir; bu nedenle gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanıma oldukça uygundur. Kökeni yengeç, karides ve kerevitin kabuklu atıklarından elde edilmektedir (Anal ve Sinhg, 2007). Bu tip kaplamalar, canlı hücrelerle olumlu uyumluluğu nedeniyle probiyotiklerin hedef odaklı salımı için büyük ilgi görmektedir (de Vos ve diğerleri, 2010). Kimyasal yapısı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir. Kitosan, doğada bulunabilirliği açısından selülozdan sonra ikinci sırada yer alan bir polisakkarittir (Aider, 2010).



Şekil 2.1. Kitosanın kimyasal yapısı (de Vos ve diğerleri, 2010)

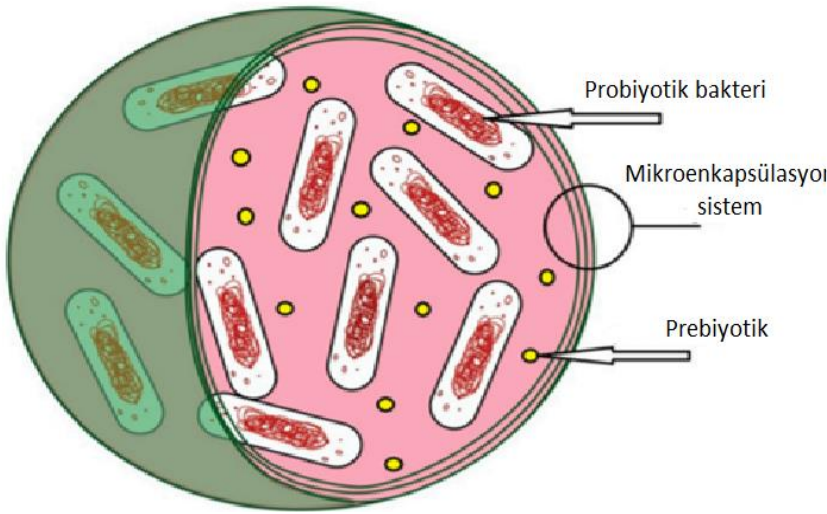
Kitinin deasetilasyon derecesi, kitosanın karakterizasyonundaki ana yönü temsil etmektedir. (Estevinho ve diğerleri, 2013). Kitinin deasetilasyon derecesi %50'nin üzerine çıktığında, kitosan sulu asidik koşullarda çözünür hale gelir (Rinaudo, 2006). Ayrıca, homojen veya heterojen deasetilasyon koşulları, esas olarak çözünürlüğünü ve uygulamalarını (yani ilaç veya gıda taşıyıcıları) belirleyen kitosanın mikro yapısı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Estevinho ve diğerleri, 2013).

Aljinat boncuklarının kitosan ile kaplanması, kitosan ile aljinat arasında bir uyum sağladığı, gözenek sayısı azalmış aljinat kapsüllerde bakteri sızıntısının azaldığı ve çeşitli pH aralıklarında stabil olduğu tespit edilmiştir. Kitosanın pozitif yükü ile temas halinde olan aljinatın negatif yük özelliği, yarı geçirgen bir zar geliştirmektedir. Bu nedenle elde edilen kapsüller, suda çözünür moleküllere karşı daha az geçirgenliğe sahip ve daha pürüzsüz bir yüzeye sahiptir (Krasaekoopt, Bhandari ve Deeth, 2004). Bununla birlikte, probiyotik bakterilerin hayatta kalmasının tatmin edici düzeyde olmadığı ve bazı bakterilere (*L. lactis*)

karşı inhibitör bir etkiye sahip olduğundan, kitosan kapsül olarak değil, çoğunlukla bir kaplama/kabuk olarak kullanılmaktadır (Mortazavian ve diğerleri, 2007). Aslında, probiyotik bakterilerin kitosan ve aljinat kaplama ile kapsüllenmesi, simüle edilmiş gastroentistinal koşullarında koruma sağlayarak canlı bakteri hücrelerini kolona ulaştırmak için iyi bir yöntemdir (Morales ve Ruiz, 2016). Çalışmalar göz önüne alındığında, probiyotik içeren kitosan kaplı aljinat mikrokürelerin ağız yoluyla alınması iyi bir alternatiftir (Chávarri ve diğerleri, 2010). Kitosana özgü kimyasal yapı, C-2 pozisyonunda hiçbir zorluk yaşanmadan önemli değişikliklere izin vermektedir (Rinaudo, 2006). Kitosan kaplı aljinat mikrojellerin veya diğer kitosan bazlı mikrojellerin yüzey potansiyeli (ζ-potansiyel) gibi elektriksel özellikler, elektroforetik ışık saçılması gibi farklı yöntemlerle değerlendirilmektedir. 2016'da yayınlanan bir çalışma, *B. longum* kapsüllemesi için aljinat ve kitosan mikrojellerini partikül boyutu ve statik ışık saçılımı kullanılarak değerlendirmiştir. Kitosan kaplı aljinat boncuklarının daha yüksek partikül boyutuyla sonuçlanmıştır (Yeung ve diğerleri, 2016).

Bakterilerin hayatta kalma etkinliğini arttırmak için araştırmacılar, destekleyici matrislerin yeni kombinasyonlarını göz önünde bulundurarak çeşitli mikrokapsülleme teknolojilerine odaklanmışlardır. Farklı bakteri suşları üzerinde yürütülen birkaç çalışma, kitosan kaplı mikrokapsüllerin kullanımının, simüle edilmiş gastroentistinal koşullarına maruz kaldığında probiyotik bakterilerin hayatta kalmasına önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermiştir (Vodnar ve Socaciu, 2012). Yapılan çalışmalar, test edilen tüm koşullara karşı probiyotik bakterilerin korunması (*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium spp.* gibi) için en iyi yöntem olarak kitosan kaplı aljinat mikrokapsülleme yöntemini bildirmiştir (Krasaekoopt, Bhandari, ve Deeth, 2004). Başka bir çalışma, kitosan kaplı aljinat mikroenkapsülasyonu ile immobilize edilen *L. bulgaricus*'un, serbest hücrelere kıyasla depolama stabilitesinin arttığını göstermiştir (Koo ve diğerleri, 2001). Benzer bir etki, Vodnar ve Socaciu (2012) tarafından *L. casei* ve *L. plantarum* üzerinde yürütülen bir çalışmada gözlenmiştir. Başka bir çalışma, kitosan ile kapsüle edilmenin simüle edilmiş GI koşulları altında probiyotik bakterileri en iyi şekilde koruduğunu ve hayatta kalmalarını artırdığını ortaya koymuştur ($p<0.05$). 2017'de yapılan yeni bir çalışma, pektin-kitosan kapsüllerinin *L. casei*'yi midenin asidik koşullarından koruduğunu ve bağırsakta daha yüksek sayıda canlı hücre ile bulunduğunu göstermiştir (Bepeyeva ve diğerleri, 2017). Bu sonuçlar, enkapsülasyon materyalinin konsantrasyonu ile simüle edilmiş gastroentistinal koşulları altında probiyotik bakterilerin hayatta kalma oranındaki artış arasında bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur (Anekella ve Orsat, 2013).

Ek olarak, emilemeyen karbonhidratlar, probiyotikler için önemli bir enerji kaynağı olduklarından, probiyotiklerin etkinliğinin artmasını sağlar. Substrat-probiyotik kombinasyonu, insan bağırsağında önemli bir hücre kolonizasyonu ortaya konulabileceği düşünülmüştür (Vodnar ve Socaciu, 2014). Bu kombinasyon “sinbiyotikler” olarak adlandırmıştır (Cook ve diğerleri, 2014). Prebiyotik matrisin eklenmesi, etkili probiyotik korunmasına olanak sağlamaktadır. Kitosan ile kaplı kapsülleme sistemini öneren birkaç çalışma aşağıda açıklanmıştır. Kavramın basit bir temsili Şekil 2.2. 'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Sinbiyotik mikroenkapsülasyonunun şematik gösterimi (Călinoiu ve diğerleri, 2019).

Varankovich ve arkadaşlarının (2017) yapmış oldukları çalışmada, kitosan kaplama ile yeni bezelye proteini-aljinat mikrokapsülleri ekstrüzyon ile elde edilmiştir. Bu mikrokapsüller, depolama ve in vitro gastroentestinal koşullarına maruz kalma sırasında *L. rhamnosus* R0011 ve *L. helveticus* R0052'nin immobilizasyonu ve canlılığı açısından test edilmiştir. Sonuçlar, kitosan kaplamanın, oda sıcaklığında dokuz haftalık depolama sırasında hücre canlılığının artmasından sorumlu olduğunu ve kitosan kaplı olmayan mikrokapsüllerle karşılaştırıldığında mikrokapsül performansını önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. Gastroentestinal koşulları altında, mikrokapsül formülasyonu hücreler için yüksek koruma sağlarken, soğukta depolamanın mikrokapsül koruma performansı üzerinde olumsuz bir etkisi olmamıştır. Ayrıca kitosan kaplama mikrokapsül boyutunu artırmamıştır.

Farklı araştırmalar, kitosan kaplı aljinat taneciklerinde probiyotik bakterilerle birlikte kapsüllenen selenyumla zenginleştirilmiş yeşil çayın, simüle edilmiş gastroentestinal sıvılarında

ve soğukdepolamada probiyotik hücrelerin ömrünü ve canlılığını genişletmek için zorlayıcı bir yaklaşım sunduğunu göstermiştir. Vodnar ve Socaciu (2012) tarafından 4°C'de depolama sırasında test edilen *L. casei* ve *L. plantarum* suşlarına ait probiyotik bakterilerin canlılığı üzerine yapılan çalışmada, selenyumla zenginleştirilmiş yeşil çay ile kitosan kaplı mikro kürelerde kapsüllenene bakteri canlılığından önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, önceki bulgularla birlikte, kitosan kaplamada bakteri suşlarının immobilizasyonunun, soğutma vedepolama sırasında canlılıklarını iyileştirdiğini göstermektedir. Yeşil çayın koruyucu etkisi, simüle edilmiş koşullar sırasında *Lactobacillus spp.* ve *Bifidobacterium spp.* 'un büyümesini sürdürerek kanıtlamıştır (Molan ve diğerleri, 2009).

Chavarri ve arkadaşları (2010), *L. gasseri* ve *B. bifidum'u*, prebiyotik olarak kersetin ve aljinat mikropartiküllemde kaplama malzemesi olarak kitosan kullanımının ve in vitro gastrointestinal koşullar sırasında canlılık düzeyini arttığını bildirmiştir. Diğer çalışmalar da ise, prebiyotikler olarak dirençli nişasta ve farklı probiyotik bakterilerin kapsüllenmesi için kitosan kullanmış ve oda sıcaklığında 6 aya kadar devam eden canlılık görülmüştür (And ve Kailasapathy, 2005).

De Araújo Etchepare ve arkadaşlarının (2016) yapmış olduğu çalışmada, prebiyotik mısırunu (%1) ve kitosanın (%0,4) aljinat ile *L. acidophilus'* uekstrüzyon tekniğiyle enkapsülasyonu sağlanmıştır. Kapsül *L. acidophilus'un* hem gastroentistinal hem de nemli şartlarda canlılığını önemli ölçüde iyileştirmiştir. Jantarathin ve arkadaşları (2017), *L. acidophilus* TISTR 1338, kitosan kaplı bir sodyum-aljinat matrisi içinde inülin ve elma ile ayrı ayrı kapsüllenmiştir. Dondurarak kurutma ve yüksek sıcaklık koşullarında kapsüllerin performansını test ettikten sonra, sonuçlar kitosan çift kaplı mikrokapsüllerde hücrelerin canlılığında bir artış göstermiş ve bu artış dondurarak kurutma işleminden sonra korunmuştur. Yüksek sıcaklık koşulları, kapsüllerin 60 dakika boyunca 70 °C'ye ve 5 dakika boyunca 90 °C'ye maruz bırakılmış ve bulgular, %3 aljinat ve %0,8 kitosan ile %3'lük bir prebiyotik ve artan canlılık için en etkili kombinasyon olduğunu göstermiştir. Isıl işlem sırasında serbest hücreler ise yok edilmiştir. Bu yeni kombinasyon, ısıtma ve dondurarak kurutma işlemlerini içeren fonksiyonel gıda işleme sırasında probiyotik bakteri koruması için etkili bir yaklaşımı temsil etmektedir. İnülin en çok kullanılan prebiyotiklerden biri olduğu için, başka bir çalışma, kitosan kaplı aljinat boncuklarda *L. casei* ile birlikte kapsüllemde farklı zincir uzunluklarının etkisini test etmiştir. İnülin ve kitosan kaplama kombinasyonunda inülinin zincir uzunluğu önemli olup en yüksek hayatta kalma oranı (2,7 log azalma) göstermiş *L. casei* için 2,7–2,9

log azalma ile mide ve safra tuzu maruziyetine karşı hücre canlılığını arttırdığı kanıtlanmıştır (Darjani ve diğerleri, 2016). Hedeflenen salım için gastroentistinal koşulları altında probiyotik bakterilerin canlılığını geliştirmeye yönelik bir başka etkili yaklaşım, mikrokapsüllü boncukların formülasyonunda kitosan ve enterik polimerlerin kullanımını önermektedir. Sonuçlar, kapsül taneciklerinin formülasyonunda kitosan ve enterik polimerlerin kullanımının, *Bifidobakterilerin* kontrollü bağırsak iletimini teşvik ederken, *B. animalis*'in hayatta kalma oranını iyileştirdiğini göstermiştir (Liserre, Ré ve Franco, 2007).

2.4. Enkapsülasyon yöntemleri

Probiyotik bakterileri (Çizelge 2.1.), mide sıvısı, safra tuzu, kurutma, paketlenme ve saklama koşulları gibi dış etkenlerin neden olduğu hasarlardan korumak için mikroenkapsülasyon teknolojileri geliştirilmiş ve başarıyla uygulanmıştır. Kapsülleme yönteminin seçimi, gerekli partikül ortalama boyutuna, taşıyıcı materyalin fiziksel ve kimyasal özelliklerine, kapsüllenmiş materyalin uygulamalarına ve gerekli salım mekanizmasına ve maliyete bağlıdır. Bu parametrelerin her bir spesifik organizma ve süreç için çalışılması gerekir (Parra ve Huertas, 2010; Burgain ve diğerleri, 2011). Probiyotik hücreleri enkapsüle etmek için kullanılan enkapsülasyon metodlarının etkileri hakkında çalışmalar Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Probiyotik bakterilerinin enkapsülasyon metodları ve etkileri

Enkapsülasyon Materyali	Probiyotik	Teknik	Etki	Referanslar
Mikrokristalin selüloz-trehaloz-malto-dekstrin-sebze, balmumu	<i>Lactobacillus casei subsp. paracasei</i> LMG P-21380	Akışkan yatak	Enkapsülasyon verimliliği yüksek; Kapsülleme işlemi sırasında geliştirilmiş koruma ve depolama sırasında daha fazla stabilite	Semyonov, Ramon, Kovacs, Friedlander ve Shimoni (2012)
Kitosan-aljinat-inülin	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Ekstrüzyon	Elma suyu üzerinde olumsuz organoleptik etkisi yoktur; 90 günlük depolamada elma suyunda hücre sağkalımında iyileşme	Gandomi, Abbaszadeh, Misaghi, Bokaie ve Noori (2016)
Aljinat-şellak	<i>Lactobacillus paracasei BGP-1</i>	Akışkan yatak	Gözenekliliği azaltarak mikrokapsül yapısını iyileştirme; Oda sıcaklığında ve in vitro gastrointestinal simülasyonda saklama sırasında koruma sağlama,	Silva ve diğerleri, (2016)
Aljinat-kenen tohumu veya bamya müsili aljinat-butyrosphaeria	<i>Lactobacillus casei LC 01 Lactobacillus casei BGP93</i>	Ekstrüzyon	Yüksek kapsülleme verimliliği; Soğutmalı depolamada kapsüllenmiş hücrelerin stabilitesinde iyileştirme,	Rodrigues ve diğerleri, (2017)
Selüloz-aljinat	<i>Lactobacillus plantarum IS10506</i>	Akışkan yatak	Mide simülasyonu sırasında probiyotik hayatta kalma oranını artırma,	Surono, Verhoeven, Verbruggen ve Venema (2018)
Aljinat-arabinoksilan	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ekstrüzyon	Aljinat boncuklardan daha yüksek kapsülleme verimliliği ve gastrointestinal duruma direnç,	Wu ve Zhang (2018)
Aljinat-keçi sütü-inülin	<i>Bifidobacterium animalis spp. lactis BB12</i>	Ekstrüzyon	İnülin ilavesi, kompakt yapılı kapsüller ile sonuçlandı; Simüle edilmiş gastrointestinal durumda probiyotiklerin korunması,	Prasanna ve Charalampopoulos (2019)
Aljinat	<i>Lactobacillus casei ATCC 393</i>	Ekstrüzyon	Simüle edilmiş gastrointestinal durumda probiyotiklerin korunması,	Dimitrellou ve diğerleri, (2019)
Aljinat-Kitosan	<i>Bifidobacterium longum DD98</i>	Emülsifikasyon; iç jelleşme	Kapsüllenmiş hücrelerin ısı toleransının iyileştirilmesi; Mide asidi ve safra tuzu altında önemli ölçüde koruma	Ji ve diğerleri, (2019)
Maltodekstrin-sukroz, maltodekstrin-sorbitol	<i>Saccharomyces cerevisiae KTP Issatchenkia occidentalis ApC Saccharomyces cerevisiae var. boulardii</i>	Püskürtmeyle kurutma	Bileşenler, maltodekstrin kapsüllemenin özelliklerini değiştirmede; Sükroz ve sorbitol, simüle edilmiş mide ve safra sularında mayanın hayatta kalmasını arttırdı	Suryabhan, Lohith ve Anu- Appaiah (2019)
Aljinat-kalsiyum karbonat	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum G7</i>	Ekstrüzyon	Probiyotik, kalsiyum karbonat ile birlikte kapsülendiğinde gastrointestinal sistem boyunca hayatta kaldı	Gu ve diğerleri, (2019)
Amidlenmiş düşük metoksil pektin	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Ekstrüzyon; dondurarak kurutma	14 gün boyunca kapsüllenmiş bakterilerin stabilizasyonu; Mide ve distal jejunum simüle koşullarına hücre koruması	Raise ve diğerleri, (2020)
Aljinat-fars zamkı-prebiyotikler	<i>Lactococcus lactis ABRINW-N19</i>	Ekstrüzyon	Yüksek kapsülleme verimliliği; Portakal suyunda soğutulmuş depolama sırasında probiyotik hücre stabilitesi	Nami, Lornezhad, Kiani, Abdullah ve Haghshenas (2020)
Aljinat-kenen tohumu müsili	<i>Lactobacillus paracasei spp. Paracasei</i>	Ekstrüzyon	Yüksek kapsülleme verimliliği; Simüle edilmiş sindirim sisteminin zararlı etkilerine karşı direnç	Shafizadeh ve diğerleri, (2020)
Peynir altı suyu proteini-kitosan	<i>Kluyveromyces marxianus VM00</i>	Püskürtmeyle kurutma	Oda sıcaklığında 90 gün boyunca depolama sırasında canlılığı artırır; Simüle edilmiş gastrointestinal sindirim koşullarına toleransın iyileştirilmesi	Vanden Braber ve diğerleri, (2020)

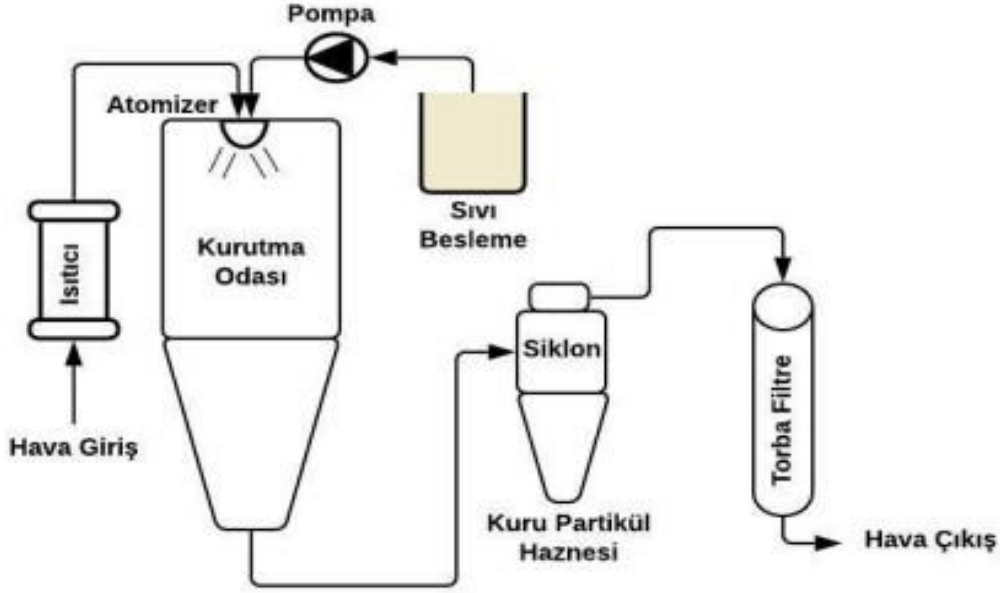
2.4.1. Püskürtmeyle kurutma

Püskürterek kurutma, büyük çapta endüstriyel uygulamalar için uygun bir tekniktir. Bir sıvı karışımı, bir ağızlık veya disk kullanarak bir tankta atomize edilir ve çözücü, sıcak hava veya gazla temas ettikten sonra buharlaştırılır (Yañez ve diğerleri, 2002) (Şekil 2.3.). *Lactobacillus spp.* (Desmond ve diğerleri, 2002) ve *Bifidobacterium* için kullanımı ile ilgili çalışmalar mevcuttur (O'Riordan ve diğerleri, 2001). Püskürtme ile kurutucuda enkapsülasyonu etkileyen birçok parametre bulunmaktadır. Bunlar aşağıda sıralanmıştır.

1. Hava akışı türü: ortak akım veya karşı akım akışı
2. Gerilim tipi ve taşıyıcı malzemeye ön adaptasyonu (Corcoran ve diğerleri, 2004)
3. Taşıyıcı malzeme: akışı kolay, tatsız ve düşük viskozite için yüksek çözünürlük (Vega ve Roos, 2006)
4. Kurutma sıcaklığı: canlı probiyotiklerin sayısı çıkış havasının sıcaklığı ile doğrusal olarak azalır. Çıkışta optimum hava sıcaklığı mümkün olduğu kadar düşük olmalı ve giriş havası sıcaklığı 150°C ila 170°C aralığında olmalıdır. Yavaş besleme hızı için, 80°C'ye yakın sıcaklıklara izin verir.
5. Kuruma süresi: kısa bir kuruma süresi, probiyotiklerin yaşayabilirliğini artırır.
6. Saklama koşulları: probiyotiklerin hayatta kalması, düşük su aktivitesi (<0.25) ve düşük sıcaklık (4 °C) için en uygundur (Zuidam ve Nedovic, 2010).

Bu koşullar, yoğurtta kullanılmıştır ve genellikle kurutulmuş kültürlerin depolanma sırasında iyi bir şekilde dengelenmesi için önerilmektedir (Picot ve Lacroix, 2004). Olumsuz çevresel koşullar altında tutulan kapsüllenmiş bakterilerin yaşayabilirliğini değerlendirmek için 19°C ila 25°C arasındaki sıcaklıklar kullanılmıştır (O'Riordan ve diğerleri, 2001). Spreyle kurutmada, arap sakızı ve sulandırılmış yağsız süt taşıyıcı maddelerin kullanımı ile *L. paracasei NFBC*'yi kapsüllemek için kullanılmıştır. 170°C sıcaklıkta sabit giriş havası kullanılmıştır. Kültür, iki akışkan için bir ağızlık kullanarak kurutma haznesinin içine püskürtülerek, ürünün çok kısa bir kalış süresiyle neredeyse anında kurumasını sağlamıştır. 95 ila 105 °C arasındaki çıkış sıcaklıklarda hazırlanan *L. paracasei NFBC* kapsülleri, aynı

koşullar altında serbest hücrelere karşı hücre canlılığında 3 log artış göstermiştir (Desmond ve diğerleri, 2002).

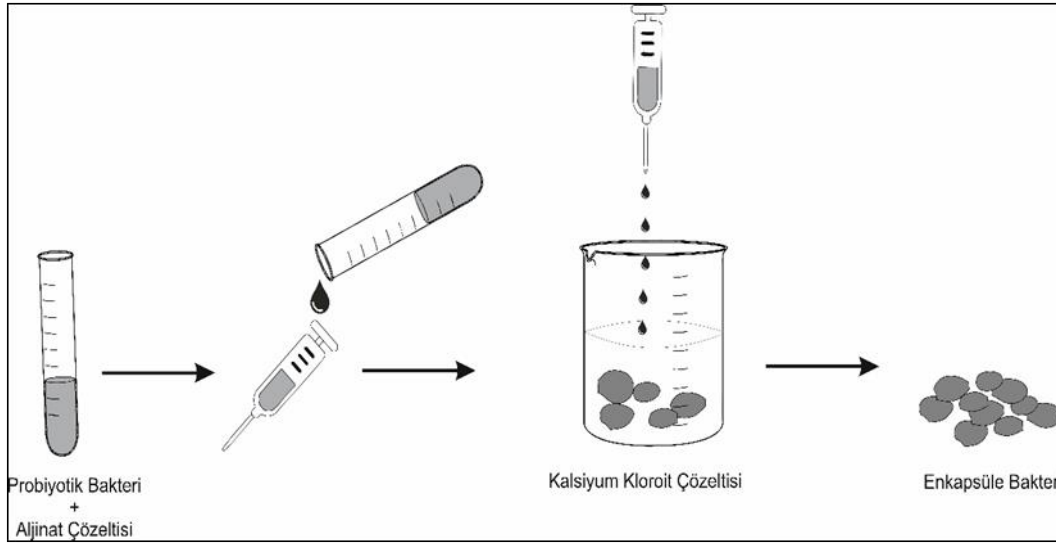


Şekil 2.3. Püskürtmeyle kurutma yöntemi (Özdemir, 2021)

Crittenden ve diğerleri (2006), kanola yağı, kazeinat, fruktooligosakarit ve kurutulmuş glikoz şurubu veya dirençli nişasta ile hazırlanmış bir su emülsiyonunda bir yağ kullanarak, düşük su aktivitesine (0.2-0.3) sahip *B. infantis* kapsülleri (çapı 15 ila 20 μm) elde etmişlerdir. Taşıyıcı malzeme olarak mikro-akışkanlaştırma kullanılmıştır. Giriş ve çıkış havası sıcaklığı 160°C ve 65°C 'e ayarlanmıştır. Ayrıca, bakteri depolama odası koşullarında (25°C) canlılığı ve taşıyıcı malzemenin, simüle edilmiş insan mide ve ince bağırsak ortamlarında *B. infantis*'i koruma kabiliyeti araştırılmıştır. Mikro kapsülleme, kapsüllenmemiş bakteri ile karşılaştırıldığında bakterileri oda sıcaklığında ve simüle edilmiş bir midede ve ince bağırsak koşullarında önemli ölçüde korumuştur (Crittenden ve diğerleri, 2006).

2.4.2. Ekstrüzyon

Hidrokolloidlerle kapsül üretmek için en eski ve en yaygın teknik, bir hidrokolloid çözeltisi hazırlamak, mikroorganizmaları eklemek ve süspansiyonu bir sertleştirme çözeltisine serbest düşmek üzere bir şırınga iğnesi veya bir ekstrüder aracılığıyla ekstrüde ederek damlacıklar oluşturularak meydana gelmektedir. (Şekil 2.4.).

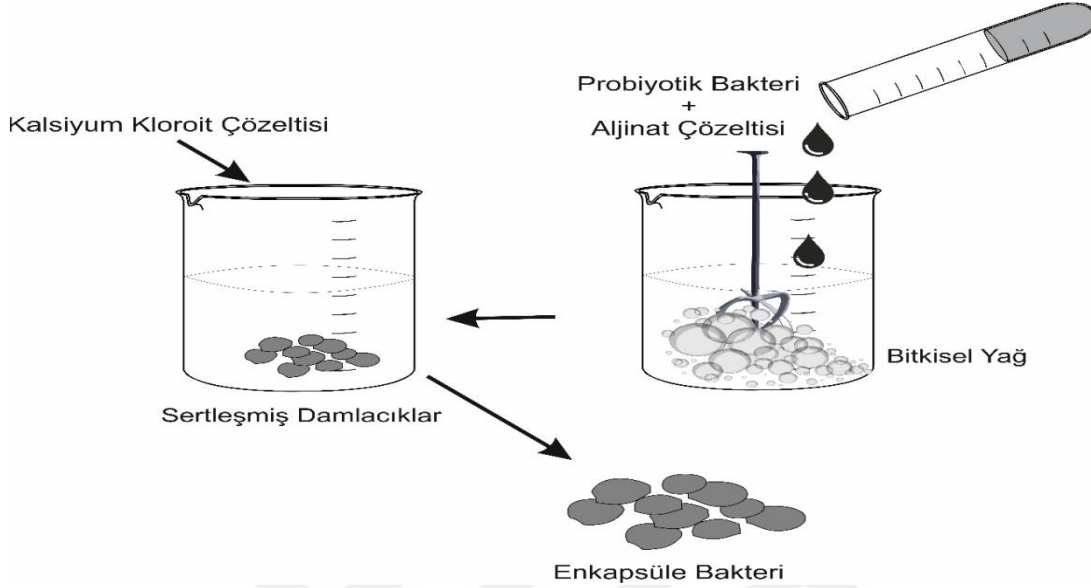


Şekil 2.4. Ekstrüzyon işlemi

2.4.3. Emülsiyon

Bu teknik, büyük miktarda bitkisel yağa (sürekli faz), mikroorganizmalar (süreksiz faz) içeren küçük hacimli bir hidrokolloid süspansiyonu eklenmesi ile sağlanmaktadır. Karışım, bir emülgatör kullanılarak yağ emülsiyonlarında su dağılımını sağlamak için homojenleştirilmektedir. Emülsiyon oluşturulduktan sonra, yağ fazında jel kapsülleri oluşturmak için çözünmez hale getirilebilir (Şekil 2.5.). Bu yöntemin en büyük dezavantajı, partikül büyüklüğü ve şekli bakımından geniş bir aralıkta verilmiş olmasıdır (Burgain ve diğerleri, 2011). Bu teknik, sürekli faz olarak soya yağı kullanılarak *L. casei* NCDC-298'in bir sodyum aljinat matrisinde kapsüllenmesi için kullanılmıştır. 20 mL aljinat çözeltisi ve 4 mL hücre süspansiyonu, sürekli karıştırılarak 100 mL soya fasulyesi yağı ve %0.2 Tween 80 ile karıştırılmıştır. Sertleştirilmiş kapsüllere ve emülsiyonun fragmanlarına, 100 mL 0.1 M kalsiyum klorür ilave edilmiştir. Sonuçlar, *L. casei* NCDC-298'in sodyum aljinatta kapsüllenmesinin, içindeki bakterilerin canlılığını arttırdığını göstermiştir (simüle edilmiş bağırsak koşullarında ve ısıtıl işlem altında) (Mandal ve diğerleri, 2006). Bu emülsiyon tekniği gıda endüstrisinde nispeten yenidir ve ölçeklendirmesi kolaydır. Kapsüllenmiş ve hapsolmuş çekirdek malzemeleri sağlar. Bu yöntemle oluşturulan parçacık boyutu, ekstrüzyon yöntemi (2 ila 5 mm) tarafından üretilen boyuttan daha küçüktür (25 μ m - 2 mm). Ekstrüzyon ile oluşturulan inci büyüklüğü iğnenin büyüklüğüne, emülsifikasyonla üretilen parçacık büyüklüğüne, ajitasyon hızına ve emülgatör tipine bağlıdır. Formülasyondaki bitkisel yağ ihtiyacı, ekstrüzyon

yöntemiyle karşılaştırıldığında işletme maliyetlerini artırabilir (Krasaekoopt ve diğerleri, 2003zz



Şekil 2.5. Emülsiyon işlemi

2.4.4 Püskürtmeli dondurarak kurutma

Bu prosedür, liyofilizasyonda (dondurularak kurutma) ve spreyle kurutmada kullanılan genel aşamaları birleştirir ve spreyle kurutulmuş kapsüllere karşı kontrollü boyut ve daha yüksek spesifik yüzey alanı sağlama avantajlarına sahiptir. Bununla birlikte, yöntemin yüksek enerji gereksinimi, uzun işlem süresi ve spreyle kurutmaya kıyasla 30-50 kat daha yüksek maliyet gibi dezavantajları da vardır (Burgain ve diğerleri, 2011). Semyonov ve diğerleri (2011) taşıyıcı madde olarak maltodekstrin ve trehaloz kullanılarak spray dondurularak kurutma yoluyla *L. paracasei*'yi kapsüllenmiştir. Teknik, bir *L. paracasei* çözeltisi içeren doğrudan sıvı azot üzerine spray damlacıklarının püskürtülmesinden ve dondurulmuş damlacıkların liyofilizasyon yoluyla kurutulmasından ibarettir. Bu tekniği kullanırken sadece liyofilizasyon kullanımına göre daha iyi bakteri canlılığı gözlemlenmiştir. Diğer bir teknik, bir odadaki zıt yönlerden akan aljinat ve CaCl_2 çözeltilerinin aerosollerine dayanmaktadır (Sohail ve diğerleri, 2011). Teknik, bir sıvı bakteri kültürünün %2 sodyum aljinat çözeltisi ile karıştırılmasından ve daha sonra çözeltinin bir pleksiglas silindirin üst kısmına ve altta 0,1 M CaCl_2 çözeltisi içine pompalanmasından oluşur. Aljinat çözeltisi damlacıkları ile temas halinde CaCl_2 ve mikrokapsüllerin toplandığı odanın dibine düşer. Sohail ve diğerleri, (2011) bu tekniği kullanarak *L. rhamnosus* GG ve *L. acidophilus* NCFM'i kapsüllenmiş ve

geleneksel ekstrüzyon yöntemiyle elde edilenlerden daha düşük kapsül boyutları bildirmiştir. Ek olarak, mikro kapsüller, benzetilmiş bağırsak koşullarına canlılığı artırarak, kitosan ile kaplanmıştır.

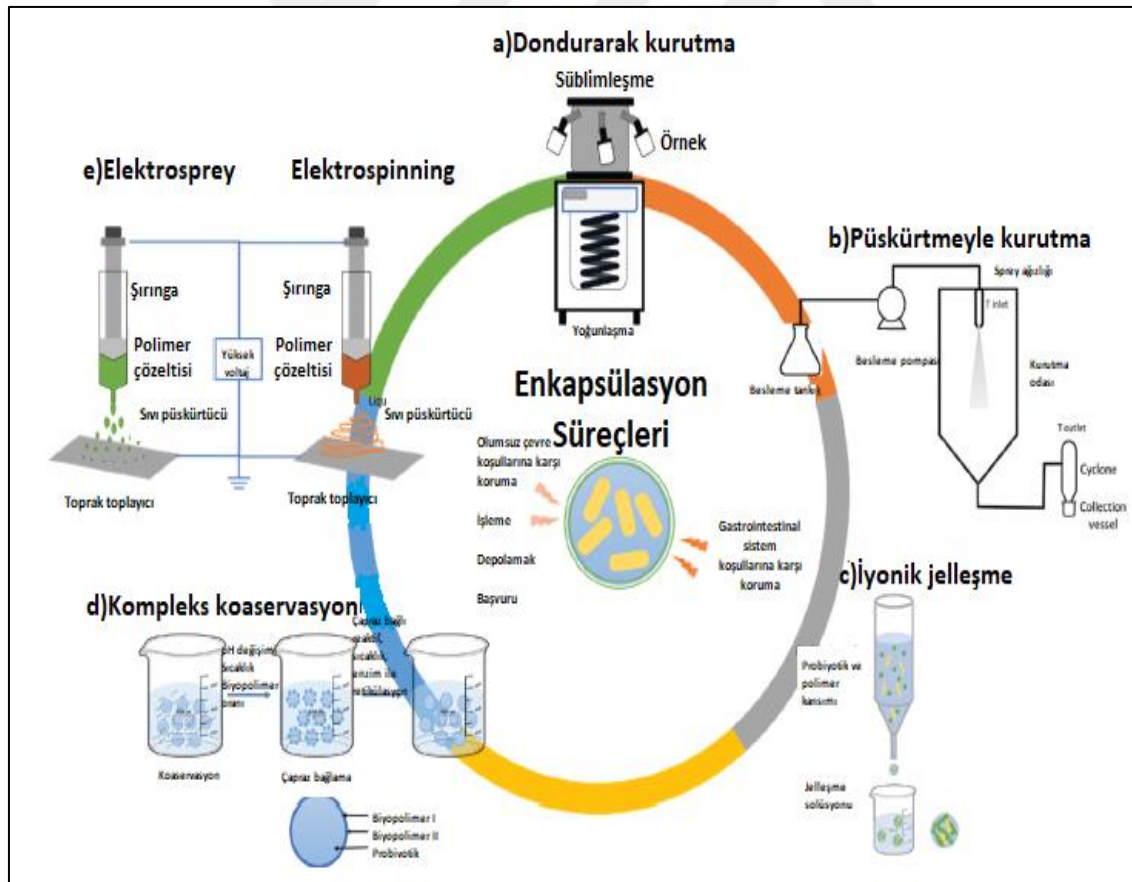
2.4.5. Dondurarak kurutma

Dondurarak kurutma, bir numuneden suyun süblimleştirilmesi işlemidir. Liyofilizasyon, probiyotiğin taşıyıcı malzeme ile birlikte (tipik olarak -30 ila 20°C arasında) dondurulması, ardından suyun 0.05 ila 0.1 mBar arasında mutlak basınç altında süblime edilmesi (-50 ila -30°C arasında) ile yapılmaktadır. Bu süreçte, probiyotik süspansiyon noktasının altında dondurulur. Daha sonra, donmuş su, azaltılmış basınç altında uzaklaştırılır (Martin ve diğerleri, 2015). (Şekil 2.6.). Dondurarak kurutma, uzun yıllardır toz halinde probiyotik üretmek için de kullanılmaktadır. Liyofilize edildikten sonra probiyotik aktivitesini korumak ve stabilize etmek için kriyoprotektanlar eklenmektedir. Depolama sırasında en yaygın kriyoprotektanlar laktoz, trehaloz, sorbitol, sukroz, süt proteini ve yağsız sütlerdir (Semyonov ve diğerleri, 2010). Liyofilizasyon yoluyla kapsüllenmiş probiyotikler, özellikle düşük sıcaklıklarda ve atıl atmosferde (azot veya vakum) daha iyi depolama kararlılığına sahiptir (Zuidam ve Nedovic, 2010). Ne yazık ki, liyofilizasyon spreyle kurutmadan 4 ila 7 kat daha pahalıdır (Chavez ve Ledebøer, 2007). Carvalho ve diğerleri, (2003) %11 yağsız süt içeren çözelti içindeki sorbitol ve monosodyum glutamatın liyofilize *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Enterococcus Durans*, *Enterococcus faecalis*'in depolanabilirliği üzerindeki etkisini araştırmıştır. Sorbitolün, çalışma sırasında incelenen bakterilerin hayatta kalması üzerinde güçlü bir koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, liyofilizasyon sırasında hücre canlılığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Liyofilizasyondan sonra monosodyum glutamat depolama sırasında LAB, canlılığında bir artış göstermiştir. Sonuç olarak, her koruyucu maddenin liyofilizasyon işlemi sırasında veya sonrasında belirli bir türün yaşayabilirliği üzerindeki etkisi, duruma göre bir gözlem tespit edilmektedir. Kriyoprotektanların (yağsız süt, sukroz ve laktoz), liyofilizasyon ve doğrudan liyofilizasyon sırasında probiyotik suşunun *Lactobacillus reuteri* C10'un hayatta kalma oranı üzerindeki etkisini incelemek için merkezi yüzey tasarımlı (yüzey) metodolojisini kullanıp kanatlı hayvanlara uygulama yapılmıştır (Khoramnia ve diğerleri, 2011). *L. reuteri* C10 birkaç probiyotik özelliğe sahip olarak karakterize edilmiştir. Tasarımda kullanılan merkezi noktalar %12,5 (ağırlık/hacim) yağsız süt, %8 (ağırlık / hacim) sakkaroz ve %12,5 (ağırlık/hacim) laktoz olarak belirlenmiştir.

Sonuçlar, farklı kriyoprotektan kombinasyonlarının mevcudiyetinin liyofilizasyon sırasında hücre canlılığı kaybını azalttığını göstermiştir.

Canlılık kaybı 0.26 ila 0.66 log cfu/mL arasında değişirken, kriyoprotektanlar olmadan 1,65 log cfu/mL değerleri gözlenmiştir. *L. reuteri* C10'un basılması ve depolanması için kriyoprotektanların optimal kombinasyonu %19,5 yağsız süt, %1 sukroz ve %9 laktoz ile elde edilmiştir. En iyi kriyoprotektanların kombinasyonunu kullanan ve 4-30°C'de 6 ay süreyle saklanan liyofilize *L. reuteri* C10'un hayatta kalma oranı %96,4 ve %73,8 tespit edilmiştir.

Piliç tavuklarını beslemek için liyofilize kültürler ile birlikte *Lactobacillus* takviyesinin kullanılması, *Lactobacillus* kültürlerinin varlığının vücut ağırlığını ve yem miktarını önemli ölçüde arttırdığını ve 0-6 hafta boyunca piliçlerin verim oranını artırdığını göstermiştir (Jin ve diğerleri, 1998).



Şekil 2.6. Enkapsülasyon süreçleri şematik gösterimi (Barajas Álvarez, González Ávila ve Espinosa Andrews, 2021)

Çizelge 2.3. Dondurarak kurutma ile kapsüle edilmiş probiyotiklerin simüle gastrointestinal koşullarının canlılığı üzerindeki etkisi

		Koşullar			GI koşulundan sonra canlılık (%)		Referanslar
Mikroorganizma ve Kapsül Materyalleri		(T°C)	P(ba r)	Dondurarak kurutma sonrası hücre canlılığı (%)	Kalın bağırsak	İnce bağırsak	
<i>L. rhamnosus</i>	WPI, inülin ve İran sakızı	-80	0.02	NR	> 85	> 90	Moayyedi ve diğerleri, 2018
<i>L. acidophilus</i>	Trehaloz, laktoz, yağsız süt, Na ₂ HPO ₄	-50	0.08	60-94	NR	NR	Shu ve diğerleri, 2018
<i>Lactococcus lactis</i>	Maltodekstrin, yağsız süt ve trehaloz	-35	NR	48-68	55-60	40-45	loyeau ve diğerleri, 2019
<i>L. plantarum</i> <i>L. acidophilus</i>	β-glukan ve hindiba fruktooligosakkaritler	-55	< 0.18	90-93	~ 94	88-90	da Silva Guedes ve diğerleri, 2019

a Depolama kararlılığını analiz etti. Kapsülleme verimliliği ve yaşayabilirliği logaritmik yüzde (%) ($N/N_0 \times 100$) olarak rapor edildi. NR, bildirilmeyen anlamına gelir.

Ne yazık ki, dondurarak kurutma, yüksek işletme, bakım, üretim ve enerji maliyetleri olan ekipman gerektirir. Bazen dondurma işlemi, buz kristallerinin oluşumu ve yüksek ozmolarite nedeniyle hücre zarına zarar verebilir (Martin ve diğerleri, 2015; Archacka ve diğerleri, 2019). Probiyotik canlılık, laktoz, trehaloz, maltodekstrin, sorbitol, sakaroz veya süt proteinleri gibi kriyoprotektanların eklenmesiyle korunur (Shu ve diğerleri, 2018). Dondurarak kurutma işlemi, gözenekli yapılar sahip partiküller üretir ve probiyotik hücreleri tozun yüzeyine daha yakın bir yerde hapseder. Bu yöntemi, karmaşık koaservasyon veya iyonik jelseyon gibi diğer kapsülleme teknikleriyle birleştirmek, probiyotik canlılığı geliştirir (Yao ve diğerleri, 2018; da Silva ve diğerleri, 2018).

Dondurarak kurutma yönteminde kapsül verimliliği

Dondurarak kurutma işlemi, kurutma ve depolamadan sonra probiyotik bakterileri stabilize etmek için uygun bir teknik olarak bildirilmiştir (Çizelge 2.3.). Kriyoprotektanlar, probiyotik hücre zarını ve hücre proteinlerini stabilize etmiştir (Archacka ve diğerleri, 2019; Shu ve diğerleri, 2018). Bu bileşenler, buz oluşumunun olumsuz etkilerini azaltır, dış ve iç ortamlar arasındaki ozmotik stresi azaltarak hayatta kalmayı artırmakadır (Archacka ve diğerleri, 2019; da Silva ve diğerleri, 2019). Archacka ve diğerleri (2019) kriyoprotektan olarak

trehaloz kullanarak dondurarak kurutma yoluyla *L. lactis*'in EE'sini iyileştirmiştir. Shu ve diğerleri (2018) kriyoprotektif ortama küçük miktarlarda sodyum fosfat eklenmesinin *L. acidophilus*'un hayatta kalmasını ve dolayısıyla enkapsülasyon etkinliğini iyileştirdiğini gözlemlemiştir.

Dondurarak kurutma yönteminde canlılık düzeyi

Dondurularak kurutulmuş probiyotiklerin canlılığı, saklama koşullarına, probiyotik bakterilere ve duvar malzemelerine bağlıdır. Genel olarak, 4°C'nin altında yüksek canlılık bulunurken, çevresel sıcaklıklar (yaklaşık 20 ila 30°C) yaygın olarak probiyotik canlılığı azaltır. Shu ve diğerleri, (2018) 25°C'de artan membran oksidasyon stresi ve hücre içi su aktivitesi nedeniyle probiyotik canlılığının önemli ölçüde azaldığını öne sürmüştür. *L. acidophilus*'un trehaloz, sodyum fosfat, laktoz ve yağsız süt kullanılarak -18°C'deki canlılığı, 4°C veya 25°C'deki canlılıktan daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Yakın zamanda, da Silva Guedes ve diğerleri, (2019) hindiba fruktooligosakkaritlerinin (FOS), *L. acidophilus* ve *L. plantarum* 49 için kullanılmış bira mayası β -glukanlarından daha yüksek koruma sağladığını ve 4°C'de 120 günlük depolamadan sonra membran hasarını azalttığını bulmuştur. Moayyedi ve diğerleri, (2018) 24 haftalık depolamadan sonra 25°C'de ve %11 bağıl nemde peynir altı suyu proteini izolatu (WPI) ve inülin ile kombinasyon halinde olan İran sakızı kullanarak *L. rhamnosus*'un canlılığını arttırdığını bildirmişlerdir. İran sakızının kapsül nem içeriğini azalttığını ve oksijen ve su buharının geçirgenliğini önlediğini öne sürmüşlerdir. Öte yandan, trehaloz hücre zarına bağlanabilir, dehidrasyon sırasında hücre yapısının stabilitesini sağlar, bu da 20, 4 ve -20°C'de 90 günlük depolamadan sonra *L. lactis*'in canlılığında önemli bir fark yaratmaz (Archacka ve diğerleri, 2019). Bu sonuçlar, kapsülleme ajanlarının, probiyotik suşun su aktivitesi ve sıcaklık gibi depolama koşullarının, probiyotik canlılığın artırılması için gerekli olduğunu göstermiştir. Dondurularak kurutulmuş probiyotiklerin hayatta kalması, duvar malzemelerinin zorlu koşullara maruz kalmayı önleyen bir tabaka oluşturma yeteneğine bağlıdır. Örneğin, Moayyedi ve diğerleri WPI, (2018) İran sakız ve inülin ile kapsül lenmiş *L. rhamnosus*'un, simüle edilmiş GI sıvılarına maruz kaldıktan sonra ~8 log CFU/g miktarı gösterdiğini bulmuştur. Aynı şekilde, Archacka ve diğerleri, (2019) trehaloz veya yağsız süt ile enkapsüle edilmiş *L. lactis*'in GI koşulları altında ~7 log CFU/g miktarı gösterdiğini bildirmiştir. Dondurarak kurutma, sonraki bölümlerde tartışıldığı gibi, kompleks koaservasyon veya iyonik jelasyon gibi diğer kapsülleme yöntemlerinden sonra kullanılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışma sürecinde hammadde olarak, Tween 80, maltodekstrin (Tito İzmir, Türkiye), , kakao tozu (Tito İzmir, Türkiye), şeker (Torku, Konya, Türkiye), kahve kreması (Nestle, İsviçre), inülin (Tito İzmir, Türkiye), polidekstroz (Tito İzmir, Türkiye), Mrs Broth (Himedia, Germany), Mrs Agar (Himedia, Germany), pepsin (Merck, ABD), safra tuzu (Merck, ABD), 0.45 µm şırınga filtre (Ptfe) ([FilterLab](#), India), sodyum aljinat (Sigma-aldrich, Almanya), kitosan (Roth, Macaristan), ve kalsiyum karbonat (Tito İzmir, Türkiye) kullanılmıştır.

Hammaddelerin işlenmesi için kullanılan ekipmanlar; etüv (Memmert, Almanya), pH metre (Thermo Scientific Orion Star A111, ABD), manyetik karıştırıcı (IKA, Almanya), vorteks (IKA, Almanya), santrifüj (Thermo, ABD), su banyosu (Memmert,Almanya), saf su cihazı (Millipore, ABD) hassas terazi (Pioneer, ABD), liyafilizatör (Labconco, ABD), çalkalayıcı (IKA, Almanya), pipet seti (Thermo, ABD), su aktivitesi ölçüm cihazı (Novasina, İsviçre), kolorimetre (ANOKA, Türkiye), buzen beki (Eurokurdola), drigalski spatülü (ISO Lab, Almanya), petri kabı (ISO Lab, Almanya), deney tüpü (ISO Lab, Almanya) ve mekanik karıştırıcıdır (Mtops, Türkiye).

3.2. Yöntem

3.2.1 Kültür aktivasyonu

Bakteriyel hücre süspansiyonu, Fritzen-Freire ve diğerleri, (2012) yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. -80°C’ de ependorf tüplerinde saklanan *L. paracasei* hücresi 200 µL MRS Agar (Himedia, Germany) içinde yeniden canlandırıldı ve 3 gün boyunca 37°C’de inkübe edildi. İlk alt-kültürleme ile canlı bakteri öze yardımıyla alınıp 400 mL taze steril MRS Brotha inoküle edilerek yeniden canlandırılmış kültüre ekimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Probiyotik mikroorganizmanın hazırlanması

Yıldırım (2016) ait çalışmada Özkul (2016) tarafından Amasya’da tüketime sunulan çiğ süt örneklerinden izole edilen ve identifikasyonu moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmış *L. paracasei subsp. paracasei* izolatı bu proje kapsamında kullanılmıştır. *L. paracasei subsp. paracasei* ‘nin enkapsülasyonu ve enkapsülasyon malzemesinin bakteri canlılığı üzerine etkili olan faktörler araştırılmıştır.

Stok kültür 100 mL MRS broth içerisine inoküle edilmiş ardından anaerobik ortamda 48 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından elde edilen bakteri süspansiyonu 10.000 rpm’de 4°C’de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek izole edilmiş ve iki kez %0,9 w/v tuzlu su çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkanan bakteriyel hücreler steril bir serum fizyolojik su içinde tekrar süspansiyon haline getirilerek hücre sayısı, üç kopya halinde MRS agar içerisinde yüzey plak tekniği kullanılarak belirlenmiştir. 37°C’de 48 saat inkübasyonun ardından *L. paracasei subsp. paracasei* suşu $\sim 10^9$ kob/ml’ye çoğaltılması sağlanmış ve böylece ileride yapılacak olan işlemlerde inkübasyon sonundaki sayıları belirlemek üzere başlangıçtaki yaklaşık mikroorganizma sayısının tespit edilmesi sağlanmıştır (Ortakçı 2012; Krasaekoopt ve Watcharapoka, 2014).

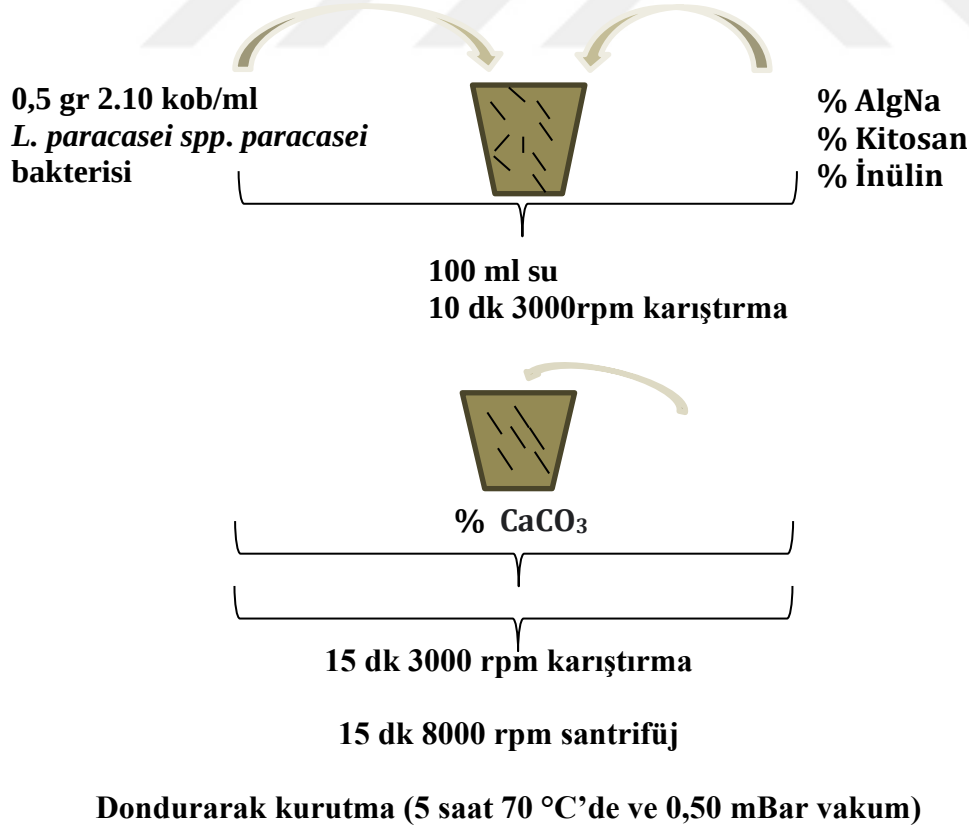
3.2.3 *L. paracasei*’nin enkapsülasyonu

Kapsülleme prosedürü, Trabelsi ve arkadaşları (2013) tarafından oluşturulan prosedürde değişiklikler yapılarak tanımlanmıştır. Kapsülleme prosedüründe *L. paracasei subsp. paracasei* kültür konsantratinin enkapsülasyonu için kullanılan kaplama materyalleri sodyum aljinat, inülin, kitosan ve kalsiyum karbonattır. *L. paracasei subsp. paracasei* kültür konsantratinin enkapsülasyonu için kullanılan kaplama materyalinin bileşim oranı merkezi karmaşık tasarımına göre dizayn edilmiştir. Enkapsülasyon üretiminde yanıt yüzey yönteminin belirlediği oranlara göre 18 adet formülasyon hazırlanmıştır. 2 gr $\sim 10^9$ kob/ml’ye çoğaltılmış olan *L. paracasei* kültür konsantrati sulu sodyum aljinat çözeltisi içerisine transfer edilmiş ve ardından sırasıyla kitosan çözeltisi (kitosan çözeltisi 0,1 M asetik asit çözeltisi ile hazırlandı ve 1 M NaOH kullanılarak pH 6.0’a ayarlandı) ve sulu inülin çözeltisi eklenerek 10 dk 3000 rpm’de karıştırılmıştır. Bu işleme müteakip son olarak sulu kalsiyum karbonat çözeltisi ilave edilmiş ve laboratuvar karıştırıcısı kullanılarak 3000 rpm’de 15 dakika süreyle immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde sulu sodyum aljinat çözeltisi ile ilave edilen *L.*

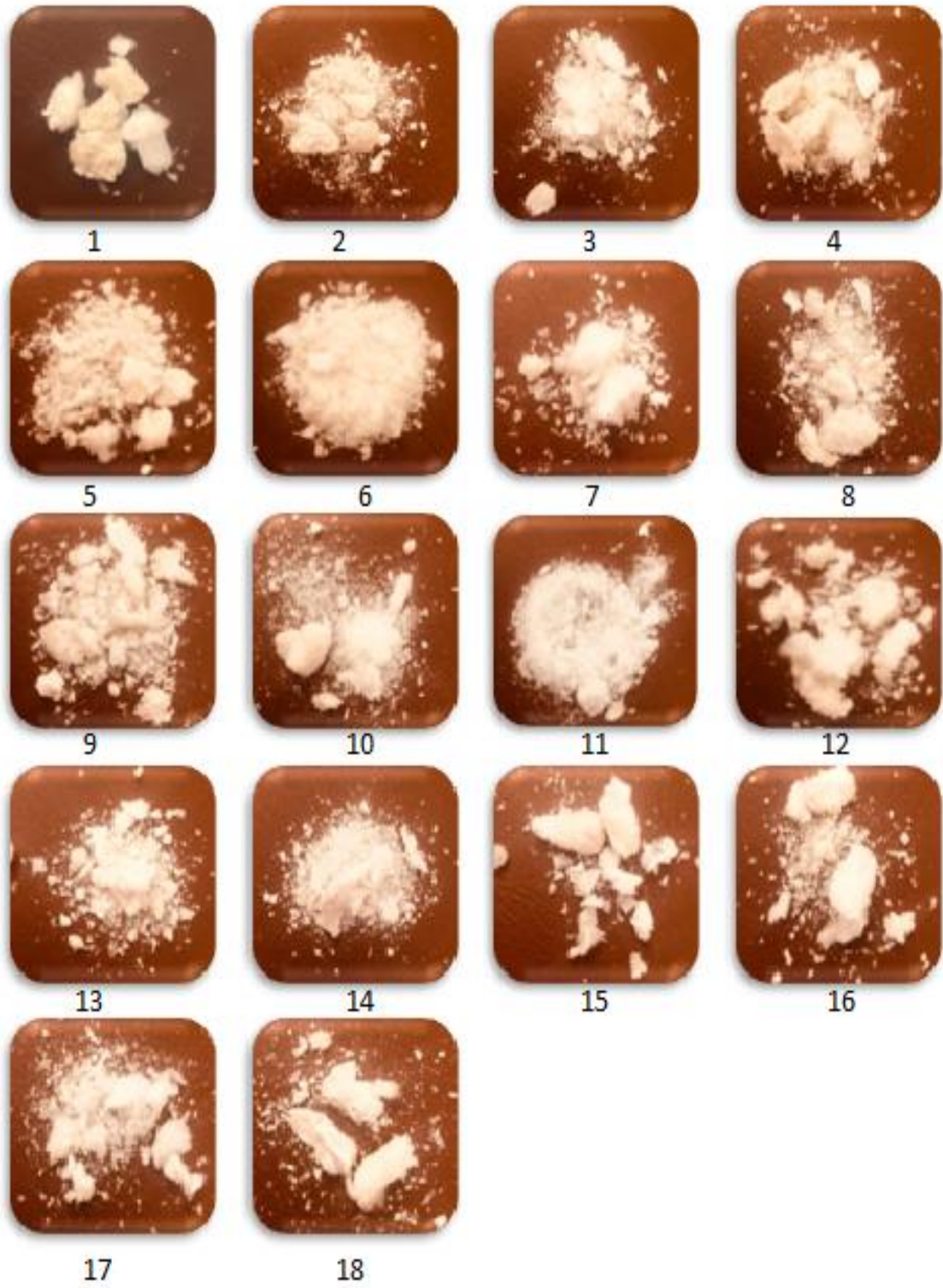
paracasei'nin kültür konsantratının kaplama materyalinin içerisine iyice dağılması sağlanmıştır. Karıştırma işleminden sonra, mikrokapsüller, 15 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüjleme yoluyla izole edilmiştir. Elde ettiğimiz kaplanmış bakteri süspansiyonu, dondurularak kurutma işlemi için -20°C'de saklanmıştır. Çalışmada kullanılan kapsülleme işleminin şematik diyagramı Şekil 3.1.'de gösterilmektedir. Enkapsüle edilmiş *L. paracasei subsp. paracasei* bakterilerinin fotoğrafı Resim 3.1. 'de gösterilmiştir.

3.2.4 Dondurarak kurutma enkapsülasyon yöntemi

Bakteri yüklü kapsüller 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisinde 10 ml ölçüm birimine kadar yaş santrifüj işlemi uygulanmış enkapsüle bakteri liyofilizasyon cihazına yerleştirilmiştir. Kurutma liyofilizasyon işlemiyle gerçekleştirildi. Kurutucuda 5 saat 70°C'de ve 0.050 mBar vakumda dondurularak kurutulmuştur (Şekil 3.1). Kapsüller daha sonraki deneyler için 4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Enkapsülasyon prosedürü



Resim 3.1. Enkapsüle bakteri son ürünleri

3.2.5 *L. paracasei*'nin enkapsülasyon kaplama materyallerinin optimize edilmesi

Proje kapsamında enkapsülasyon ajanlarının formülasyonu hazırlanmıştır. Duvar materyalinin bileşim oranının optimizasyonu, merkezi karmaşık tasarımına göre dizayn edilmiştir. Enkapsülasyon duvar materyali kuru karışımları bağımsız değişkenler olarak belirlenmiş ve sodyum aljinat (X_1), inülin (X_2), kitosan (X_3) ve kalsiyum karbonat (X_4) kullanılarak dört bileşenli kısıtlı bir karışım tasarımı geliştirilmiştir. Cevap Yüzey Metodu prensibi gereği, öncelikli olarak ön denemeler baz alınarak dört bileşenin deneysel tasarımı oluşturulmuş ve daha sonra asıl denemelere başlanmıştır. Bu kapsamda ön denemeler sonucunda değişkenlerin alt üst limitleri; sodyum aljinat (X_1 , %1-5), inülin (X_2 , %1-7), kitosan (X_3 , %0,5-2) ve kalsiyum karbonat (X_4 , %0,5-1,5) olacak şekilde belirlenmiştir. Dört faktörlü ve 2 seviyeli merkezi karmaşık tasarıma göre oluşturan bağımsız değişkenlerin, seviye aralıkları kod değerleri ve aktüel değerleri Çizelge 3.1 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Bağımsız değişkenlerin aralık ve seviyelerinin kod ve aktüel değerleri

Bağımsız değişkenler	Aralık ve Seviyeleri		
	-1	0	1
Sodyum aljinat	1	3	5
İnülin	1	4	7
Kitosan	0,5	1,25	2
Kalsiyum Karbonat	0,5	1	1,5

Çalışmada enkapsülasyon etkinliği, ısı toleransı, pH toleransı, simule mide ortamında canlılık düzeyi ve simule safra tuzun çözeltisinde bakterilerin canlılık düzeyi bağımlı değişken (Y) olarak seçilmiştir. Üç değişkenli ikinci dereceden merkezi karmaşık deney tasarım yöntemine göre enkapsülasyon ajanı bileşenlerini oluşturan bağımsız değişkenleri ve seviye aralıklarının aktüel değerleri Çizelge 3.2' de gösterilmiştir. Aşağıdaki uygun regresyon denklemi (1), bağımsız değişkenler ve cevaplar arasındaki ilişkiyi ifade eder.

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ij} X_{ij} + \dots \dots \dots \beta_j X_j + e \quad (1)$$

Denklemden Y cevap değişkeni, X_i ve X_j değişkenler ve β_0 kesişme katsayısıdır; β_i , β_{ij} , β_j sırasıyla doğrusal, ikinci dereceden ve ikinci dereceden terimlerin etkileşim katsayılarıdır; e bağımsız parametrelerin sayısını göstermektedir. Program tarafından oluşturulan 18 farklı formülasyon üretilmiş ve bütün denemeler 3 paralel şekilde gerçekleştirilmiştir.

Denemelerde kontrol numuneleri enkapsüle edilmemiş serbest *L. paracasei subsp.paracasei*'si kullanılarak analizler yapılmıştır. (Zaeim ve diğerleri, 2019; Samakradhamrongthai ve diğerleri, 2019).

Çizelge 3.2. Enkapsülasyon kaplama materyali ve aktüel değerleri

Deneme Noktası	Sodyum Aljinat X ₁ (%)	İnülin X ₂ (%)	Kitosan X ₃ (%)	Kalsiyum Karbonat X ₄ (%)
1	5	4	1,25	1
2	5	7	2	0,5
3	1	1	0,5	0,5
4	1	1	2	0,5
5	3	4	1,25	1
6	1	7	2	1,5
7	3	1	1,25	1
8	3	4	1,25	1,5
9	3	4	2	1
10	1	4	1,25	1
11	1	7	0,5	1,5
12	5	1	2	1,5
13	3	7	1,25	1
14	3	4	1,25	1
15	5	7	0,5	0,5
16	3	4	1,25	0,5
17	3	4	0,5	1
18	5	1	0,5	1,5

Bağımsız değişkenlerin (Sodyum aljinat, inülin, kitosan, kalsiyum karbonat) enkapsülasyon etkinliği, ısı toleransı, pH tolerans, simule mide ortamında canlılık düzeyi ve simule safra tuzun çözeltisinde da enkapsüle bakterilerin canlılık düzeyi üzerindeki doğrusal (Linear), iki faktörlü etkileşim (2FI) ve polinomial (Quadratic) etkileşim modelleri %95 güven aralığında F (Fischer) testi ile belirlenmiştir.

Her bir model için ANOVA ile belirlenen model regresyon katsayısı (R^2) ve F değeri, düzeltilmiş regresyon katsayısı (Adj- R^2), uyum eksikliği (lack of fit>0,1), tahminlenmiş çoklu regresyon katsayısı (Pre- R^2 >0,7), değişim katsayısı (C.V< 10) ve yeterli kesinlik (Adeq Precision>4) değeri gibi istatistiksel parametrelerine bakılarak model ile uyumuna karar verilmiştir. Elde edilen sonuçların 3D ve 2D grafikleri Design Expert 11.0 programı kullanılarak çizilmiştir.

3.2.6 Enkapsülasyon etkinliği

Kuru formdaki kapsüller içerisindeki bakteri düzeyini belirlemek amacıyla 0,5 g kapsül 99,5 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH 7,0) içerisine aktarılmış ve 15 dakika süresince stomacher cihazında homojenize edilmiştir. Bunu takiben uygun seri dilüsyonlar hazırlanmış ve MRS agar besiyeri kullanılarak yayma plak yöntemi ile 37°C’de 48 saat bekletildikten sonra canlı hücre sayımları belirlenmiştir (Ortakçı 2010). Sonuçların ortalamaları, numunenin gramı başına koloni oluşturan birimin logaritması alınarak (log kob/g) ifade edilmiştir. Test edilen örneklerin her birinin yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Serbest enkapsüle edilmemiş *L. paracasei subsp. paracasei*’si de kontrol örneği olarak 0,5 gr tartılmış ve aynı analizlere tabi tutulmuştur.

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği} = (N^*) / (N0^*) \times 100$$

N0*: kurumadan önce kuru madde gramı başına bakteri sayısı

N* : kapsülde kuru materyalin gramı başına bakteri sayısını ifade etmektedir.

3.2.7 Serbest ve kapsüllenmiş *L. paracasei*’nin ısı toleransı

Isı tolerans testi için, 0,5 g mikrokapsüllenmiş hücreler, süspansiyon ortamı olarak 10 ml serum fizyolojik içinde yeniden süspanse edilmiş daha sonra su banyosunda 90 saniye boyunca 70°C’ye ısıtılmıştır. Serbest enkapsüle edilmemiş *L. paracasei subsp. paracasei*’si de kontrol örneği olarak 0,5 gr tartılmış ve aynı analizlere tabi tutulmuştur. Isıl işleminden sonra, numuneler oda sıcaklığına (25°C) soğutulup canlı hücreler sayımı yapılmıştır (Ding ve Shah, 2007).

3.2.8 Serbest ve kapsüllenmiş *L. paracasei*’nin düşük pH stabilitesi

L. paracasei subsp. paracasei’nin düşük pH stabilitesi Ding ve Shah (2007) tarafından açıklanan yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Serbest veya mikrokapsüllenmiş hücreler (0,5 gr) pH’sı 2.0 (0,1 M HCl ile ayarlanmış) olan 4,5 ml MRS besiyeri içerisine ilave edilmiş ve 60 dk 37°C’de inkübe edilmiştir. Bunu takiben uygun seri dilüsyonlar hazırlanmış ve MRS agar

besiyeri kullanılarak yayma plak yöntemi ile 37°C’de 48 saat bekletildikten sonra canlı hücre sayımları belirlenmiştir (Ding ve Shah, 2007).

3.2.9 Simüle mide suyunda serbest ve kapsüllü bakterilerin canlılık düzeyi

Simüle edilmiş mide suyu bazı modifikasyonlarla tarif edilen yöntemle göre hazırlanmıştır (Z. Guo ve diğerleri, 2009). Tuzlu su çözeltisi içerisinde 0,1 N HCL ile pH 3,0’a olacak şekilde ayarlanmış ve 121°C’ de 15 dakika boyunca sterilize edilmiştir. Pepsin çözeltisi hazırlanıp 0,45 µm filtre ile sterilize edilmiş ve 3 g/L nihai konsantrasyonda tuzlu su ile karıştırılmıştır. 0,5 g mikro kapsüllenmiş bakteri 9,5 ml simüle edilmiş mide suyuna aktararak ve 37°C’de 3 saat boyunca 160 rpm’de orbital çalkalama altında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra uygun seri dilüsyonlar hazırlanmış ve MRS agar besiyeri kullanılarak yayma plak yöntemi ile 37°C’de 48 saat bekletildikten sonra canlı hücre sayımları belirlenmiştir (Ding ve Shah, 2007). Canlı bakteriler sayılıp ve hayatta kalma oranı (%) hesaplanmıştır.

$$\text{Hayatta kalma oranı (\%)} = 100 \times (N_1/N_0)$$

N_1 = mide suyu ile olan işlemden sonrası toplam canlı suş sayısı (log CFU/g)

N_0 = işlemden önceki toplam canlı suş sayısı (log CFU/g)

3.2.10 Simüle safra tuzun çözeltisinde serbest ve kapsüllü bakterilerin canlılık düzeyi

Safra toleransı, Bao ve diğerleri, (2010) tarafından açıklanan yöntemle göre incelenmiştir. MRS ortamında %0,6’lık 9 ml hazırlanmış safra tuzu çözeltisine 0,5 g kapsüllenmiş *L. paracasei subsp.paracasei* inoküle edilerek 160 rpm’de orbital çalkalama altında 24 saat boyunca 37°C’da inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra uygun seri dilüsyonlar hazırlanmış ve MRS agar besiyeri kullanılarak yayma plak yöntemi ile 37°C’de 48 saat bekletildikten sonra canlı hücre sayımları belirlenmiştir (Ding ve Shah, 2007). Canlı bakteriler sayılarak hayatta kalma oranı (%) hesaplanmıştır.

3.2.11. Nem miktarı

Mikrokapsüllerin nem içeriği, ağırlık dengesine ulaşmak için 105°C'de 90 dk boyunca etüvde kurutularak gravimetrik olarak belirlenmiştir (Rajam ve diğerleri, 2012). Ortalama nem içeriği aşağıdaki denklemle belirlenmiştir.

$$\text{Nem (\%)} = [(M_1 - M_2) / M_1] * 100$$

M₁: ıslak kapsüllerin ağırlığı

M₂: kuru kapsüllerin ağırlığı

3.2.12 Renk tayini

Enkapsülasyonu tamamlanmış kapsüllerin renk değerleri kolorimetre cihazı ile belirlenmiştir. Örneklerin L (parlaklık), a (± kırmızı-yeşil) ve b (± sarı-mavi) değerleri ölçülmüştür (Arepally ve diğerleri, 2019).

3.2.13. SEM (Taramalı elektron mikroskobu)

L. paracasei hücreleri yüklü kapsüllerin enine kesitleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Philips XL 20, Oregon, USA) ile analiz edildi. Karışımlarda tutulan *L. Paracasei*'in görüntüsünü yakalamak için 4, 10, 40 ve 100 objektif lensli bir optik mikroskop (Olympus BX61) kullanılmıştır.

3.3 Toz Prebiyotik Çikolata Karışımının Hazırlanması

Doğan ve diğerleri (2011) tarafından oluşturulan prosedürde değişiklikler yapılarak içecek üretimi hazırlanmıştır. İçecek hazırlama prosedürüne göre homojen bir karışım elde etmek için şeker 6000 rpm'de 5 dk öğütülerek partikül boyutu küçültülmüştür. Formülasyonlarda kullanılacak granüle şekerin ortalama parçacık çapı 100 µm ve daha düşük çapa sahip şeker kullanılmıştır. Bu kapsamda toz içecek üretiminde kahve kreması (2 gr), şeker (5gr), kakao tozu (6gr) sabit oranlarda kullanılmış olup toplam karışım miktarı 36 gr olarak belirlenmiştir. Bunun dışında ürün kalitesine etki edecek 23 gr olan kuru bileşenler bağımsız değişkenler

olarak belirlenmiştir. Bunlar inülin, polidekstroz ve maltodekstrin olup optimum oranları karışım tasarımı yöntemi ile belirlendikten sonra Çizelge 3.3.'de belirtilen oranlarda tartılıp toz içeceklerin hazırlanması amacıyla kuru malzemelerin tümü karıştırılmıştır.

Çizelge 3.3. Prebiyotik kakaolu içecek formülasyonu

Materyal	Kullanım düzeyi (gr)
Şeker	5
Kahve Kreması	2
Kakao tozu	6
İnülin	Çizelge 3.4
Polidekstroz	Çizelge 3.4
Maltodekstrin	Çizelge 3.4

3.3.1. Toz prebiyotik çikolata karışımının deney tasarımı ve optimizasyonu

Simplex-lattice, simplex-centroid, axial design, ve D-optimal tasarımı dahil olmak üzere birden fazla karışım dizaynı bulunmaktadır (Mohamad Zen ve diğerleri, 2015). Bu çalışmada bileşenlerin optimizasyonu için karışım tasarımı (simple-mixture) kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında üç bağımsız değişkenin alt üst limitlerini belirlemek için ön denemeler yapılmış ve üç bileşenin deneysel tasarımı oluşturularak daha sonra asıl denemelere başlanmıştır. Araştırma kapsamında bağımsız değişken olarak inülin ($X_1;0-1$), polidekstroz ($X_2;0-1$) ve maltodekstrin ($X_3;0-1$) seçilmiş ve bu bileşenler ile kısıtlı bir karışım tasarımı $X_1 + X_2 + X_3 = 1$ olacak şekilde geliştirilmiştir. Bu kapsamda 3 faktörlü ve 3 seviyeli basit regresyon modelleri oluşturulmuştur. İçecek üretiminde karışım tasarımının belirlediği oranlara göre 13 adet formülasyon hazırlanmıştır. Çizelge 3.4'de prebiyotik bileşenlerin kod ve gerçek değerleri ve çikolatalı toz içeceğin formül deneysel tasarımı gösterilmektedir. Toz prebiyotik çikolatalı içeceklerin görselleri Resim 3.2. 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Bağımsız değişkenlerin kod ve gerçek değerleri

Deneme Noktası	Kodlanan değerler			Gerçek değerler (g /36 g)		
	Şeker	Kahve Kreması	Kakao tozu	İnülin (X ₁)	Polidekstroz (X ₂)	Maltodekstrin (X ₃)
1	0	1	0	0	23	0
2	0,166667	0,166667	0,666667	3,68	3,68	15,64
3	1	0	0	23	0	0
4	0,5	0	0,5	11,5	0	11,5
5	1	0	0	23	0	0
6	0	1	0	0	23	0
7	0	0	1	0	0	23
8	0,333333	0,333333	0,333333	7,66	7,66	7,66
9	0	0,5	0,5	0	11,5	11,5
10	0,166667	0,666667	0,166667	3,68	15,64	3,68
11	0	0	1	0	0	23
12	0,5	0,5	0	11,5	11,5	0
13	0,666667	0,166667	0,166667	15,64	3,68	3,68

Analiz sonucunda elde edilen bağımlı değişkenler ise suda çözünür kuru madde (Y1), HR, Cl (Y2), kütle yoğunluğu (Y3), ıslanma süresi (Y4), renk (Y5) ve duyu analizi (Y6) değerleri olarak belirlenmiştir. Toz prebiyotik çikolata karışımının hazırlanmasına özgü değişkenlerinin yanıt değişkeni üzerine etkisi incelenerek en yüksek değerlere sahip içecek ‘desirability’ fonksiyon yaklaşımına göre optimize edilmiştir. Toz prebiyotik çikolata karışımının hazırlanması işlemleri sonucunda elde edilen yanıtların regresyon analizi için Eşitlik (2)’de verilen model kullanılmıştır.

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ij} X_{ij} + \dots \dots \dots \beta_j X_j + e \quad (2)$$

Denklemden Y cevap değişkeni, X_i ve X_j değişkenler ve β₀ kesişme katsayısıdır; β_i, β_{ij}, β_j sırasıyla doğrusal, ikinci dereceden ve ikinci dereceden terimlerin etkileşim katsayılarıdır; ε bağımsız parametrelerin sayısını göstermektedir.

Bağımsız değişkenlerin (inülin, polidekstroz ve maltodekstrin) yanıtlar üzerindeki doğrusal (Linear), iki faktörlü etkileşimi (2FI) ve polinomiyal (Quadratic) etkileşimi modelleri % 95 güven aralığında F (Fischer) testi ile belirlenmiştir. Her bir model için ANOVA ile belirlenen model regresyon katsayısı (R²) ve F değeri, düzeltilmiş regresyon katsayısı (Adj-R²), uyum eksikliği (lack of fit>0,1), tahminlenmiş çoklu regresyon katsayısı (Pre-R²>0,7), değişim katsayısı (C.V<10) ve yeterli kesinlik (Adeq Precision>4) değeri gibi istatistiksel

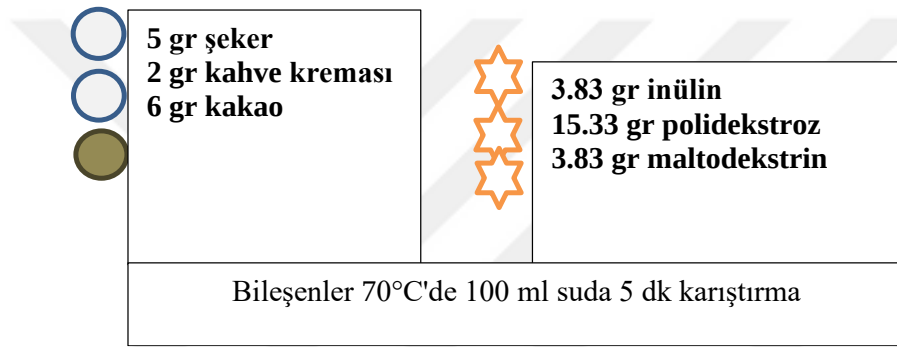
parametrelerine bakılarak model ile uyumuna karar verilmiştir. Elde edilen sonuçların 2D grafikleri Design Expert 11.0 programı kullanılarak çizilmiştir.



Resim 3.2. Toz prebiyotik kakaolu içecek fotoğrafları

3.3.2 Probiyotik ikolata karışımı üretimi

Prebiyotik toz çikolatalı içecekler için son ürün kalitesini sağlayan optimum bileşen düzeylerinin oranları belirlendikten sonra probiyotik bakteri kullanım düzeyinin belirlenmesi için ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Optimum enkapsülasyon duvar materyali belirlenerek kapsüle edilen *L. paracasei* yapılan ön denemeler sonucunda kullanım düzeyi 1gr olacak şekilde toz probiyotik kültür kuru karışımına ilave edilmiştir. Anında özünür çikolata üretimi Şekil 3.2.'de gösterilmiştir. Probiyotik prebiyotik toz ieğin gastroentistinal sistem stabilitesini belirlemek için analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Anında özünür çikolata üretimi

3.4 Toz İçecek Analizleri

3.4.1. Toz içecek örneklerinde pH tayini

Toz içecek örneklerinin pH değerleri, oda sıcaklığında pH metre (Thermo Scientific- Orion Star A211) kullanılarak gerçekleştirilmiştir

3.4.2. Toz içecek örneklerinde su aktivitesi tayini

Toz örneklerin su aktivitesi(a_w) değerleri Ostrowska-Ligeza ve Lenart (2015) tarafından uygulanan yöntem ile su aktivitesi cihazında (Novasina LabSwift, İsviçre) 25°C'de ölçümler yapılmıştır.

3.4.3. Toz içecek örneklerinin ıslanma süresi tayini

Islanma süresi, gıda tozlarının anlık özelliklerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Toz numunenin ıslanma süresi Shittu ve diğerleri (2007) tarafından oluşturulan yöntemde değişiklikler yapılarak belirlendi. Islanma süresi, tüm tozun ıslanması ve 25°C'de damıtılmış suyun yüzeyine nüfuz etmesi için gereken süre (saniye olarak) olarak kabul edildi. Buna göre 25°C'de 100ml'lik damıtılmış su mezüre döküldü. Toz numune (2 g) mezürün üzerinden eklendi ve kronometre çalıştırıldı. Tozun tamamen ıslanması için geçen süre kaydedildi. 100 ml distile su içerisine 2 g toz içecek karışımı ilave edilmiş ve dijital mekanik karıştırıcı (330 rpm, 20s) ve bir "heliks" kullanılarak karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. Toz içecek örneklerinde suda çözünür kuru madde tayini

Numunelerin çözünür kuru madde içeriği, oda sıcaklığında otomatik bir refraktometre (Reichert AR 700, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar 25°C'de Brix derecesi olarak ifade edildi. ((Horwitz ve Latimer 2000; Doğan ve diğerleri, 2015).

3.4.5. Toz içecek örneklerinde çözünmeyen bileşim oranının belirlenmesi

Toz içecek örneklerinin çözünmeyen bileşim oranını, Vissotto ve diğerleri (2006) tarafından uygulanan yöntem ile belirlenmiştir. Bu doğrultuda 150 ml distile su içerisine 20 g toz içecek karışımı ilave edilmiş ve dijital mekanik karıştırıcı (330 rpm, 20s) ve bir "heliks" kullanılarak karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen çözelti, bir buhner hunisi ve vakum konik şişesi içeren bir vakum sisteminde filtrelenmiştir. Kâğıt üzerinde tutulan kütle, bir fırında (60°C) sabit ağırlığa kadar kurutulup daha sonra bir analitik terazi üzerinde tartılmıştır. Çözünmezlik (% kuru bazda), kâğıtta tutulan numunenin kütlesi çözünmemiş olan ve numunenin başlangıç kütlesi arasındaki orandan elde edilmiştir.

3.4.6. Toz içecek örneklerinde yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk, carr indeks ve hausner oranı belirlenmesi

Toz içecek karışımların yığın yoğunluğun tespit edilebilmesi için 10 ml'lik mezür içerisine herhangi bir basınç uygulamaksızın toz ürünler yüklenmiştir. Yığın yoğunluk değeri, toz

içecek karışım kütlelerinin mezürde doğrudan okunan hacime oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Daha sonra, sıkıştırılmış yoğunluk (r kılavuzlu) ölçümü için toz örneğin eklendiği mezürün manuel olarak sert bir zemin üzerine 200 kez vurulmasıyla tespit edilmiştir. Numunenin kütlelerinin vurma işleminden sonra okunan hacime oranına göre hesaplanmıştır (Carr, 1965; Hausner, 1967). Tozun akışkanlığı ve yapışkanlığı sırasıyla Carr indeksi (CI) ve Hausner oranı (HO) açısından değerlendirilmiştir. Hem CI hem de HO oranı değerleri sırasıyla denklem (3) ve (4) kullanılarak tozun yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yoğunluk verileri kullanılarak hesaplanmıştır:

$$CI = (Psıkıştırılmışyoğunluk - Pkütleyoğunluk) / Pkütleyoğunluk \quad (3)$$

$$HO = (Psıkıştırılmışyoğunluk / Pkütleyoğunluk) \quad (4)$$

Tozun akışkanlığının ve yapışkanlığının sınıflandırılması sırasıyla CI ve HO değerlerine göre yapılmıştır. CI değeri < 15 çok iyi akışkanlık, 15-20 iyi ve > 35 kötü akışkanlığı göstermektedir. Benzer şekilde 1.0–1.1'lik bir Hausner Oranı, mükemmel akıcılık, 1.12–1.18 iyi akışkanlık ve 1.19–1.25 orta düzeyde akıcılık anlamına gelmektedir.

3.4.7. Toz içecek örneklerinde su tutma ve suda çözünürlük özellikleri

Örneklerin su tutma ve suda çözünürlük özellikleri belirlenirken Reddy, Suriya ve Haripriya (2013) tarafından belirtilen yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla darası kaydedilmiş olan santrifüj tüplerine 0,5g örnek tartılıp üzerlerine 6 ml distile su ilave edilmiştir. 30°C'de 30 dakika boyunca, her 10 dakikada bir çıkartılıp vorteksenerek su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkartıldıktan sonra 5000rpm hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısmı daha önceden sabit tartıma getirilmiş olan petrilere aktarılıp 105°C etüvde 4 saat kurutulmuştur. Santrifüj tüpünde kalan yaş kısım tartıldıktan sonra hesaplamalar yapılmıştır. Analizler iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Suda çözünürlük (\%)} = \frac{\text{Sıvı kısımda çözünmüş madde miktarı tartılan örnek miktarı} \times 100}{\text{Tartılan örnek miktarı}}$$

$$\text{Su tutma kapasitesi} = \frac{\text{Yaş kalıntı miktarı tartılan örnek miktarı} \times 100}{\text{Tartılan örnek miktarı} - \text{çözünmüş madde miktarı}}$$

3.4. 8. Toz içecek örneklerinde renk analizi

Toz içecek örneklerinin renk değerleri (L^* ; koyu-parlak, a^* ; yeşillik-kırmızılık ve b^* ; mavi-lik-sarılık) renk tayini cihazı (Konica Minolta CR-5, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir.

3.4.9 Toz içecek örneklerinde duysal analiz

Toz ikolata içecek örneklerinde incelenecek duysal parametreler; asitlik, acılık, tatlılık, yağlılık, kakao tadı, partikül büyüklüğü, ağızda erime, pürüzsüzlük, parlaklık, ağızda kalan son tat, olup ‘‘oklu Kıyaslama Tekniği’’ ile incelenmiştir (Ricci ve diğerleri 2011). Duysal analiz çalışmasında belirlenen özellikler ve puanları; 1 (Mevcut değil), 2 (Zor algılanabilir), 3 (Hafif, belirgin), 4 (Orta, tanınabilir), 5 (Açıkça fark var), 6 (İlımlı, baskın) ve 7 (Güçlü, belirgin, görünen) 8 (ok iyi, içecek için arana zellik), 9-10 (Oldukça iyi, içecek için arana özellik) olarak belirlenmiş ve panel öncesi gerçekleştirilen açıklamalar esas alınarak puanlamaları istenmiştir. Örnekler, rastgele seçilmiş üç basamaklı sayılar ile kodlanarak sunulmuş ve değerlendirmeler arasında ağızlarını alkamaları için içme suyu ve ekmek verilmiştir. Duysal değerlendirmede kullanılan form ise izelge 3.5.’ de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Duysal değerlendirme formu

rnek Kodları	
zellikler	
Görünüş	Asılı Parçacıklar
Tekstür	Büzücü
	Kremsi
	Kıvam
Tat/	Bitter
Aroma	Tatlı
	Sütlü
	Kakao
	Asit
	Dengeli
Renk	Renk
Koku	Sütlü
	Kakao
Genel kabul edilebilirlik	

Tez kapsamında hazırlanan örneklerde duysal özellikleri değerlendirmek için Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı personel ve lisansüstü öğrencilerinden 10 panelist

seçilmiştir. Duyusal değerlendirmede panelistlerin yaş dağılımı 20-35 arasında iken cinsiyet dağılımı ise 4 kadın, 6 erkek yer almıştır. Panelistler örnekleri Çizelge 3.5.'de belirtilen özellikleri değerlendirmiştir. Panelistler kakaolu içeceklerin özelliklerini değerlendirilmesi ve kalite parametreleri için tanımlayıcı analizler açıklanmıştır. Panelist eğitimi için Çizelge 3.6'da verilen tanımlamalar belirlenmiş ve analiz öncesi eğitimde bu konuda panelistler bilgilendirilerek eğitime tabii tutulmuşlardır.

Çizelge 3.6. Kakaolu içeceklerde duyusal özelliklerin tanımlamaları

Duyusal Özellikleri		Tanımlayıcı Bilgi
Görünüş	Asılı parçacıklar	Karıştırma sonrası içekte görünen yüzen parçacıkların sayısı
	Yüzeyde yağ damlacıkları	Ön ışık ve yüzey parlaklığı ile görülebilen kremalı damlacıklar
Koku	Sütlü	Taze sütü hatırlatan koku
	Kakao	Kakao tozu ve çikolata kokusunu çağrıştırma (bitter ve sütlü çikolata dahil)
	Karamel	Tatlımsı izlenim, genellikle şekerin ısıtılmasından kaynaklanan
	Su ve diğerleri	Taze ıslak toprağı andırması, Havalandırma eksikliğinin bir sonucu olarak bıraktığı izlenim
Tat	Tatlı	Sakaro, glikoz veya fruktoz çözeltisiyle karakterize edilen temel bir tat
	Bitter	Asitle eşanlamlı olmayan, Organik asitler, fenoller, tanenler veya kavurma maddeleriyle karakterize edilen birincil tat.
	Sütlü	Taze sütü anımsatan tat,
	Kakao	Kakao tozu ve çikolata kokusunu çağrıştırma (Bitter ve Sütlü çikolata dahil)
	Asit	Bir organik asit çözeltisi ile karakterize edilen temel bir tat
	Dengeli	Tanımlanabilir özelliklerin hiçbirinin daha ağır basmaması
	Büzücü/sert	Oral mukozal yüzeyin kasılması. Neredeyse ağız bölgesinde kuruma etkisi gibi olan tat sonrası duyunun karakteristiği
Tekstür	Kremi	Ağız içinde kremi / yağlı bir his uyandıran homojen bir ürün gibi film oluşumu. Bir içeceğin fiziksel özelliklerini açıklar. Yoğun vücut, zayıf olmanın aksine güçlü bir tam ağız hissinin tanımlanması
	Kıvam	Ağızda yoğun ve seyreltik his
	Renk	Açık kahverengiden koyu kahverengiye kadar değişen tipik çikolata rengin yoğunluğu (ton)

4. BULGULAR

4.1. Enkapsüle *L. paracasei* Örneklerinin Su Aktivitesi ve Kuru Madde Özellikleri

Bu çalışma kapsamında dondurarak kurutma yöntemi ile farklı kaplama materyallerinin farklı konsantrasyonlarda kullanılarak *L. paracasei* probiyotik bakterisinin enkapsülasyonunu su aktivitesi ve kuru madde parametreleri saptanmıştır.

Kapsülleme, hassas bileşenlerin homojen veya heterojen bir matriste (Nazzaro, Orlando, Fratianni ve Coppola, 2012) nem, sıcaklık, mekanik hasar, geçirgenlik ve pH'a reaktiflerinden ve/veya tuzların varlığından korunmasına izin veren bir teknolojidir (Kashappa, Desai ve Park, 2005). Bu anlamda hücre kapsülasyonu, probiyotik mikroorganizmaların olumsuz koşullara karşı direncini artırabilir. Uygun kapsülleme materyallerinin seçimi de üretilen partiküllerin stabilitesi için önemlidir. Bu malzemeler toksisite göstermemeli ve hücre hasarını destekleyen ortamlara karşı kapsülasyonu mikrobiyal hücreleri korumalıdır (Kim ve diğerleri, 2017).

Farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat, inülin, kitosan ve kalsiyum karbonat kullanılarak *L. paracasei* kapsüle edilmiş ve bu üretilen örneklerin kuru madde, su aktivitesi ve renk özelliklerinin varyans analizleri ve çoklu karşılaştırma testi belirlenmiş olup Çizelge 4.1 ve 4.2'de verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan materyaller ile enkapsüle edilen *L. paracasei* örneklerinin su aktivitesi değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere enkapsüle *L. paracasei* örneklerinin su aktivitesi değerleri $0,35\pm0,05$ – $0,38\pm0,01$ arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Ek olarak, aljinat, kitosan, inülin, kalsiyum karbonat partikülleri, ortamın bağl nemine bağlı olarak depolama sırasında daha fazla stabilize sağlayabilen daha düşük su aktivitesi değerleri göstermiştir. Bu etki enkapsüle probiyotik bakteri gibi diğer toz ürünlerde de ulaşılmak istenen bir değerdir. Genel olarak, 0.6 veya daha düşük su aktivitesine sahip tozların genellikle mikrobiyolojik ve biyokimyasal yönlerden güvenli olduğu kabul edilmektedir (Kumar ve diğerleri, 2017). Benzer bir çalışmada, *S. boulardii* suşunun dış iyonik jelleştirme tekniği ile mikrokapsülasyonu ve kaplama materyali olarak aljinat ve aljinat kitosan karışımının kullanılması sonucu sırasıyla su aktivitesi 0,279 ve 0,267 olarak tespit edilmiştir (Santos ve Machado, 2020). Kalita ve diğerleri, (2008) litchi suyunda maltodekstrin ve *Lactobacillus plantarum* ile

birlikte prebiyotikler püskürtülerek kurutulmuş toz ve probiyotik canlılık özellikleri üzerine yaptıkları çalışmada su aktivitesinin 0,171 ile 0,564 değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir. Buna karşılık, püskürtülerek kurutulmuş süt tozlarında probiyotiklerin stabilitesi için 0,2 ile 0,6 arasında a_w önerilmiştir (Corcoran, Ross, Fitzgerald, Dockery ve Stanton, 2006). Gözenek içermeyen, pürüzsüz yüzeye sahip olması kaplanmış mikrokapsüllerin koruyucu özelliğini artırmaktadır (Zanjani ve diğerleri, 2014). Su aktivitesi mikropartiküllerin boyut, pürüzsüzlük özellikleri ve bunun yanı sıra hücrelerinin sayısı ve hayatta kalma oranını etkileyebilmektedir (Fritzen-Freire ve diğerleri, 2012).

Çizelge 4.1 Enkapsülasüle edilmiş *L.paracasei* probiyotik bakterisinin kuru madde, su aktivitesi değerleri

No	Sodyum Aljinat X ₁ (%)	İnülin X ₂ (%)	Kitosan X ₃ (%)	CaCO ₃ X ₄ (%)	Su Aktivitesi (a_w)	Kuru Madde (%)
1	5	4	1,25	1	0,37±0,02 ^a	1,50± 0,00 ^a
2	5	7	2	0,5	0,37±0,03 ^a	1,56± 0,14 ^a
3	1	1	0,5	0,5	0,37±0,02 ^a	1,56± 0,00 ^a
4	1	1	2	0,5	0,36±0,04 ^a	1,48± 0,56 ^a
5	3	4	1,25	1	0,35±0,05 ^a	1,54± 0,77 ^a
6	1	7	2	1,5	0,35±0,00 ^a	1,57± 0,28 ^a
7	3	1	1,25	1	0,36±0,01 ^a	1,50 ± 0,0 ^a
8	3	4	1,25	1,5	0,35±0,02 ^a	1, 55±0,03 ^a
9	3	4	2	1	0,36±0,03 ^a	1,49±0,00 ^a
10	1	4	1,25	1	0,36±0,03 ^a	1,58±0,56 ^a
11	1	7	0,5	1,5	0,37±0,08 ^a	1,59±0,35 ^a
12	5	1	2	1,5	0,37±0,09 ^a	1,48±0,51 ^a
13	3	7	1,25	1	0,37±0,07 ^a	1,51±0,62 ^a
14	3	4	1,25	1	0,38±0,01 ^a	1,50±0,03 ^a
15	5	7	0,5	0,5	0,37±0,00 ^a	1,50±0,80 ^a
16	3	4	1,25	0,5	0,35±0,04 ^a	1,55±0,95 ^a
17	3	4	0,5	1	0,36±0,0 ^{3a}	1,59±0,44 ^a
18	5	1	0,5	1,5	0,36±0,05 ^a	1,53±0,38 ^a

^{a,b,c}: Aynı sütündeki benzer harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak fark yoktur. (p>0,05)

Probiyotik tozun nem içeriği, ürün stabilitesini güçlü bir şekilde etkiler ve ayrıca saklama sırasında probiyotik canlılığını da etkileyebilir ki bu toz içeren hücreler için dikkate alınması gereken kalite parametrelerinden biridir (Guerin ve diğerleri, 2016). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan materyaller ile enkapsüle edilen *L. paracasei* örneklerinin nem içeriği değerleri önemsiz bulunmuştur (p>0,05). Kaplamamateryallerinin farklı konsantrasyonlarının su aktivitesi ve nem içeriği üzerinde anlamlı (p> 0,05) etkisi olmadığı belirlenmiştir. Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere enkapsüle *L. paracasei* örneklerinin nem içeriği değerleri %1,48±0,56–1,59±0,44 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Bazı araştırmacılar,

dondurularak kurutulmuş enkapsüle probiyotik tozların nem içeriğinin depolama stabilitesi için yaklaşık $3,94 \pm 0,3$ ve $4,03 \pm 0,3$ olarak tespit etmişlerdir (Eratte ve diğerleri, 2015). Kurutmadan sonra kalan su içeriklerinin 4 (w/w) veya altında kalmasının probiyotik bakteri *L.salivarius* UCC 118 ve *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 içeren tozların depolanabilirliğini ve stabilitesini artırdığı bildirilmiştir (Gardiner ve diğerleri, 2000). Ek olarak, farklı çalışmalarda, Rajam ve Anandharamakrishnan (2015) ve Poddar ve diğerleri, (2014) tarafından daha yüksek nem içeriği (7-9 g/100g) tespit edilmiştir. Bu farklılıklar, kullanılan kaplama materyalleri ve kurutma koşulları ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Jantzen vd. (2013), 55°C ve 65°C çıkış hava sıcaklıklarında peynir altı suyunda püskürtülerek kurutulmuş *Lactobacillus reuteri* hücreleri ile işlem sırasında farklı çıkış sıcaklıklarından dolayı tozun nem içeriğinde önemli bir farklılık tespit etmemişlerdir.

4.2. Enkapsüle *L. paracasei* Örneklerinin Renk Özellikleri

Mikrokapsül örneklerin renginin belirlenmesi, gıda ürünlerinde uygulanması ve seçiminde önemli bilgiler sağlayabilir (Holkem ve diğerleri, 2016). Çizelge 4.2’de *L.paracasei* içeren mikrokapsüllerin renk parametreleri gösterilmektedir. Farklı oranlarda hazırlanan kaplama ajanları ile oluşturulan mikrokapsül örneklerinin L değerinin en düşük $79,58 \pm 1,02$ ve en yüksek $84,30 \pm 0,07$ arasında değiştiği gözlemlenmektedir. Mikrokapsül örneklerinin a^* değerleri sırasıyla $5,55 \pm 0,04$ ile $7,67 \pm 0,01$ arasında ve b^* değeri içinse $18,61 \pm 0,07$ ile $24,26 \pm 0,04$ arasında değişmektedir. Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde, *L.paracasei* içeren mikrokapsül örneklerinin L, a^* ve b^* değerlerinin enkapsülasyon duvar malzemelelerinin farklılığından önemli derecede etkilenmediği ($p > 0,05$) görülmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen L (parlaklık) parametresinin oldukça yüksek olması parçacıkların açık renkli olduğunu ifade etmektedir. Çizelge 4.2’ye göre a^* ve b^* parametrelerinin pozitif bir değer gösterdiği ve mikrokapsüllerin sırasıyla kırmızı ve özellikle sarı renk için bir eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Analiz edilen renk parametrelerinin enkapsülasyon ajanlarının doğal renkleriyle ilişkili olduğu çalışmaların sonucu gözlemlenmiştir. Beyaz ve sarı arasında bir ton gösteren sodyum aljinat sarı rengin yoğunluğuna katkıda bulunmuştur. Böylece tüketici tarafından daha iyi kabul edilebilirliği teşvik ederek en azından bazı duyu niteliklere müdahale edilebilir. Bu sonuçlar, yoğurda *Lactobacillus casei* ve inulin eklenen ürünün renginin prebiyotik kullanımı nedeniyle beyazımsı bir görünüm kazandırarak nihai ürünün rengini değiştirdiğini gözlemleyen Aryana ve McGrew (2007) 'nin bu çalışmasını doğrulamıştır.

Çizelge 4.2 Enkapsülasüle edilmiş *L.paracasei* probiyotik bakterisinin renk özellikleri

No	Sodyum Aljinat X ₁ (%)	İnülin X ₂ (%)	Kitosan X ₃ (%)	CaCO ₃ X ₄ (%)	L	a*	b*
1	5	4	1,25	1	81,55±0,07 ^a	6,63±0,02 ^a	18,61±0,07 ^a
2	5	7	2	0,5	80,40±0,56 ^a	6,69±0,21 ^a	19,78±0,06 ^a
3	1	1	0,5	0,5	84,30±0,07 ^a	7,15±0,06 ^a	20,53±0,19 ^a
4	1	1	2	0,5	81,72±0,45 ^a	7,05±0,32 ^a	20,20±0,04 ^a
5	3	4	1,25	1	81,39±0,53 ^a	6,87±0,23 ^a	20,91±0,02 ^a
6	1	7	2	1,5	83,39±0,85 ^a	6,92±0,26 ^a	20,85±0,64 ^a
7	3	1	1,25	1	79,99±0,41 ^a	6,56±0,03 ^a	21,58±0,40 ^a
8	3	4	1,25	1,5	82,38±0,24 ^a	7,08±0,05 ^a	20,71±0,15 ^a
9	3	4	2	1	79,58±1,02 ^a	6,68±0,28 ^a	21,00±0,06 ^a
10	1	4	1,25	1	81,87±0,19 ^a	7,67±0,01 ^a	21,51±0,25 ^a
11	1	7	0,5	1,5	83,23±0,24 ^a	6,75±0,09 ^a	22,92±0,00 ^a
12	5	1	2	1,5	81,34±0,06 ^a	5,55±0,04 ^a	19,76±0,20 ^a
13	3	7	1,25	1	84,28±0,06 ^a	7,12±0,32 ^a	21,70±0,01 ^a
14	3	4	1,25	1	84,16±0,04 ^a	6,23±0,10 ^a	20,46±0,00 ^a
15	5	7	0,5	0,5	80,30±0,47 ^a	8,15±0,40 ^a	18,94±0,04 ^a
16	3	4	1,25	0,5	80,00±0,86 ^a	6,16±0,36 ^a	24,26±0,04 ^a
17	3	4	0,5	1	81,00±0,15 ^a	7,06±0,02 ^a	19,52±0,14 ^a
18	5	1	0,5	1,5	79,74±0,16 ^a	5,55±0,04 ^a	18,78±0,07 ^a

^{a,b,c}: Aynı sütundaki benzer harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak fark yoktur. (p>0,05)

4.3. *L. Paracasei* Enkapsülasyon Kaplama Materyallerinin Optimize Edilmesi

Dondurarak kurutma yöntemi ile enkapsülasyonu sağlanmış *L. paracasei* probiyotik bakterisinin stabilitesine ait sonuçlar değerlendirilmiştir. Süreç değişkenlerinin her bir tepki üzerindeki anlamlı etkilerini belirlemek için bir varyans analizi gerçekleştirilmiştir. Mevcut çalışmada, *L. paracasei* bakterisinin enkapsülasyonu için 4 farklı kaplama materyalinin optimal oranları ve bir tahmini model oluşturmak için yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM) kullanılmıştır. Yanıtlar enkapsülasyon etkinliği, ısı tolerans, simüle mide sıvısında mikrokapsül bakterilerin canlılık düzeyi, simüle safra tuzu çözeltisinde mikrokapsül bakterilerin canlılık düzeyi verileridir.

Değişkenlerin doğrusal, interaksiyon ve kuadratik fonksiyonları ANOVA kullanılarak yeterlilik ve uygunluk açısından test edilmiştir. Deneylerden elde edilen yanıtlar modelden hesaplanan tahmini değer ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Çam ve Aaby (2010), Toker ve diğerleri (2013) ve Youssefi ve diğerleri (2009) tarafından belirtildiği üzere bu çalışmada modellerin yeterliliğini kontrol etmek için R² (Belirleme katsayısı), adj-R² (Düzeltilmiş R²), pred-R² (Öngörülen R²) ve yeterli hassasiyet (yeterlilik-hassasiyet) değerleri kullanılmıştır.

Çalışmadaki sonuçların F değerlerine göre beş yanıtın doğrusal, interaksiyon ve kuadratik modellerin geçerlilikleri karşılaştırılmaktadır. Uyum eksikliği (lack of fit) bütün cevaplar için istatistiksel olarak önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur ve bu da modelin deneysel verilerle doğru şekilde uyduğunu göstermektedir. Regresyon modelinin R^2 değeri modelin seçilen parametreler arasındaki gerçek ilişkiyi yeterince temsil ettiğini ve modelin yüksek doğruluk gösterdiğini ortaya koymaktadır. Mevcut çalışmada yanıtların R^2 değerleri genel olarak 0,877 ve 0,997 arasında değişmektedir, bu da üretilen modellerin yeterli olduğunu ve yeterli tahmin yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, düzeltilmiş regresyon katsayısı Adj- R^2 , modeldeki deneysel ve öngörülen değerler arasındaki ilişkinin önemini açıklar ve bütün yanıtlar için kabul edilebilir bulunmuştur. Adeq Precision, sinyal/gürültü oranını ölçer ve 4'ten büyük bir oran arzu edilmektedir. Mevcut çalışmada Adeq Precision, oranlarının 11,82 ile 32,87 arasında değişmektedir. Regresyon kestirim kabiliyeti kısmen pred- R^2 istatistik ile belirtilir ve negatif öngörülen R^2 , genel ortalamanın yanıtlarımızın mevcut modele göre daha iyi bir öngörülen olabileceğini ifade etmektedir. Pred- R^2 değerleri adj- R^2 'ye çok yakın değildir. Bu durumda, modelin tasarım alanında gezinmek için kullanılabileceğini gösteren yeterli bir sinyalin olduğu söylenebilir. Burada R^2 , adj- R^2 , pred- R^2 ve adeq-duyarlık değerlerinin enkapsülasyon kaplama materyallerinin optimizasyonu için en iyisi olduğu belirtilmelidir. Enkapsülasyon kaplama materyallerinin formülasyonun geliştirilmesi ile kısa bir süre içinde minimum denemelerle istenen kalitede bir ürün tasarlamak için uygun formül aranmaktadır. Enkapsülasyon duvar malzemelerinin oranlarının optimizasyonu, *L. paracasei*'nin gastrointestinal sistemin farklı bölgelerinde yeterli canlılık düzeyini sağlayabilmek ve ısı toleransı yüksek mikropartiküller elde etmek için yapılmıştır. Tepki yüzeyi metodolojisi, araştırılan faktörün birleşik etkisini istenen yanıtlar üzerinde bir dozaj formunun optimizasyonu için etkili bir araç olarak bildirilmiştir (Nayak ve diğerleri, 2012). Yanıt yüzey-metodolojisinde, üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği, faktörlerin ana ve etkileşim etkilerini öğrenmede çok yararlı olurken, iki boyutlu kontur yanıtın görsel bir temsilini çizmektedir (Malakar ve diğerleri 2012).

4.3.1. Enkapsülasyon etkinliği

Enkapsülasyonun amacı, kapsüllenmiş mikrobiyal hücreleri ısı, gastrointestinal ve ozmotik stres gibi zararlı çevresel koşullarına karşı korumak ve ayrıca depolama sırasında hücrelerin stabilitesini artırmaktır (Mortazavian ve diğerleri 2007). Bu yüzden enkapsülasyon etkinliği bakterinin canlılığını değerlendirmek için önemli bir faktördür. Enkapsülasyon verimi,

uygulanan işlem parametrelerinden ve duvar malzemesi formülasyonlarından etkilenmektedir (Arepally ve diğerleri, 2020). Bu nedenle, farklı duvar malzemeleri kullanılarak kapsüle edilmiş *L. paracasei*'nin enkapsülasyon etkinliğini belirlemek çok önemlidir. Bu çalışma kapsamında kapsül *L. paracasei* bakterilerinin enkapsülasyon etkinliği belirlenmiş ve Çizelge 4.3'te örneklerin sodyum aljinat, kitosan, inülin, kalsiyum karbonat ve oranlarına bağlı enkapsülasyon etkinliği değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Enkapsüle edilmiş *L. paracasei* bakterisinin enkapsülasyon etkinlik değerleri

Deneme noktası	Sodyum Aljinat X ₁ (%)	İnülin X ₂ (%)	Kitosan X ₃ (%)	CaCO ₃ X ₄ (%)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
1	5	4	1,25	1	50,75±0,53
2	5	7	2	0,5	26±2,47
3	1	1	0,5	0,5	90±28,28
4	1	1	2	0,5	94,25±4,77
5	3	4	1,25	1	68,75±3,53
6	1	7	2	1,5	55±3,53
7	3	1	1,25	1	44,25±0,17
8	3	4	1,25	1,5	54,25±3,00
9	3	4	2	1	73,75±9,72
10	1	4	1,25	1	76,5±18,73
11	1	7	0,5	1,5	29,5±2,12
12	5	1	2	1,5	16,25±0,88
13	3	7	1,25	1	32,25±0,88
14	3	4	1,25	1	60±1,23
15	5	7	0,5	0,5	18,25±3,18
16	3	4	1,25	0,5	59,25±2,29
17	3	4	0,5	1	87,5±15,90
18	5	1	0,5	1,5	91,25±7,92

Sodyum aljinat, kitosan, inülin ve kalsiyum karbonat kombinasyonları *L. paracasei* bakterisinin enkapsülasyon etkinliği üzerinde farklı tepkiler vermiştir. Çizelge 4.3'e göre farklı oranlarda hazırlanan kaplama ajanları ile oluşturulan mikrokapsül örneklerinin enkapsülasyon etkinliği %16,25±0,88 ile %94,25±4,77 arasında saptanmıştır.

En yüksek enkapsülasyon etkinliği sırasıyla 1:1:2:0,5 oranlarında sodyum aljinat, inülin, kitosan, kalsiyum karbonat kullanılarak hazırlanan kapsül formülasyonunda (4. deneme noktası) %94,25±4,77 bulunurken, en düşük ise 5:1:2:1,5 oranında hazırlanan formülasyonda (12. deneme noktası) %16,25±0,88 olarak gözlemlenmiştir.

Enkapsülasyon için hazırlanan serbest *L. paracasei* bakteri sayısı $2 \pm 0,9.10^9$ log kob/g iken, enkapsülasyondan sonra hücre sayıları en düşük $32,5.10^6$ ile $18,85 \pm 3,2.10^8$ log kob/g hücre arasında değişmiştir. Probiyotik bakterilerin herhangi bir sağlık yararı sağlayabilmesi için tüketim anında üründe minimum 10^6 log kob/g konsantrasyon önerilmektedir (Tripathi ve Giri, 2014). Elde edilen verilere göre enkapsülasyon işlemi ile $\%90 \pm 28,28$, $\%94,25 \pm 4,77$ ve $\%91,25 \pm 7,92$ oranlarında hücre tutulması sağlandığı (3, 4 ve 18 deneme noktaları) tespit edilmiştir.

L.paracasei enkapsülasyon etkinliği için elde edilen yüksek değerlerin Jantarathin ve arkadaşları (2017), *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 bakterisini sodyum aljinat matrisi içinde inülin ve yer elması prebiyotikleri ile dondurarak kurutma işlemi ile kapsüllenmiştir. Bu işlem sonucunda enkapsülasyon etkinliği $\%90$ seviyesinde olduğu belirtilmiştir. Sonuçlar ayrıca hazırlanan kapsül formülasyonları ile kapsülleme prosedürü sırasında canlı *L. paracasei*'nin başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini göstermektedir. Aynı zamanda *L.paracasei* enkapsülasyon etkinliği ile elde edilen yüksek değerlerin Xu, Gagné-Bourque, Dumont & Jabaji (2016) çalışmasında sodyum aljinat kullanımı ile dondurarak kurutma yöntem sonuçlarının probiyotiklerin $CaCl_2$, inülin ve kitosan kaplaması ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisini açıklayan polinomiyal modele ait eşitlik aşağıdaki gibi bulunmuştur (Çizelge 4.4). Faktörlerin *L.paracasei*'nin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki deneysel etkilerine ait kesişim, doğrusal, kuadratik ve etkileşim terimlerinin regresyon katsayılarının varyans analiz sonuçları Çizelge 4.4'de listelenmiştir.

Varyans analizi sonucuna göre, model $p < 0,05$ ve uyum eksikliği $p > 0,05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Modele ait regresyon eşitliği Çizelge 4.4'te gösterilmekte olup determinasyon katsayısı oldukça yüksek bulunmuştur ($R^2 = 0.99$).

Modelin bağımsız değişkenleri sodyum aljinat, kitosan, sodyum aljinat ve kitosanın interaksyon etkisi, sodyum aljinat ve kalsiyum karbonatın interaksyon etkisi, inülin ve kitosanın interaksyon etkisi, kitosan ve kalsiyum karbonatın interaksyon etkisi, inülin ve kitosanın kuadratik etkilerinin istatistiksel olarak enkapsülasyon etkinliğini artırdığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Enkapsülasyon duvar malzemelerinin *L.paracasei*'nin enkapsülasyon etkinliğine etkisinin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri Prob > F
Model	11045,57	14	788,97	45,35	0,0046**
X₁ (Sodyum Aljinat)	331,53	1	331,53	19,06	0,0222*
X₂ (İnülin)	72,00	1	72,00	4,14	0,1348
X₃ (Kitosan)	262,66	1	262,66	15,10	0,0302*
X₄ (Kalsiyum Karbonat)	12,50	1	12,50	0,7185	0,4589
X₁ * X₂	6,81	1	6,81	0,3912	0,5760
X₁ * X₃	1176,12	1	1176,12	67,60	0,0038**
X₁ * X₄	330,63	1	330,63	19,00	0,0223*
X₂ * X₃	1352,00	1	1352,00	77,71	0,0031**
X₂ * X₄	4,90	1	4,90	0,2816	0,6324
X₃ * X₄	472,78	1	472,78	27,18	0,0137**
X₁²	3,59	1	3,59	0,2066	0,6803
X₂²	1475,80	1	1475,80	84,83	0,0027**
X₃²	835,38	1	835,38	48,02	0,0062**
X₄²	81,47	1	81,47	4,68	0,1191
Uyum Eksikliği	13,91	2	6,96	0,1817	0,8564
Hata Genel	38,28	1	38,28		
Standart Hata Ortalama	11097,77	17			
C.V	4,17				
R²	57,10				
Adj-R²	7,31				
Tahmini R²	0,9953				
Adeq Precision	0,9733				
	0,7033				
	20,4852				
$Y_{EE} = 62,92 - 12,87X_1 - 6X_2 - 5,12X_3 - 2,5X_4 + 2,06X_1X_2 - 12,12X_1X_3 + 14,38X_1X_4 + 13X_2X_3 + 1,75X_2X_4 - 7,69X_3X_4 + 1,19X_1^2 - 24,18X_2^2 + 18,19X_3^2 - 5,68X_4^2$					

***p<0,01**p<0,05*p<0,1

Çizelge 4.4'den anlaşılabileceği gibi sodyum aljinat ve kitosanın doğrusal etkisi önemli ($p<0.05$) bulunmuş olup konsantrasyonu artıkcça enkapsülasyon etkinliği değerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Rosas-Rosas-Ledesma ve arkadaşları (2012) kapsül-lerin hazırlanması için yüksek aljinat konsantrasyonları (%3 ve %4) kullanıldığı çalış-
masında enkapsülasyon etkinliği üzerinde etki göstermediği rapor edilmiştir. Aynı şekilde kito-
san, kapsülleme yoluyla hücre canlılığını arttırmak için iyi bir etkinlik göstermediği için-ter-
cihen bir kaplama olarak kullanılabilmekte ancak bir kapsül olarak tercih edilmemektedir
(Mortazavian ve diğerleri, 2008). Başka bir çalışmada da kitosanın anti-bakteriyel özelliği-
nin kaplama materyali olarak kullanımını sınırlandırdığı ifade edilmiştir (Sudarshan ve di-
ğerleri., 1992).

Bu çalışmalara paralel olarak sodyum aljinat ve kitosanın negatif yönde interaksiyon etkisinin çok önemli ($p<0,01$) olduğu saptanmış Şekil 4.1’de verilen grafikler incelendiğinde bu etkinin artmasıyla enkapsülasyon etkinliği azalmıştır. Literatürde yer alan diğer çalışmalara göre laktobasil sağkalımını artırmak için 3g/100 mL aljinat kullanılmıştır (Burgain, Gaiani, Linder ve Scher, 2011). Benzer sonuç mevcut çalışma ile doğrulanmış olup sodyum aljinatın formülasyonda %3,65 konsantrasyondan sonra enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı tespit edilmiştir.

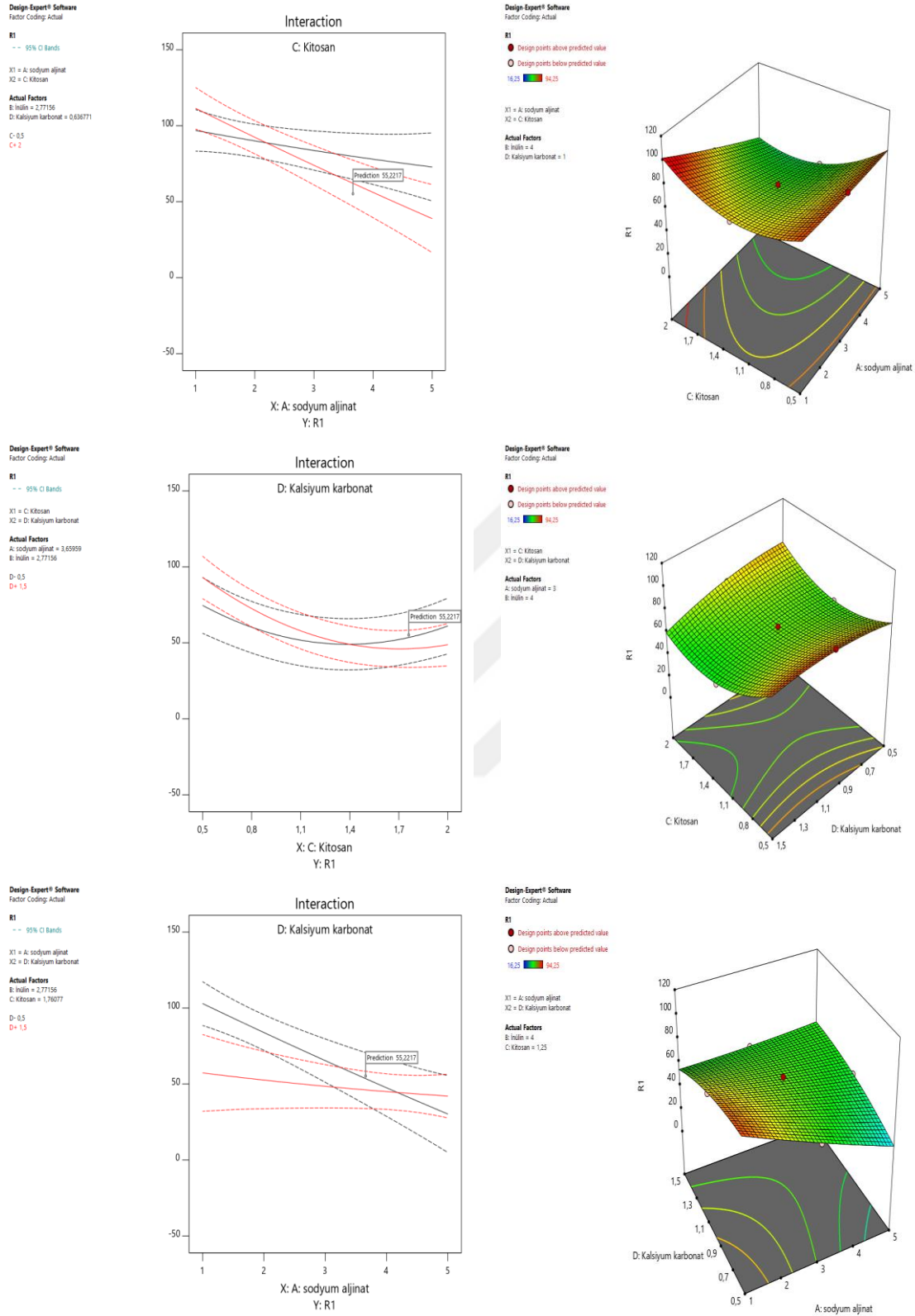
Bu azalmanın sebebi olarak, sodyum aljinatın anyonik yapısı pozitif yüklü kitosanı çekebil-mekte ve böylece aljinat omurgasında oluşan kapsüllerin gözenekli yapısına dayandırılmak-tadır. Bu yüzden kitosan ile çift katmanlı uygulamaların (Ansari, Pourjafar, Jodat, Sahebi ve Ataei, 2017) ve sisteme Ca^{+2} iyon ilavesi ile gözenekli boncukların kaplanabileceği ve pro-biyotik bakteriler için korumayı artırabileceği ile ilgili araştırmalar bulunmaktadır (Mi ve diğerleri, 2002; Kamalian ve diğerleri, 2014). Bununla beraber kalsiyum karbonat aracılı-ğıyla Ca^{+2} ve aljinat grubunun $-COO^-$ grubu arasındaki bağlantı ile aljinat boncuklarının bü-zülmesine ve boncukların şişmesini önleyen sert ve sıkı bir yapı sayesinde enkapsülasyon etkinliğini geliştirmektedir (Abbaszadeh ve diğerleri, 2014). Bu durumu destekleyen sonuç çalışmamız ile doğrulanmıştır. Sodyum aljinat ve kalsiyum karbonatın pozitif yönde inte-raksiyon etkisinin önemli olduğu saptanmış ve bu etkinin artmasıyla enkapsülasyon etkinliği artmıştır. Ancak benzer sonuç kitosan ile sağlanamamış, kitosan ve kalsiyum karbonatın in-teraksiyon etkisi çok önemli bulunmuş ($p<0,01$) ve bu etkinin artmasıyla enkapsülasyon et-kinliği azalmıştır.

İnülin ve kitosanın pozitif yönde interaksiyon etkisinin çok önemli ($p<0,01$) olduğu saptan-mış ve bu etkinin artmasıyla enkapsülasyon etkinliği artmıştır. Mikrokapsül duvar malze-mesi formülasyonunda %2,77 oranında inülin ve %1,76 kitosan oranından sonra enkapsü-lasyon etkinliğinin arttığı tespit edilmiştir. Jantarathin ve arkadaşlarının (2017) %3 inülin ve 0.1M $CaCl_2$, %3 sodyum aljinat çözeltisi ile *L. acidophilus* TISTR 1338 bakterisinin enkapsülasyon etkinliği % $88,19 \pm 1.36$ iken %3 sodyum aljinat ve %0,8 kitosan çözeltisi, %3 inülin ve 0.1M $CaCl_2$ ile birlikte çift kaplama uyguladığı *L. acidophilus* TISTR 1338’nin enkapsü-lasyon etkinliği % 90.40 ± 1.53 olarak tespit edilmiştir. Buna benzer bir çalışmada ise Darjini ve diğerleri-(2016) *L. casei* bakterisini ekstrüzyon metodu ile enkapsüle etmiş aljinat boncuk-lar yaklaşık %89, prebiyotiklerle (inülin) birlikte kapsüllenmiş %91 ve kitosan ile kaplanmış boncuklarda ise %92 gibi yüksek enkapsülasyon etkinliği sağlanmıştır.

İnülinin kuadراتik etkisi $p<0,01$ seviyesinde çok önemli bulunmuş bu etkinin artmasıyla enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı belirlenmiştir. Enkapsülasyon duvar materyali formülasyonunda %4 oranında en yüksek enkapsülasyon etkinliğini sağlamıştır ancak daha sonra inülin konsantrasyonu artıkça enkapsülasyon etkinliği azalmıştır. Gandomi ve diğerleri (2016) çalışmasında, inülin ile *Lactobacillus rhamnosus* hücrelerin kapsülleme veriminin, inülin olmadan kapsüllenmiş bakterilerden istatistiksel olarak daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Kitosanın kuadراتik etkisi $p<0,01$ seviyesinde çok önemli bulunmuş bu etkinin artmasıyla enkapsülasyon etkinliğinin arttığı belirlenmiştir. Enkapsülasyon duvar materyali formülasyonunda %1,76 oranında en yüksek enkapsülasyon etkinliğini sağlamış ve daha sonra kitosan konsantrasyonu artıkça enkapsülasyon etkinliği artmıştır.

Faktörlerin interaksiton etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Enkapsülasyon etkinliği üzerinde faktörlerin interaksiyon etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyler

4.3.2. Simüle mide suyunda serbest ve kapsüllü bakterilerin canlılık düzeyi

Probiyotikler, yeterli miktarlarda sindirim sisteminde bulunduklarında konağa sağlık yararı oluşturabilen canlı mikroorganizmalardır (Lourens-Hattingh ve Viljoen 2001). Probiyotiklerin konakçıya yararlı etkiler sağlayabilmesi için mide ortamının asidik ve enzim koşullarında hayatta kalması ve kolonizasyonu mümkün kılmak için yeterli miktarlarda kalın bağırsağa ulaşabilmesi gerekmektedir. Probiyotik bakteri içeren gıdanın minimum 10^6 - 10^7 cfu/g bakteri sayısında kolona ulaşabilmesini sağlamak için, yutulmadan hemen önce 10^8 - 10^9 koloni oluşturan birim kob/g aralığında olması önerilmiştir (Nazzaroet ve diğerleri, 2009) Ne yazık ki, probiyotiklerin çoğu mide sıvısındaki düşük pH nedeniyle yüksek miktarda hayatta kalma yeteneğinden yoksundur. Bu nedenle, mide geçişini simüle eden bir in-vitro modelde mikrokapsüllenmiş probiyotiklerin hayatta kalması üzerindeki etkisini gözden geçirmek önemlidir.

Bu amaçla simüle mide sıvısı koşullarının serbest ve mikrokapsül *L. paracasei* bakterilerinin yaşayabilirliği üzerindeki etkisi farklı zamanlarda ölçülmüş ve Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5.'de görüldüğü üzere mikrokapsüllerin bir saat simüle mide sıvısına maruz kaldıktan sonra hayatta kalabilen kapsüllenmiş hücrelerin canlılık düzeyi $\%0,011 \pm 0,01$ - $\%100 \pm 3,56$ aralığında değişmektedir. En düşük canlılık düzeyi, kapsül materyali 5:4:1,25:1 oranlarında sırasıyla sodyum aljinat, inülin, kitosan, kalsiyum karbonat kullanılarak hazırlanan kapsül formülasyonunda (1. deneme noktası) bulunurken, en yüksek ise 1:1:0,5:0,5 oranında hazırlanan formülasyonda (3. deneme noktası) $\%100 \pm 3,56$ olarak tespit edilmiştir. En yüksek canlılık düzeyine ($\%100$) ulaşılan 3. ve 4. deneme noktaları iki saatin sonunda sırasıyla $\%52 \pm 23,14$ ve $\%6 \pm 2,23$ seviyelerine düşmüş olduğu saptanmıştır. Başlangıçta serbest *L. paracasei* bakteri sayısı 2.10^9 log kob/mL olan kontrol numuneleri simüle mide sıvısına maruz kaldıktan sonra hayatta kalabilen bakteri sayısı bir saat sonunda 1×10^5 log kob/mL iken iki saat sonunda 1×10^3 log kob/mL seviyesinde tespit edilmiştir. Genellikle, probiyotik *L. paracasei* hücreleri strese dirençlidir ve 2.0 ila 5.0 arasında değişen pH değerlerinde canlı kalabilmektedir (da Conceição ve diğerleri., 2021).

García-Ceja ve diğerleri (2015), $\%3$ sodyum aljinat, 1 mol/L kalsiyum klorür ile *L.acidophilus*, *L.reuteri* bakteri karışımları enkapsüle edilmiş ve ikinci bir işlem olarak $\% 1$ kitosan çözeltisi ile kaplanan aljinat boncuklarının SGF (simüle mide suyu) şartlarında canlılık

düzeyi araştırılmıştır. Çalışmalarında kitosan ile kaplanmış *L. acidophilus*'un ($7,3 \log_{10}\text{CFU/g}$) aljinat ile kaplanmış taneciklere göre ($5,6 \log_{10}\text{CFU/g}$) hayatta kalma oranının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bazı çalışmalarda, mevcut çalışmamıza göre *L. reuteri*'nin aljinat içinde kapsüllenmiş bakterilerin daha iyi hayatta kalma sayılarını bildirmişlerdir. Örneğin Muthukumarasamy ve diğerleri (2006), SGF'ye maruz kalan altı *L.reuteri* suşu için 0.28 ile 1.26 $\log_{10}$ arasında azalma tespit etmişlerdir. Bu sonuçların enkapsülasyon yöntemi ve bakteri suş farklılığından kaynaklandığı düşünülmekle birlikte, kitosanla kaplı aljinat boncukların koruyucu etkisi, SGF'deki maruziyet süresi arttıkça azalması durumunda mevcut çalışma ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. Enkapsülasyon kaplama materyallerinin farklı zamanlarda simüle mide sıvısına maruz kalmış kapsüllü *L. paracasei* 'nin canlılık düzeyi değerleri (%)

Deneme noktası	Sodyum Aljinat X_1 (%)	İnülin X_2 (%)	Kitosan X_3 (%)	CaCO_3 X_4 (%)	60 dk (%)	120 dk (%)
1	5	4	1,25	1	0,011±0,01	0,0008±0,00
2	5	7	2	0,5	0,2725±0,02	0,0055±0,01
3	1	1	0,5	0,5	100±3,56	52±23,14
4	1	1	2	0,5	100±5,96	6±2,23
5	3	4	1,25	1	3±0,56	0,2875±0,21
6	1	7	2	1,5	5±1,12	0,5±0,12
7	3	1	1,25	1	1±0,89	0,5±0,15
8	3	4	1,25	1,5	3±,74	2,5±0,87
9	3	4	2	1	6,57±3,20	0,5±0,14
10	1	4	1,25	1	2,33±0,56	1,5±0,90
11	1	7	0,5	1,5	10±2,73	6,5±,123
12	5	1	2	1,5	1,25±0,16	0,3625±0,14
13	3	7	1,25	1	0,1±0,00	0,005±0,74
14	3	4	1,25	1	1±0,00	0,05±0,23
15	5	7	0,5	0,5	0,5±0,94	0,015±0,01
16	3	4	1,25	0,5	0,15±0,11	0,05±0,01
17	3	4	0,5	1	1,75±0,12	0,5±0,23
18	5	1	0,5	1,5	2,25±0,00	0,085±0,06
Kontrol	Serbest <i>L. paracasei</i> bakteri				0,05	0,0005

Mikrokapsül *L.paracasei* örneklerinin mide sıvısındaki asit ve enzim varlığında 1 saat maruziyetten sonra canlılık düzeyi üzerine işlem parametrelerinin etkisini gösteren varyans analizi sonuçları ve regresyon eşitliği Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Bu modele ait R^2 değeri 0.9930 olarak belirlenmiştir. R^2 değerinden de anlaşıldığı gibi sodyum aljinat, inülin, kitosan ve kalsiyum karbonat kapsül malzemelerinin mide sıvısında

canlılık düzeyinin belirlenmesi üzerindeki etkileri model ile başarılı bir şekilde açıklanabilmektedir (Çizelge 4.6). Kullanılan bu bileşenlerin ilgili parametre üzerine etkisini ifade eden model ($p < 0,05$) önemli iken uyumsuzluk (lack of fit) önemli bulunmamıştır ($P > 0,05$).

Çizelge 4.6. Enkapsülasyon duvar malzemelerinin simüle mide suyuna marzu kalmış kapsüllü *L.paracasei* canlılık düzeyine etkisinin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri Prob > F
Model	16931,96	14	1209,43	30,25	0,0084**
X₁ (Sodyum Aljinat)	2,69	1	2,69	0,0673	0,8122
X₂ (İnülin)	0,4050	1	0,4050	0,0101	0,9262
X₃ (Kitosan)	0,1981	1	0,1981	0,0050	0,9483
X₄ (Kalsiyum Karbonat)	4,06	1	4,06	0,1016	0,7708
X₁ * X₂	937,73	1	937,73	23,45	0,0168*
X₁ * X₃	1,78	1	1,78	0,0445	0,8464
X₁ * X₄	847,57	1	847,57	21,20	0,0193*
X₂ * X₃	2,23	1	2,23	0,0559	0,8284
X₂ * X₄	1014,57	1	1014,57	25,38	0,0151*
X₃ * X₄	4,17	1	4,17	0,1042	0,7681
X₁²	123,86	1	123,86	3,10	0,1766
X₂²	102,89	1	102,89	2,57	0,2070
X₃²	252,13	1	252,13	6,31	0,0868
X₄²	138,58	1	138,58	3,47	0,1595
Uyum Eksikliği	117,94	2	58,97	29,48	0,1291
Hata	2,00	1	2,00		
Genel	17051,89	17			
Standart Hata	6,32				
Ortalama	13,23				
C.V	47,78				
R²	0,9930				
Adj-R²	0,9601				
Tahmini R²	-0,3655				
Adeq Precision	18,0221				
$Y_{mide} = -3,88 - 1,16X_1 - 0,045X_2 - 0,1408X_3 + 1,42X_4 + 24,21X_1X_2 + 0,4716X_1X_3 + 23,02X_1X_4 - 0,5284X_2X_3 + 25,18X_2X_4 - 0,7216X_3X_4 + 7,01X_1^2 + 6,39X_2^2 + 10X_3^2 + 7,41X_4^2$ (Eq.4).					

*** $p < 0,01$ ** $p < 0,05$ * $p < 0,1$

Varyans analizi sonucuna göre sodyum aljinat ve inülin interaksiyon etkisi, sodyum aljinat ve kalsiyum karbonatın interaksiyon etkisi, inülin ve kalsiyum karbonatın interaksiyon etkilerinin istatistiksel olarak simüle mide sıvısında mikrokapsül *L.paracasei* canlılık düzeyini etkilediği tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Enkapsüle edilmiş bakterilerde 1 saat mide sıvısında kaldıktan sonra hayatta kalma oranı en yüksek 2.10^9 log kob/ml (3. ve 4. deneme noktası) ve en düşük 16.10^3 log kob/ml (1. deneme noktası) arasında değişmektedir. Bu durumda deneme tasarımı tarafından önerilen ajan formülasyon ile kapsüllenmiş hücrelerde en yüksek seviyede koruma sağlanabilmektedir. Bu hayatta kalma düzeyi, tüketiciye sağlık yararları sunmak için gereklidir (Ouweland ve Salminen 1998).

Çizelge 4.6'de ki varyans analiz sonuçlarına bakıldığında sodyum aljinat ve inülin bileşenlerinin mide içerisinde bir saat boyunca bekletilmesi işlemi bakterilerin canlılık düzeyi üzerinde doğrusal etkileri önemli ($p>0,05$) bulunmamıştır. Ancak Şekil 4.2'de görüldüğü üzere sodyum aljinat ve inülinin pozitif yönde interaksiyon etkisinin önemli ($p<0,05$) bulunmuş ve etkinin artmasıyla birlikte mide ortamında daha uzun süre canlılık düzeyini artırıcı etkisi bulunduğu saptanmıştır. Enkapsülasyon duvar malzemelerinin formülasyonunda sodyum aljinatın %3,14, inülinin ise %3,86 oranında kullanıldığında mide sıvısının etkilerine karşı koruyuculuğunun en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda mevcut çalışmaya benzer şekilde aljinat kaplamalara prebiyotik malzemelerinin ve farklı kombinasyonlarının ilavesi ile gastrointestinal sistemde sinbiyotik mikrokapsülleri daha iyi koruyabileceği tespit edilmiştir (Chen ve diğerleri 2005; Nazzaroa ve diğerleri, 2009; Okuro ve diğerleri, 2013; Pradeep Prasanna ve Charalampopoulos 2019).

Mevcut çalışmada görülen kapsüllenmiş bakterilerin hayatta kalma oranının arttırılması, kapsüllemenin bakteri canlılığı üzerindeki koruyucu etkisini göstermektedir. Aljinat boncuklarını çevreleyen inulin membranının asitlerin ve enzimlerin mide sıvısından boncuklara geçişini azalttığı, dolayısıyla kapsüllenmiş probiyotik bakteriler üzerindeki olumsuz etkilerini sınırladığı ve kapsüllenmiş hücrelerin bu gelişmiş sağkalımı, muhtemelen mikro kürelerin yüzeyindeki düşük gözeneklilik ile ilişkilendirilebilir. İnülin-aljinat matrisinde muhtemel inülin OH grubu ile aljinatın COO grubu arasındaki nükleofilik bağlanma nedeniyle inülin-aljinat matrisinde inulin, aljinat ağına eşit bir şekilde hapsedilebilir (Atia ve diğerleri, 2016). Bu değerlendirmelere göre Krasaekoopt ve Watcharapoka (2017) probiyotiklerin mikrokapsüllemesi sırasında galaktooligosakkarit veya %0-2 oranlarında inulin prebiyotiklerin eklendiği çalışmada; bu organizmaların düşük pH'a direncini ve simüle edilmiş sindirim sisteminde safra tuzuna karşı olan direnci artırmış ve tüm uygulamalarda prebiyotik içermeyen örneklerin canlı bakteri sayısında daha fazla azalma gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Prebiyotikler olmadan kapsüllenmiş probiyotiklerin sayısı, *L. acidophilus* ve *L. casei* için sırasıyla 6.7 ve 6.4 log azaldığı saptanmıştır (Krasaekoopt ve Watcharapoka, 2014).

Darjani ve diğerleri (2016) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise simüle mide solüsyonunda (pH~ 1.5) 120 dakikalık bir inkübasyon süresinde *L. casei*'nin %2 aljinat, %2 inülin, 0.15 mol/l kalsiyum klorür ve %0,4 kitosan ile kapladığı ilk hücre sayısı $5,3 \pm 0,7 \times 10^{12}$ cfu/ml iken, kapsüllemeden sonra mide koşullarında 1 saat sonunda $7,5 \pm 0,8 \times 10^{10}$ cfu/g ve iki saat sonunda $6,1 \pm 1,1 \times 10^8$ cfu/g bakteri sayısı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında literatürde bulunan sonuçlar ile benzer değerler bulunduğu görülmektedir.

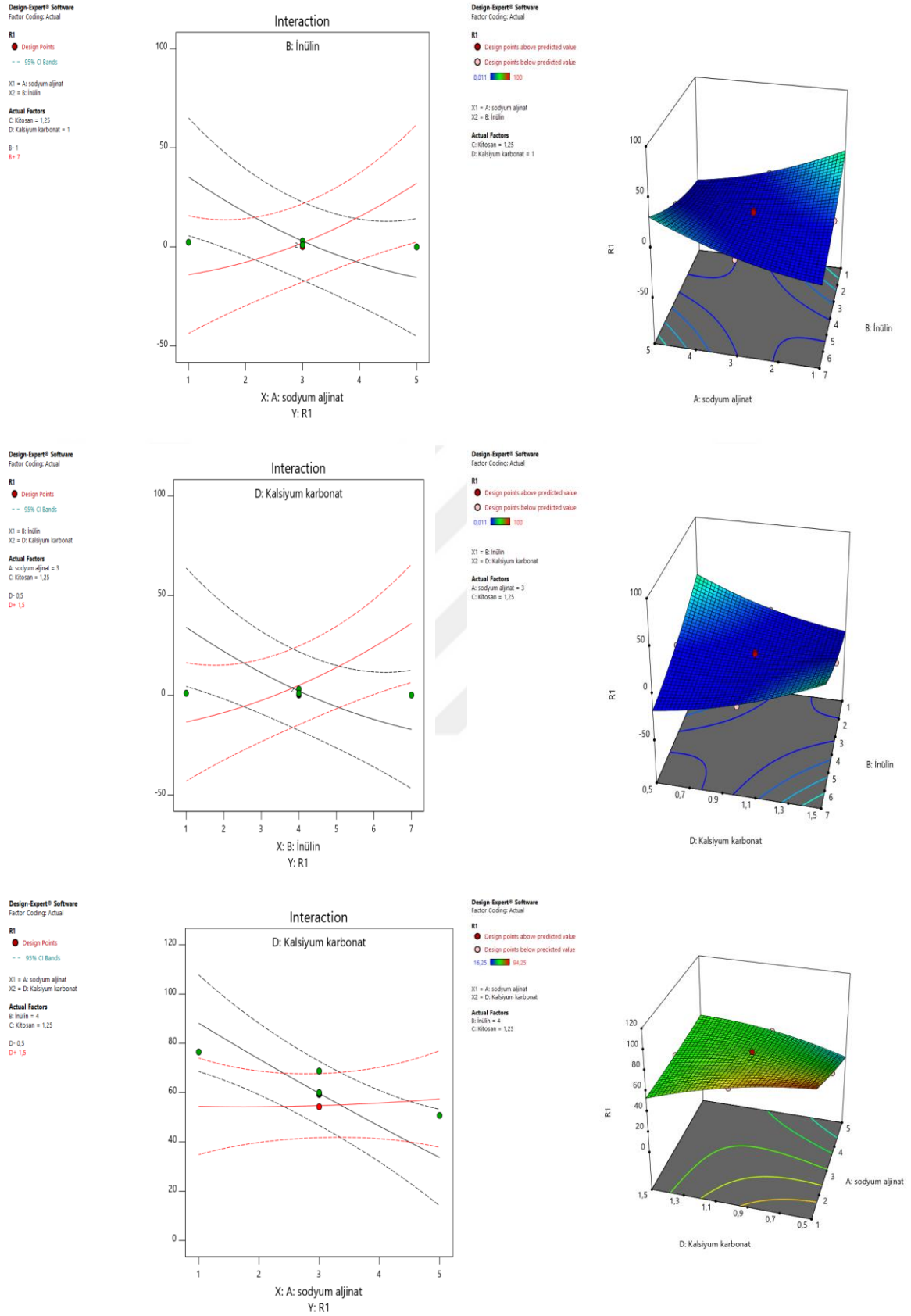
Valero-Cases ve Frutos (2015) yaptıkları çalışmada 15 günlük depolamadan sonra ekstrüzyon yöntemi (EM) ile elde edilen kapsüller, %0-%2 oranları arasında inülin, 0,05 M kalsiyum karbonat, %2 sodyum aljinat, %0.15 ksanthan gum'dan oluşan kapsül ajanları kullanılarak *L. plantarum* CECT 22 bakterisi kapsüle edilmiştir. Araştırmacılar EM kapsüllerinin mide ortamının kuvvetli koşullarına (düşük pH ve pepsin enzimatik aktivite) IM'den (%0,4 kalsiyum karbonat, %1 sodyum aljinat, tween 80, yağ ile emülsiyon mikrokapsülleme (IM), daha iyi direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, probiyotiklerin mikrokapsüllemesi sırasında farklı zincir uzunluklarına sahip farklı inülin prebiyotiklerinin dahil edilmesi, bu organizmaların düşük pH'a direncini artırarak, sadece aljinat ile üretilen mikrokapsüllere kıyasla daha yüksek sayıda hücre ile sonuçlanmıştır (Barclay, Ginic-Markovic, Cooper ve Petrovsky, 2010; Bosscher ve diğerleri, 2006).

Şekil 4.2'de gözlemlendiği gibi sodyum aljinat ve kalsiyum karbonatın pozitif yönde etkisi mikrokapsül *L. paracasei* örneklerinin mide içerisinde canlılık düzeyini artırmıştır. Kalsiyum aljinat, probiyotik bakterilerin kapsüllemesi için yaygın olarak kullanımasına rağmen, kapsülleme protokollerinin koşullarında, yayınlanan sodyum aljinat konsantrasyonlarında rapor edilen herhangi bir standart yok gibi görünmektedir. Mikrokapsüllerin stabilizasyonu için kullanılan kalsiyum klorür konsantrasyonları ve kalsiyum klorür çözeltisindeki kapsüllerin sertleşme süresi, sırasıyla 0,05 ila 0,2M ve 5 dakika ila 2 saat arasında büyük ölçüde değişmektedir. Farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat ve kalsiyum klorürün kullanılarak yapılan enkapsülasyon çalışmaları incelendiğinde simüle edilmiş mide koşulunda (pH=2) 3 saat inkübasyondan sonra, 0,1 M kalsiyum klorür çözeltisinde bulunan *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2400 hücrelerinin hayatta kalmasında önemli bir artış ($p < 0,05$) gözlemlendiği saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada mevcut çalışmaya benzer şekilde,

daha yüksek sodyum aljinat konsantrasyonlarında, bakteri hücrelerinin daha iyi korunması sağlanmış ve sodyum aljinat konsantrasyonunun artırılması, Ca^{2+} iyonları için bağlanma yerlerinin sayısını arttırmaktadır. Sonuç olarak, daha yoğun bir şekilde çapraz bağlanmış bir jel yapısı daha iyi koruma sağlamaktadır (Chandramouli ve diğerleri, 2004).

Shah ve Ravula (2000) kapsüllenmiş probiyotik bakterilerin kalsiyum aljinat taneciklerinde asidik koşullarda (pH 2,5) hayatta kaldıklarını, ancak organizmaların safra varlığında salındığını bildirmiştir. Bu çalışmalar, fermente edilmiş, dondurulmuş sütlü tatlılara dâhil edilen kapsüllenmiş probiyotik bakterilerin, ürünün düşük pH şartlarına ve muhtemelen insan midesindeki asidik koşullardan kurtulabileceğini ve bağırsakta açılacağını düşündürmektedir. Enkapsülasyon işlemi sırasında aljinat çözeltisi içerisine ilave edilen kalsiyum konsantrasyonu, kapsüllerin sertleşme süresi, probiyotik konsantrasyonu, aljinat çözelti iyonunun viskozitesi, partikül çapı gibi faktörler aljinat boncukların hazırlanmasına etkisi iyi bir şekilde araştırılmıştır (Dong ve diğerleri, 2013). Hücrelerin veya enzimlerin aktivitesi, maddenin kapsül zarları boyunca geçirgenliği ile belirlenir. Bu nedenle, katalize reaksiyonun ilerleyişini veya oranını belirlemek için, çözünen maddelerin Kalsiyum-aljinat kapsül membranı boyunca geçirgenliğini ayarlamak ve kontrol etmek önemlidir (Wang, ve diğerleri, 2011). Enkapsülasyon etkinliği ve mide sıvısının maruz kaldığı mikrokapsül *L. paracasei* örneklerinde canlılık düzeyinin yüksekliği de bununla ilişkilendirilebilir.

İnülin ile kalsiyum karbonatın pozitif yöndeki interaksiyon etkisi önemli bulunmuştur. Kaplama malzemelerine hem prebiyotikleri hem de kalsiyum aljinatı dahil etmek, simbiyoz nedeniyle gıda sistemlerinde ve gastrointestinal sistemde probiyotikleri daha iyi koruyabilir (Bielecka, Biedrzycka, ve Majkowska, 2002; Chen, Chen, Liu, Lin, ve Chiu, 2005). Mevcut çalışma ile elde edilen inülin ve kalsiyum karbonat arasındaki bakterileri koruyan olumlu ilişki gibi literatürdeki diğer çalışmalar tarandığında benzer sonuçlar ile karşılaşılmamıştır. Faktörlerin interaksiton etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyleri Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Simüle mide suyuna maruz kalmış kapsüllü *L.paracasei* 'nin canlılık düzeyi üzerinde faktörlerin interaksiyon etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyler

4.3.3. Serbest ve kapsüllü bakterilerin pH toleransı

Olumlu sağlık etkileri sergileyebilmesi için probiyotikler midenin stresli koşullarına direnç göstermelidir. Bu nedenle, kapsüllemenin ana amaçlarından biri, probiyotiklerin düşük pH toleransını iyileştirmektir. Mide sıvılarının pH'sı yaklaşık 1,5-3,0'dır (Kos ve diğerleri, 2000). Kapsüllenmiş *L. paracasei* pH 2,0'da 60 dk boyunca bekletildikten sonra canlılık üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında kapsül *L. paracasei* bakterilerinin pH toleransı belirlenmiş ve Çizelge 4,7'de örneklerin sodyum aljinat, kitosan, inülin, kalsiyum karbonat oranlarına bağlı pH 2,0'de 60 dk boyunca bekletilmesi işleminin bakterilerin canlılık düzeyine etkisi gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Enkapsülasyon kaplama materyallerinin pH 2,0'de 60 dakikaya maruz kalmış kapsüllü *L.paracasei*'nin canlılık düzeyi değerleri (%)

Deneme noktası	Sodyum Aljinat X ₁ (%)	İnülin X ₂ (%)	Kitosan X ₃ (%)	CaCO ₃ X ₄ (%)	Canlılık düzeyi (%)
1	5	4	1,25	1	7,5±3,53
2	5	7	2	0,5	17,5±10,60
3	1	1	0,5	0,5	75±11,22
4	1	1	2	0,5	60±12,20
5	3	4	1,25	1	10±7,07
6	1	7	2	1,5	5±17,67
7	3	1	1,25	1	1,375±0,17
8	3	4	1,25	1,5	0,375±0,17
9	3	4	2	1	11,5±9,19
10	1	4	1,25	1	7,5±3,53
11	1	7	0,5	1,5	3,5±3,53
12	5	1	2	1,5	0,5±0,00
13	3	7	1,25	1	3±0,07
14	3	4	1,25	1	4,75±0,53
15	5	7	0,5	0,5	4,5±1,41
16	3	4	1,25	0,5	5±0,00
17	3	4	0,5	1	10±7,07
18	5	1	0,5	1,5	5±0,00
Kontrol					0,02

Çizelge 4.7'e göre farklı oranlarda hazırlanan kaplama ajanları ile oluşturulan mikrokapsül örneklerinin pH 2,0'de 60 dk boyunca bekletilmesi işlemi bakterilerin canlılık düzeyi değerleri %0,375±0,17 ile %75±11,22 arasında saptanmıştır. En yüksek canlılık düzeyi sırasıyla 1:1:0,5:0,5 oranlarında sodyum aljinat, inülin, kitosan, kalsiyum karbonat kullanılarak hazırlanan kapsül formülasyonunda (3. deneme noktası) %75±11,22 bulunurken, en düşük ise

3:4:1,25:1,5 oranında hazırlanan formülasyonda (8. deneme noktası) $0,375 \pm 0,17$ olarak gözlemlenmiştir.

Enkapsülasyon için hazırlanan başlangıç serbest *L. paracasei* için bakteri sayısı iken, pH 2,0'de 60 dk boyunca bekletilmesi işlemi sonrası bakterilerin canlılık düzeyi en düşük 75×10^5 log kob/g hücre olarak tespit edilmiştir. Spesifik olarak, bu çalışmada $2 \pm 0,9 \cdot 10^9$ log kob/g olan ilk canlı hücre sayısının 15×10^8 log kob/g'ı korunurken, serbest hücrelerde $2 \pm 0,9 \cdot 10^9$ log kob/g 'den 4×10^5 log kob/g'a bir düşüş gözlenmiştir. Genellikle, probiyotik *L. paracasei* hücreleri strese dirençlidir ve 2,0 ila 5,0 arasında değişen pH değerlerinde canlı kalabilmektedir (da Conceição ve diğerleri, 2021).

Ding ve Shah (2007) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, probiyotik bakteriler aljinat ile enkapsülasyonu gerçekleştirilmiş ve pH toleransları incelenmiştir. Bu çalışmada pH değeri 2,0 olan MRS broth besiyerinde 2 saat boyunca enkapsüle ve serbest bakteriler inkübe edilmiş olup sonucunda serbest bakteri sayısı yaklaşık 3-4 log kob/ml seviyesinde iken mikrokapsül örneklerde bu değer yaklaşık 6-7 log kob/ml seviyesinde kalmıştır. Mikrokapsül bakterilerin asit ortamında (pH 2,0) sergiledikleri canlılık düzey değerlerinin mevcut çalışmadaki sonuçlarla örtüştüğü görülmektedir.

Laktik asit bakterilerinin büyümesi için optimum pH 4,0 civarındadır ve tüm durumlarda, canlılık seviyeleri probiyotik ürünler için gerekli sınırın üzerinde olmalıdır (10^6 - 10^7 cfu mL) (Plessas ve diğerleri, 2012).

Mikrokapsüllerin pH toleransı üzerindeki etkisini açıklayan polinomiyal modele ait eşitlik aşağıdaki gibi bulunmuştur (Çizelge 4.8). Faktörlerin *L. paracasei*'nin pH 2,0'de 60 dk boyunca bekletilmesi işleminin bakterilerin canlılık düzeyi değerleri üzerindeki deneysel etkilerine ait kesişim, doğrusal, kuadratik ve etkileşim terimlerinin regresyon katsayılarının varyans analiz sonuçları Çizelge 4.8'de listelenmiştir.

Varyans analizi sonucuna göre, model $p < 0,05$ ve uyum eksikliği $p > 0,05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Modele ait regresyon eşitliği Çizelge 4.8'te gösterilmekte olup determinasyon katsayısı oldukça yüksek bulunmuştur ($R^2 = 0,9888$).

Modelin bağımsız değişkenleri sodyum aljinat ve inülinin interaksiyon etkisi, sodyum aljinat ve kalsiyum karbonatın interaksiyon etkisi, inülin ve kalsiyum karbonatın interaksiyon etkileri istatistiksel olarak mikrokapsül *L.paracasei*'nin pH 2,0'de 60 dk boyunca bekletilmesi işleminin bakterilerin canlılık düzeyi değerlerini etkilediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Enkapsülasyon kaplama materyallerinin pH 2,0'de 60 dakikaya maruz kalmış kapsüllü *L.paracasei* 'nin canlılık düzeyine etkisinin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri Prob > F
Model	3080,41	14	220,03	15,50	0,0222
X₁ (Sodyum Aljinat)	22,78	1	22,78	1,61	0,2946
X₂ (İnülin)	47,05	1	47,05	3,32	0,1662
X₃ (Kitosan)	10,61	1	10,61	0,7476	0,4508
X₄ (Kalsiyum Karbonat)	6,57	1	6,57	0,4630	0,5450
X₁ * X₂	114,58	1	114,58	8,07	0,0656
X₁ * X₃	0,1800	1	0,1800	0,0127	0,9174
X₁ * X₄	357,60	1	357,60	25,20	0,0152
X₂ * X₃	21,78	1	21,78	1,53	0,3035
X₂ * X₄	89,40	1	89,40	6,30	0,0869
X₃ * X₄	12,01	1	12,01	0,8459	0,4255
X₁²	5,19	1	5,19	0,3657	0,5880
X₂²	15,26	1	15,26	1,08	0,3760
X₃²	92,65	1	92,65	6,53	0,0836
X₄²	0,6221	1	0,6221	0,0438	0,8476
Uyum Eksikliği	42,57	2	21,29	17029,16	0,0054
Hata	0,0012	1	0,0012		
Genel	3122,99	17			
Standart Hata	3,77				
Ortalama	9				
C.V	41,84				
R²	0,9864				
Adj-R²	0,9227				
Tahmini R²	-2,5112				
Adeq Precision	13,9926				
$Y_{pH} = 123,38 - 24,55X_1 - 10,70X_2 - 34,80X_3 - 76,46X_4 + 1,41X_1X_2 + 0,10X_1X_3 + 14,95X_1X_4 + 0,73X_2X_3 + 4,98X_2X_4 + 3,26X_3X_4 + 0,35X_1^2 - 0,27X_2^2 + 10,77X_3^2 + 1,98X_4^2$					

***p<0,01**p<0,05*p<0,1

Çizelge 4.8'den anlaşılabileceği gibi inülin ve sodyum aljinatın oranlarının kombinasyon etkisi önemli (p<0.05) bulunmuş olup konsantrasyonu artıkça pH 2 de 60 dk maruziyet sonunda canlılık düzeyinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra inülin ile kalsiyum karbonat oranlarının interaksiyon etkisi önemli olup oran artıkça canlılık düzeyi artmaktadır. Mevcut çalışmada mikrokapsül *L.paracasei* örneklerinin mide sıvısındaki asit ve enzim

varlığında 1 saat maruziyetten sonra canlılık düzeyi üzerine inülin ve sodyum aljinat oranlarının etkisi pH tolerans çalışmaları ile paralel sonuçlar sağlamıştır.

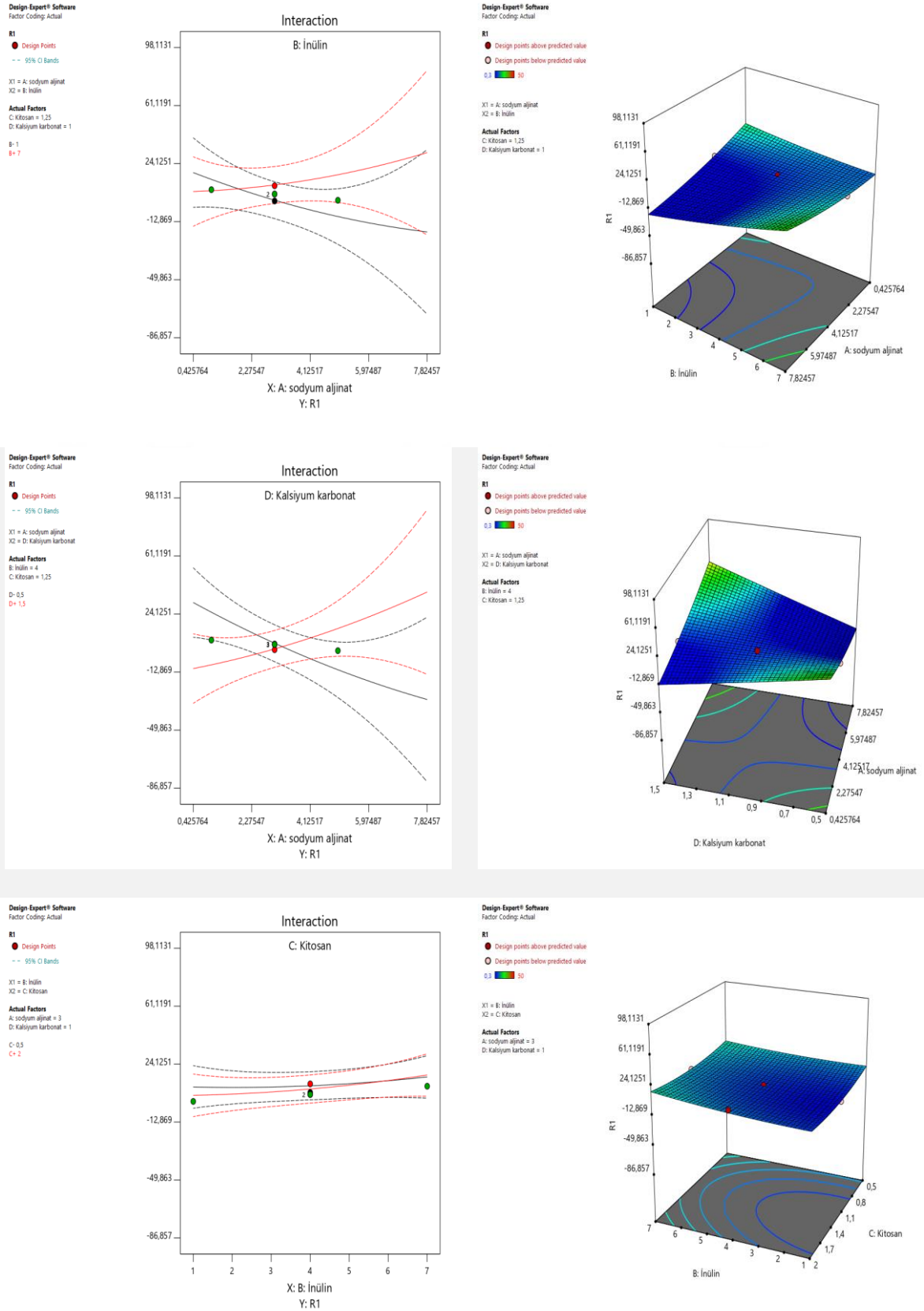
Probiyotik suşlar arasında asit ortamına karşı hayatta kalma kapasiteleri açısından farklılıklar bulunmaktadır (Chavarri ve diğerleri, 2010). Bakterilerin asit etkisine karşı dayanıklılık-taki bu farklılıklar, mikro kapsülleme yoluyla telafi edilebilir.

Prebiyotiklerle birlikte kapsülleme, sadece aljinatla kapsüllenmeye kıyasla bakteri hayatta kalma oranını artırmıştır (Anal ve Singh, 2007; Chen ve diğerleri, 2005). Aljinat matriks içinde prebiyotik ile kapsüllenmiş bakteriler, prebiyotik (Sultana ve diğerleri, 2000) veya serbest hücreler (Chen ve diğerleri, 2005) içermeyen örneklerle kıyasla bakterilerin hayatta kalmasını iyileştirmiştir. Prebiyotik bileşiklerin dâhil edilmesi, çözünmeyen karbonhidrat içeriği nedeniyle bakteri canlılığını artırmıştır. %1 inülin ve %1 elma marş unu, daha yüksek partikül boyutunun yanı sıra %2,5 sodyum aljinat ile birlikte ko-kapsülleme ile oluşturulan mikrokapsüller daha iyi bir yapısal destek sağlamış ve böylece asit koşullarına karşı artan bakteri direncinin yanı sıra daha yüksek canlı bakteri sunmuştur (Serrano-Casas ve diğerleri., 2017)

Çözücü tipi, yükün yoğunluğu, iyonik güç, sıcaklık, pH ve kompleks oluşumu stabiliteyi etkilemektedir. Saf sodyum aljinat ve kitosan çözeltilerinin pH'sı sırasıyla 6,40 ve 3,84 arasında tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada pH değeri 2,0 olarak uygulanmış ve ayrılmış fonksiyonel gruplar, aljinatın anyonik karboksil grubu ve kitosanın katyonik amino grubu arasında bir polielektrolit kompleks reaksiyonu meydana gelebilir.

Kitosan pH 6,0 altındaki seyreltik asidik çözeltilerde kolayca çözünür ve amino grupların varlığı, pH'ın kitosan yüklü durumunu ve özelliklerini önemli ölçüde değiştirdiğini göstermektedir. Düşük pH'da, bu aminler protonlanır ve pozitif olarak yüklenir ve kitosan suda çözünür bir katyonik polielektrolit yapar (Dash ve diğerleri, 2011).

Bu duruma dayanarak bakteri enkapsülasyonun koruyucu etkisini azalttığı söylenebilmektedir. Faktörlerin interaksiyon etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyleri Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. pH toleransı üzerinde faktörlerin interaksiyon etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyler

4.3.4. Simüle safra tuzun çözeltisinde serbest ve kapsüllü bakterilerin canlılık düzeyi

Probiyotik bakteriler, ince bağırsak koşullarında ve daha spesifik olarak yüksek safra konsantrasyonlarında hayatta kalma yeteneğine sahip olmalıdır. Safra tuzunun serbest hücrelerle etkileşimi, hücre duvarı bütünlüğünü olumsuz etkileyerek hücreler arası materyallerin sızmasına ve sonunda hücre ölümüne yol açabilmektedir (Bron ve diğerleri, 2004). Probiyotiklerin asitlere, safra tuzlarına, oksijene ve gastrointestinal koşullara direnç gösterme kabiliyetinin önemli ölçüde artması için uygun mikrokapsül preparatı ile dış ortamlardan saklanabilmekte ve izole edilebilmektedir (Heidebach ve diğerleri, 2012). Bu nedenle, safra tuzunu simüle eden bir in-vitro modelde mikrokapsüllenmiş probiyotiklerin canlılıkları üzerindeki etkisini gözden geçirmek önemlidir. Bu çalışma kapsamında kapsül *L. paracasei* bakterilerinin simüle safra tuz çözeltisine maruz kaldıktan sonra hayatta kalabilen kapsüllenmiş hücrelerin canlılık düzeyi belirlenmiş ve Çizelge 4.9’da örneklerin sodyum aljinat, kitosan, inülin, kalsiyum karbonat ve oranlarına bağlı canlılık düzeyi değerleri gösterilmiştir.

Dondurarak kurutma yöntemi ile üretilen mikrokapsüllerin bir saat simüle safra tuz çözeltisine maruz kaldıktan sonra hayatta kalabilen kapsüllenmiş hücrelerin canlılık düzeyi %0,2±0,06 ile %6,75±3,18 aralığında değişmektedir. En düşük canlılık düzeyi, %0,2 olarak 4. ve 8. deneme noktalarında 4×10^5 log kob/ml bakteri saptanırken, en yüksek ise %1:4:1,25:1 (sodyum aljinat: inülin: kitosan: kalsiyum karbonat) oranında hazırlanan formülasyonda (10. deneme noktası) %6,75 olarak tespit edilmiş ve mikrokapsülün içerisinde $12,5 \times 10^7$ log kob/ml bakteri saptanmıştır. Başlangıçta serbest *L. paracasei* bakteri sayısı $2 \cdot 10^9$ log kob/ml olan kontrol numuneleri simüle safra tuzu çözeltisine maruz kaldıktan sonra hayatta kalabilen bakteri sayısı bir saat sonunda 4×10^5 log cfu/mL olarak tespit edilmiştir.

Dimitrellou ve diğerleri, (2019) Ca-aljinat kapsüllemesinin *L. casei*’nin safra tuzları çözeltisinde (%0,5 ve %1) hayatta kalması üzerine olası koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada serbest hücrelerin sayısı 7,85 log cfu/g iken 6 saat sonra serbest hücreler için kayıp 5,96 log cfu/g iken, kalsiyum-aljinat kapsüllenmiş hücreler için kayıp sadece 2,20 log cfu/g olarak saptanmıştır. Mevcut çalışmada elde edilen bakterilerin simüle safra tuz çözeltisinde canlılık düzeyi bu çalışmadaki kapsül bakterilerden yüksek olduğu görülmektedir. Simüle edilmiş oral-gastrointestinal sindirimden elde edilen sonuçlar kapsülleme etkinliği ve kapsülleme malzemesinin stabilitesi üzerindeki etkinliği ile ilişkilendirilebilir (Calabuig-Jimenez ve diğerleri, 2019).

Çizelge 4.9. Enkapsülasyon kaplama materyallerinin simüle safra tuzu çözeltisine maruz kalmış *L.paracasei* canlılık düzeyi değerleri (%)

Deneme noktası	Sodyum Aljinat X ₁ (%)	İnülin X ₂ (%)	Kitosan X ₃ (%)	CaCO ₃ X ₄ (%)	60 dk (%)
1	5	4	1,25	1	6,25±1,76
2	5	7	2	0,5	0,5±0,01
3	1	1	0,5	0,5	3,15±0,01
4	1	1	2	0,5	0,2±0,06
5	3	4	1,25	1	3,75±0,09
6	1	7	2	1,5	4±2,12
7	3	1	1,25	1	0,5±0,03
8	3	4	1,25	1,5	2±0,06
9	3	4	2	1	2±0,70
10	1	4	1,25	1	6,75±3,18
11	1	7	0,5	1,5	0,75±0,35
12	5	1	2	1,5	2±0,06
13	3	7	1,25	1	5±4,24
14	3	4	1,25	1	3±3,88
15	5	7	0,5	0,5	6±1,41
16	3	4	1,25	0,5	4,25±5,30
17	3	4	0,5	1	3,25±3,88
18	5	1	0,5	1,5	2,25±2,47
Kontrol	Serbest <i>L. paracasei</i> bakteri				0,02±0,09

Mikrokapsül *L.paracasei* örneklerinin simüle safra tuzu çözeltisinde 60 dk maruziyetten sonra canlılık düzeyi üzerine işlem parametrelerinin etkisini gösteren varyans analizi sonuçları ve regresyon eşitliği Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Bu modele ait R² değeri 0,9833 olarak belirlenmiştir. R² değerinden de anlaşıldığı gibi sodyum aljinat, inülin, kitosan ve kalsiyum karbonat kapsül malzemelerinin simüle safra tuzu çözeltisinde canlılık düzeyinin belirlenmesi üzerindeki etkileri model ile başarılı bir şekilde açıklanabilmektedir. Kullanılan bu bileşenlerin ilgili parametre üzerine etkisini ifade eden model (p<0,05) önemli iken uyumsuzluk (lack of fit) önemli bulunmamıştır (P>0,05). Modele ait regresyon eşitliği Çizelge 4.10'de verilmiştir.

Çizelge 4.10.'daki varyans analizi sonuçlarına göre inülin ve kitosanın doğrusal etkisi, sodyum aljinat ve kitosanın interaksiyon etkisi, sodyum aljinat ve kalsiyum karbonatın interaksiyon etkisi, kitosan ve kalsiyum karbonatın interaksiyon etkilerinin yanı sıra sodyum aljinat ve kitosanın kuadratik etkileri istatistiksel olarak önemlidir ve simüle safra tuzu çözeltisinde mikrokapsül *L.paracasei* canlılık düzeyini etkilediği tespit edilmiştir (p<0,05).

Çizelge 4.10. Enkapsülasyon duvar malzemelerinin *L.paracasei* simüle safra tuzu çözeltisinde canlılık düzeyi üzerine etkisinin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri Prob > F
Model	68,41	14	4,89	11,79	0,0328*
X₁ (Sodyum Aljinat)	0,1250	1	0,1250	0,3015	0,6212
X₂ (İnülin)	10,13	1	10,13	24,42	0,0159*
X₃ (Kitosan)	4,49	1	4,49	10,83	0,0461*
X₄ (Kalsiyum Karbonat)	2,53	1	2,53	6,10	0,0900
X₁ * X₂	1,66	1	1,66	4,00	0,1392
X₁ * X₃	4,58	1	4,58	11,03	0,0450*
X₁ * X₄	5,15	1	5,15	12,42	0,0388*
X₂ * X₃	0,1128	1	0,1128	0,2721	0,6380
X₂ * X₄	0,5406	1	0,5406	1,30	0,3364
X₃ * X₄	16,39	1	16,39	39,52	0,0081**
X₁²	14,11	1	14,11	34,03	0,0100*
X₂²	4,84	1	4,84	11,68	0,0419
X₃²	5,76	1	5,76	13,89	0,0337*
X₄²	2,58	1	2,58	6,21	0,0883
Uyum Eksikliği	0,9627	2	0,4813	1,71	0,4755
Hata Genel	0,2813	1	0,2813		
Standart Hata Ortalama	69,66	17			
C.V	0,6439				
R²	3,09				
Adj-R²	20,85				
Tahmini R²	0,9821				
Adeq Precision	0,8988				
	-1,5765				
	10,7195				
$Y_{\text{safra}} = 3,95 - 0,25X_1 + 2,50X_2 - 0,67X_3 - 1,13X_4 - 1,20X_1X_2 - 0,7562X_1X_3 + 1,79X_1X_4 + 0,1188X_2X_3 - 0,5813X_2X_4 + 1,43X_3X_4 + 2,36X_1^2 - 1,39X_2^2 - 1,51X_3^2 - 1,01X_4^2$					

***p<0,01**p<0,05*p<0,1

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde inülin faktörünün enkapsülasyonun safra tuzuna karşı bakterilerin canlılık düzeyi üzerindeki pozitif doğrusal etkisi çok önemli (p<0,01) bulunmuştur. Mikro kapsül duvar malzemesi formülasyonunda %6,16 oranında inülinin simüle safra tuzu çözeltisinde mikrokapsüllerin canlılık düzeyi için optimum konsantrasyon olduğu belirlenmiştir. Literatürde araştırılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında mevcut çalışmadaki inülin konsantrasyonu yüksektir. Babu, Rath ve Nithyalakshmi (2011), yağsız süt tozu, inülin, yüksek dirençli nişasta, aljinat ile emülsiyon teknikleri kullanılarak mikrokapsül haline getirilen *L. casei* MTCC 1423'ün hayatta kalma kabiliyeti araştırılmış ve inülin konsantrasyonunun artması ile canlılık düzeyinin arttırdığı çalışmada da gözlemlenmiştir. Ayrıca buna ek olarak son zamanlarda, Fritzen-Freire ve diğerleri, (2011), duvar malzemesi olarak sulandırılmış yağsız süt, inülin ve inüline ek bazı prebiyotiklerle sprey kurutma tekniği kullanılarak *Bifidobacterium BB-12*'nin mikro kapsüllenmesini gerçekleştirmiştir. Bu organizmanın

4°C'de depolama sırasında sadece sulandırılmış yağsız sütle üretilenlerden daha yüksek hayatta kalma oranı bulunmuştur. Farias ve diğerleri (2019), yapıları çalışmada da polimer kaplı grup (sodyum aljinat, kiozan, CaCl_2) ekstrüzyon yöntemi ile *L. casei* ATCC33'nin enkapsülasyonu örnekleri 240 dk simüle edilmiş bağırsak aşamasından sonra %86,2'lik bir yaşayabilirlik oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Mevcut çalışmada elde edilen canlılık düzeyinin bu çalışmadaki mikrokapsülden düşük olduğu görülmektedir. Bu farklılığın sebepleri; safra tuz çözeltisine maruz kalma süresinin artmasının ve kullanılan enkapsülasyon yönteminin sonuçları etkilediği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra safra asitlerinin pKa ve LogP'nin farklı fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, MRS ortamındaki safra asitlerinin çözünürlüğü önemli ölçüde değiştirmektedir. Sonuç olarak, probiyotikleri tüm safra asitleri için aynı konsantrasyon aralığına maruz bırakmak mümkün olmayabilmektedir. Sonuçlar safra asiti tuzlarının doğasına ve konsantrasyonuna, bakteri suşuna bağlı olarak değişebilmektedir (Adebola ve diğerleri, 2014).

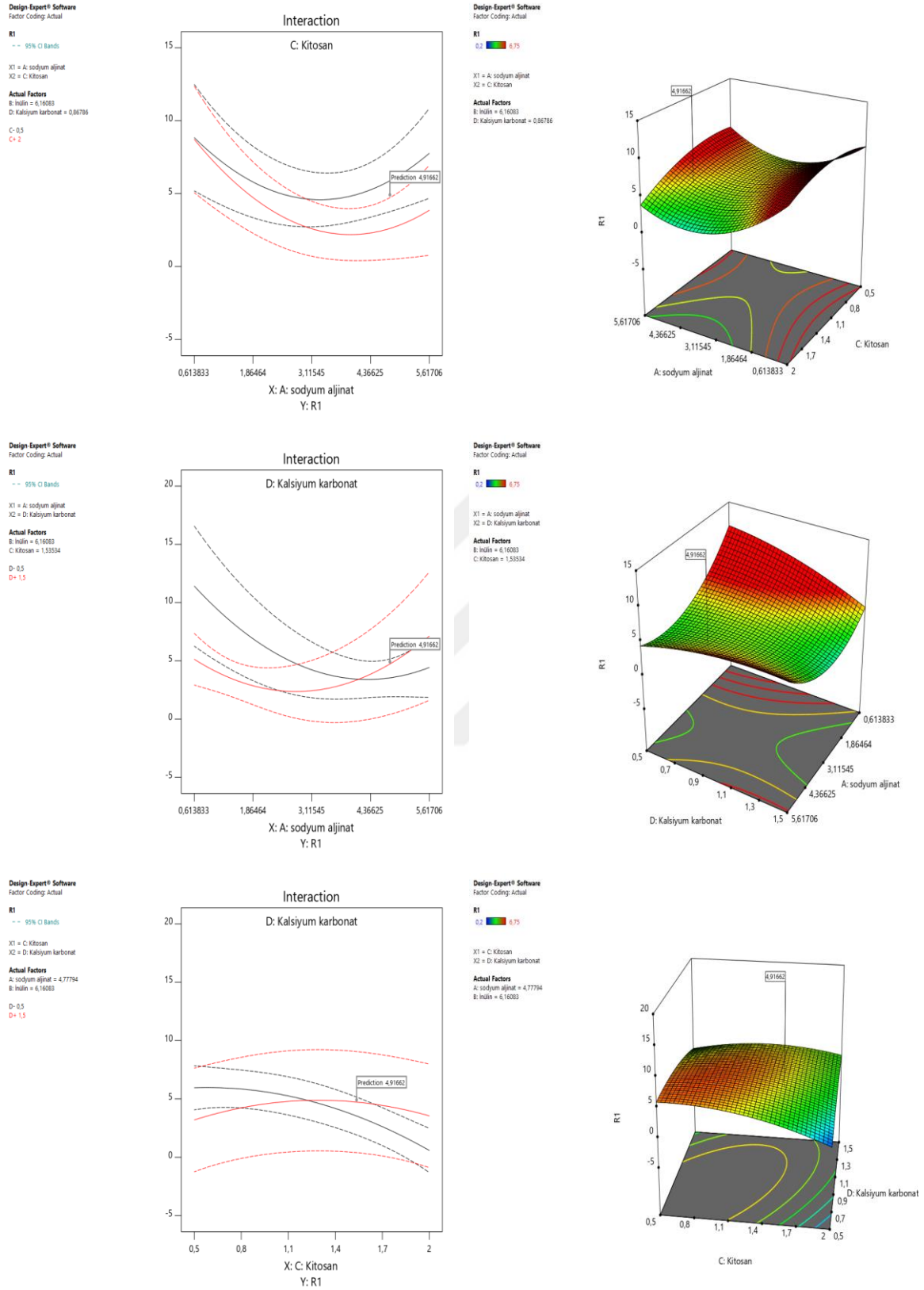
Adebola ve diğerleri, (2014) beş *Lactobacilli* kültürünün büyümesi için inülin, laktuloz ve laktobiyonik asit probiyotiklerinin kullanma yeteneği karşılaştırılmış olup safra asit stresi varlığında probiyotik sağkalımını kolaylaştırma yetenekleri açısından da değerlendirilmiştir. Buna göre probiyotiklerin probiyotikleri safra asidi toksisitesinden koruma yeteneği üzerine, Saarela ve diğerleri (2003) tarafından yapılan araştırmalara göre laktulozun laktik asit bakterilerinin safra toleransını iyileştirebileceği gösterilmiştir. Potansiyel probiyotikler probiyotikleri safra asidi stresinden koruma yeteneği, basitçe, safra asidi stresine daha iyi yanıt vermelerini sağlayan laktobasillere ek veya alternatif bir enerji kaynağı sağlamayı içerebilir. Bakterilerin canlılık düzeyi için probiyotikler kolondaki bakteriyel enerjinin anahtar kaynaklarından biridir (Schneeman, 1999). Diğer bir olasılık, belirli probiyotiklerin yüksek konsantrasyonlarının, safra asitlerinin çözünürlüğünü azaltarak toksisiteyi düşürmesidir.

Literatür incelendiğinde sadece aljinat ile kapsüllenmiş bakterilerin hayatta kalma oranının %20'den daha az olduğu belirlenmiş ve bu da polimerin tek başına probiyotiklerin bağırsaklardan geçişi sırasında sınırlamalar sunduğunu göstermektedir (Lotfipour ve diğerleri, 2012). Bu çalışmalara paralel olarak sodyum aljinat ve inülinin pozitif yönde interaksyon etkisi çok önemli ($p < 0,05$) olduğu saptanmış Şekil 4.4'de verilen grafikler incelendiğinde bu etkinin artmasıyla mikrokapsül *L.paracasei*'nin simule safra tuzu çözeltisinde canlılık düzeyi artmıştır.

Genel olarak prebiyotik bileşikler, probiyotik bakterilerin büyümesi için karbon ve nitrojen kaynakları sağlamaktadırlar (Ann ve diğerleri, 2007), bu organizmaların büyüyebileceği ve konakçıya sağlık yararları sağlayabileceği kalın bağırsak yolunda yüksek sayıda hücre geçirebilir ve kolonize edilebilir. İnülinin yüksek koruma yeteneği; inülinin güçlü yapısı tarafından oluşturulan daha yüksek kapsül yoğunluğu ile açıklanabilir. Aljinat moleküllerinin çapraz bağlanması, esas olarak glukuronik asidin iki değerlikli katyonlara bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Molekül ağırlığı ve kimyasal bileşimi, aljinat biyopolimer membranların stabilitesini ve geçirgenliğini etkiler. Aljinat biyopolimerin stabilitesi öncü yapısına, biyopolimerin molar oranına ve ekleme dizisine bağlıdır. Probiyotiklerin mikrokapsülle uygulaması sırasında inülin veya diğer prebiyotiklerinin eklenmesi, bu organizmaların pH'ı ve simüle edilmiş sindirim sisteminde safra tuzuna karşı varlığını arttırmış ve tüm uygulamalarda prebiyotikler daha fazla hücre sayısına neden olmuştur.

Şekil 4.4'de verilen grafikler incelendiğinde kitosan ve kalsiyum karbonat bileşen konsantrasyonu artmasıyla enkapsüle *L.paracasei* bakterinin safra tuzuna karşı bakterilerin canlılık düzeyi artmıştır. Mikrokapsül duvar malzemesi formülasyonunda %2,77 oranında inülin ve %1,76 kitosan oranından sonra enkapsülasyon etkinliğinin arttığı tespit edilmiştir.

Kitosanın sodyum aljinat yüzeyinde adsorbe olması böylece sodyum aljinatın gözenekli kusurlarını telafi ederek hücrelerin mikrokapsüllerde sabit bir şekilde sabitlenmesi ve mide asidi ve stabil tuzlarla etkili temas alanını azaltır (Ji ve diğerleri 2019). Sodyum aljinatın gözenek kusurlarının kapatılmasında kitosanın tek başına yeterli olmadığı ve bu etkinin kalsiyum karbonat ile artırıldığı tarafımızca doğrulanmıştır. Yine bu sonucu destekleyen etki-leşim araştırma sonuçlarıyla tespit edilmiştir. Sodyum aljinat ve kalsiyum karbonatın interaksyonun pozitif etkisi önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Sonuçlar, probiyotik bakterileri asidik sıvı ve safra tuzundan korumada en etkili aljinat-kitosan-inülin-kalsiyum karbonat mikrokapsüllerinin olduğunu ve bu mikrokapsüllerin probiyotik kültürlerin insanların gastrointestinal sistemlerine ulaştırılmasında potansiyel olarak faydalı olduğunu göstermiştir. Faktörlerin interaksyon etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyleri Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. *L.paracasei* simule safra tuzu çözeltisinde canlılık düzeyi üzerinde faktörlerin interaksiyon etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyler

4.3.5 Serbest ve kapsüllü bakterilerin ısı toleransı

Geleneksel olarak, probiyotikler için en iyi dağıtım yöntemi olarak süt ürünleri tercih edilmiştir. Ancak günümüzde yenilikçi bulgular ve uygulamalar probiyotiklerin çok sayıda süt ürünü olmayan gıda ürününe girmesini sağlamıştır. Bu nedenle, gıda ürünlerine eklendikten sonra probiyotikler için ısıl işleminin gerekli olduğu durumlarda aşırı ısı etkisiyle öldürülmesini engellemek önemlidir. Gıdaların pastörizasyonu, uzun raf ömrüne sahip güvenli bir gıda elde etmek için patojenik ve bozucu bakterileri ortadan kaldırmak amacıyla yaygın uygulamalardan biridir (Teoh ve diğerleri 2011). Geleneksel pastörizasyon için önerilen kısa süre yüksek sıcaklık (örneğin, 70°C 15sn) uygulamaları tercih edilmektedir. Bu çalışmada, enkapsüle *L. paracasei*'nin hayatta kalmasının değerlendirildiği hafif bir ısıl işlemi simüle edilmeye çalışılmıştır. Buna göre kapsül *L. paracasei* bakterilerinin ısı tolerans etkinliği belirlenmiş ve Çizelge 4.11'de örneklerin sodyum aljinat, kitosan, inülin, kalsiyum karbonat ve oranlarına bağlı ısı tolerans etkinlik değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Enkapsüle edilmiş *L. paracasei* bakterisinin 70°C 90 saniyede maruziyeti sonunda canlılık düzeyi değerleri

Deneme noktası	Sodyum Aljinat X ₁ (%)	İnülin X ₂ (%)	Kitosan X ₃ (%)	CaCO ₃ X ₄ (%)	Isı toleransı (%)
1	5	4	1,25	1	1,5±0,89
2	5	7	2	0,5	2,425±0,00
3	1	1	0,5	0,5	2,85±0,78
4	1	1	2	0,5	8,825±0,63
5	3	4	1,25	1	1,225±0,78
6	1	7	2	1,5	1,25±0,89
7	3	1	1,25	1	0,4±0,69
8	3	4	1,25	1,5	5,375±0,90
9	3	4	2	1	2,5±0,00
10	1	4	1,25	1	6,325±0,00
11	1	7	0,5	1,5	3,875±1,52
12	5	1	2	1,5	2,225±1,00
13	3	7	1,25	1	1,675±0,79
14	3	4	1,25	1	1±0,89
15	5	7	0,5	0,5	4,55±0,14
16	3	4	1,25	0,5	0,00005±0,10
17	3	4	0,5	1	5±0,56
18	5	1	0,5	1,5	9±0,080

Sodyum aljinat, kitosan, inülin ve kalsiyum karbonat kombinasyonları *L. paracasei* bakterisinin 70°C 90 saniyede maruziyeti sonunda canlılık düzeyi üzerinde farklı tepkiler vermiştir. Çizelge 4.11'e göre farklı oranlarda hazırlanan kaplama ajanları ile oluşturulan mikrokapsül

örneklerinin simüle ısı uygulaması sonunda canlılık düzeyi $0,00005 \pm 0,00$ ile $9 \pm 0,80$ arasında saptanmıştır.

En yüksek ısı tolerans etkinliği sırasıyla 5:1:0,5:1,5 oranlarında sodyum aljinat, inülin, kitosan, kalsiyum karbonat kullanılarak hazırlanan kapsül formülasyonunda (12. deneme noktası) $9 \pm 0,80$ bulunurken, en düşük ise 16. deneme noktasında bakterilerin canlılık düzeyi $0,00005 \pm 0,00$ olarak gözlemlenmiştir. Enkapsülasyon için hazırlanan serbest *L. paracasei* için bakteri sayısı $2 \pm 0,9 \cdot 10^9$ log kob/g iken, ısı işleminden sonra hücreler tamamen inaktive olmuştur.

Farklı konsatrasyonlarda kullanılan enkapsülasyon ajanların kapsülasyon uygulamalarında 90 saniye boyunca 70°C 'de ısı işlemi ile *L. paracasei*'nin hayatta kalma yüzdesi verilerine göre yaşayabilirliğinin etkisi değerlendirildi. Enkapsüle edilmemiş/serbest *L. paracasei* 70°C 'ye maruz bırakılan ısı işlemi ile tamamen inaktive olmuştur. Kitosan/aljinat/inülin/kalsiyum karbonat partikülleri ile kaplanan bakteriler, serbest hücrelerden daha yüksek ısı stabilitesi göstermiştir. Hayatta kalan kapsüllenmiş bakterilerin sayısı 4 dk 70°C 'de ısı işlemi sonunda $2 \cdot 10^4$, $3 \cdot 10^4$ ve $5 \cdot 10^5$ olarak tespit edilmiştir (veriler grafikte gösterilmemiştir) (1, 2 ve 6 deneme noktası). Enkapsülasyon ajan konsatrasyonları (deneme noktası 18) ile oluşturulan formülasyona göre ısı tolerans etkinliği $91,25$ olan enkapsüle bakterilerin ısı işlemi sonrası bakteri sayımında en yüksek hücre sayısı ($1,8 \cdot 10^6$ log cfu/gr) elde edilmiş ve hayatta kalma oranı 9 olarak tespit edilmiştir. Isı işlemi sonrası en düşük koruma düzeyi sağlanan 16. örnekte bakteri sayısı $1 \cdot 10^3$ ve hayatta kalma oranı $0,00005$ olarak tespit edilmiştir.

Malmo ve Mauriello (2021), 1% sodyum aljinat, $62,5$ mM CaCl_2 , ve zeytin yağı ile enkapsüle edilen *L. reuteri* DSM 17938 ve *L. plantarum* 48M bakterilerinin 70°C 'de 2 dk ve 80°C 'de 2 dk ısı işlemi tabi tutulmuş olup sonunda bakterilerin canlılık düzeyi belirlenmiştir. Buna göre enkapsüle *L. reuteri* DSM 17938 70°C 2 dakika ısı işlemi sonucunda $2,1 \cdot 10^{-3}$, 80°C 'de 2 dakika ısı işlemi sonunda ise $4,2 \cdot 10^{-3}$ log kob/gr bakteri sayısı elde edilmiştir. Enkapsüle *L. plantarum* 48M ise 70°C 'de 2 dakika ve diğer sıcaklıklarda tamamen inaktive olduğu rapor edilmiştir. Spesifik olarak, 60°C 'de *L. plantarum* 48M'nin hayatta kalma oranı, serbest için $0,0039$ ve mikrokapsüllenmiş hücreler için $0,0008$ belirlenmiştir. Mevcut çalışmada elde edilen canlılık düzeyinin bu çalışmadaki ısı toleransı sonuçlarına benzer ve bir miktar yüksek olduğu görülmektedir. Mikrokapsüllemenin, ısı işlemlere tabi tutulduktan sonra *L. paracasei*'nin hayatta kalmasını iyileştirmede göstermektedir.

Bulgularımızın ışığında, test edilen mikroorganizmanın farklı bir sitoplazmik membran bileşimi olduğunu ve bu ısı işlemlere maruz kaldıklarında farklı davranışlar sergiledikleri görülmüştür. Mikro kapsül *L.paracasei* örnekleri 70°C 90 saniyede maruziyeti sonunda canlılık düzeyi değerleri üzerine işlem parametrelerinin etkisini gösteren varyans analizi sonuçları ve regresyon eşitliği Çizelge 4.12’de verilmiştir. Bu modele ait R² değeri 0,9792 olarak belirlenmiştir. R² değerinden de anlaşıldığı gibi sodyum aljinat, inülin, kitosan ve kalsiyum karbonat kapsül malzemelerinin 70°C 90 saniyede maruziyeti sonunda canlılık düzeyinin belirlenmesi üzerindeki etkileri model ile başarılı bir şekilde açıklanabilmektedir (Çizelge 4.12). Kullanılan bu bileşenlerin ilgili parametre üzerine etkisini ifade eden model (p<0,05) önemli iken uyumsuzluk (lack of fit) önemli bulunmamıştır (P>0,05).

Çizelge 4.12. Enkapsülasyon duvar malzemelerinin *L.paracasei* 70°C 90 saniyede maruziyeti sonunda canlılık düzeyinin üzerine etkisinin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri Prob > F
Model	120,42	14	8,60	10,08	0,0408*
X₁ (Sodyum Aljinat)	11,64	1	11,64	13,65	0,0344*
X₂ (İnülin)	0,8128	1	0,8128	0,9529	0,4010
X₃ (Kitosan)	6,48	1	6,48	7,60	0,0704
X₄ (Kalsiyum Karbonat)	14,45	1	14,45	16,93	0,0260*
X₁ * X₂	14,16	1	14,16	16,60	0,0267*
X₁ * X₃	18,76	1	18,76	21,99	0,0183*
X₁ * X₄	6,32	1	6,32	7,41	0,0724
X₂ * X₃	1,95	1	1,95	2,29	0,2277
X₂ * X₄	10,71	1	10,71	12,56	0,0383*
X₃ * X₄	21,95	1	21,95	25,73	0,0148*
X₁²	7,21	1	7,21	8,46	0,0621
X₂²	3,54	1	3,54	4,15	0,1344
X₃²	5,89	1	5,89	6,91	0,0784
X₄²	0,5471	1	0,5471	0,6414	0,4818
Uyum Eksikliği	2,53	2	1,27	50,05	0,0995
Hata	0,0253	1	0,0253		
Genel	122,98	17			
Standart Hata Ortalama	0,9236				
C.V	3,33				
	27,71				
R²	0,9821				
Adj-R²	0,8821				
Tahmini R²	-3,1689				
Adeq Precision	11,2179				

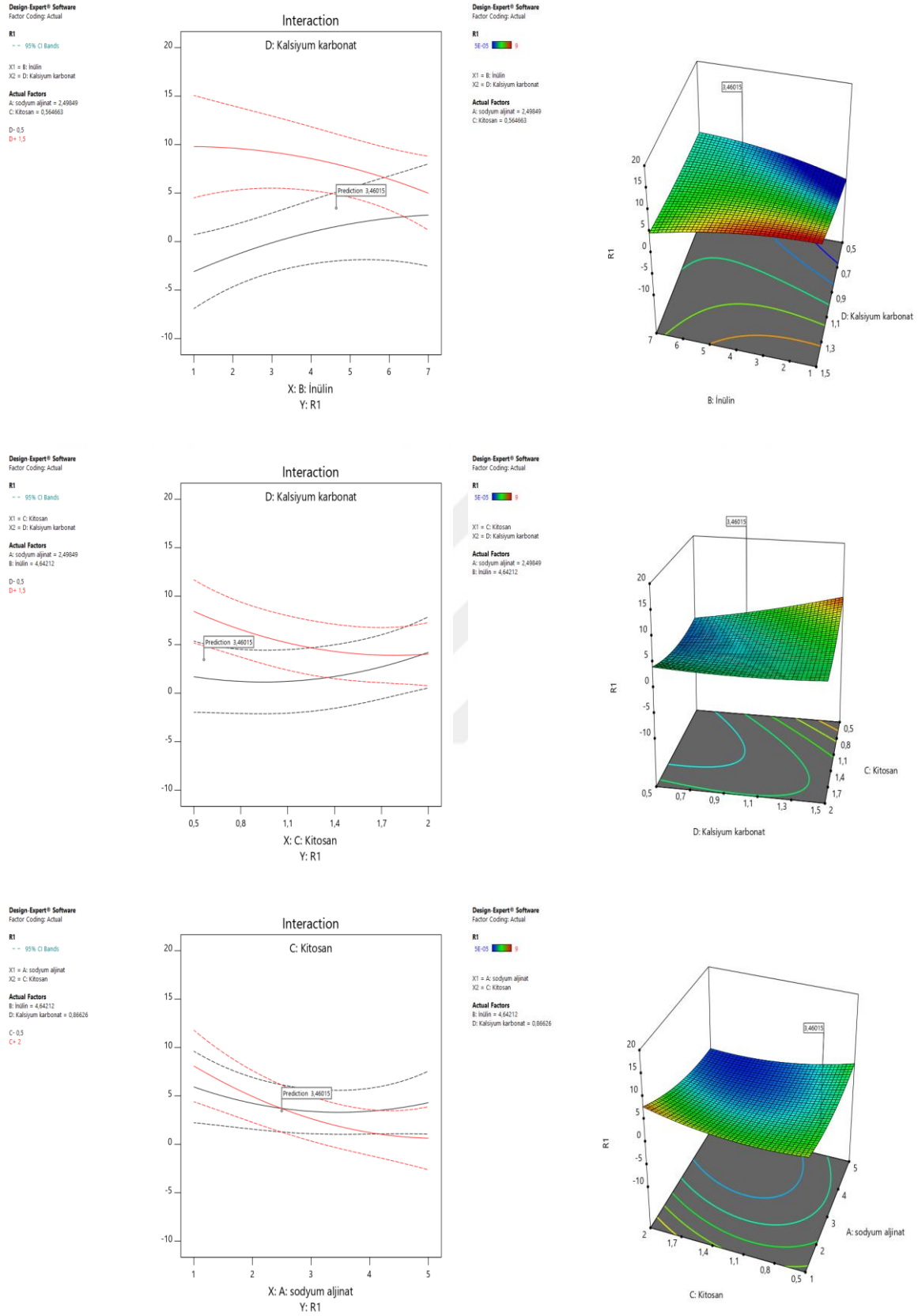
$$Y_{\text{ısı toleransı}} = 3,95 - 2,41X_1 + 0,6375X_2 - 0,8050X_3 + 2,69X_4 + 2,97X_1X_2 - 1,53X_1X_3 + 1,99X_1X_4 - 0,4938X_2X_3 - 2,59X_2X_4 - 1,66X_3X_4 + 1,69X_1^2 - 1,18X_2^2 + 1,53X_3^2 - 0,4656X_4^2$$

***p<0,01**p<0,05*p<0,1

Çizelge 4.12.'deki varyans analizi sonuçlarına göre sodyum aljinat ve kalsiyum karbonatın doğrusal etkisi, sodyum aljinat ve kitosanın interaksiyon etkisi, sodyum aljinat ve inülinin interaksiyon etkisi, kitosan ve kalsiyum karbonatın interaksiyon etkisi, inülin ve kalsiyum karbonatın interaksiyon etkileri istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Mikrokapsül *L.paracasei* örneklerinde yalnızca kalsiyum karbonat oranının ısı toleransı üzerine artırıcı etkisi önemli ($p<0,05$) iken, sodyum aljinatın ısı toleransını azaltıcı etkisi önemli ($p<0,05$) bulunmuştur.

Probiyotikler organik çözücülere çok duyarlı olduğundan, toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilen bir polimer ağı bulunan kalsiyum-aljinat/kitosan hidrojel, bu canlı hücrelerin mikrokapsüllenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhao ve diğerleri, 2015). Aljinat, kahverengi deniz yosunlarından ekstrakte edilen yapısal polisakkarittir. Homojen bir β -Dmannuronik asit (M-blok), α -L-guluronik asit (G-blok) ve her ikisinin (MG-bloğu) heterojen dizisinden oluşur (Izydorczyk, Cui ve Wang, 2005). Divalent katyonlar (örneğin Ca^{2+}), ısıya dayanıklı bir ağ oluşturan bir jelleşme reaksiyonu yoluyla yan zincirlerdeki G bloklarını kolayca çapraz bağlayabilir (Eslami, Shahedi ve Fathi, 2018). Bu değerlendirmeler göz önüne alındığında mevcut çalışmada kalsiyum karbonatın olumlu etkisi literatür ile ilişkilendirilebilmektedir. Kalsiyum karbonatın mikrokapsül formülasyonun hazırlanmasında %0,86 konsantrasyon mevcut çalışma için optimum nokta olmakla birlikte pozitif yönde doğrusal etkisi önemlidir. Ancak inülin ve kalsiyum karbonatın, kitosan ile kalsiyum karbonatın interaksiyon etkisi önemlidir ve negatif yönde etkilidir ($p<0,05$). Mevcut çalışmada mikrokapsül formülasyonu için kitosan %0,56 oranında kullanıldığında optimum sonuç verirken %1,4 konsantrasyondan sonra ısı toleransı üzerine olumlu etkisi olabileceği çalışmada tespit edilmiştir. İnülin konsantrasyonunda ise %4,64 oran ilavesi ile ısı toleransı üzerine maksimum etkiyi sağlamış ve bu konsantrasyondan sonra inülinin olumlu koruyucu etkisi azalmıştır. Abbaszadeh ve diğerleri (2014) *L. rhamnosus* bakterisi 0,1 mol/L $CaCl_2$, farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat (%20,30 ve %40) ve kitosan (%2,4,10) çözeltisi ile enkapsüle edilmiş ve ısı toleransı araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; kitosan kaplamanın aljinatla kapsüllenmiş *L. rhamnosus*'un öldürücü ısı işleme karşı bariyer etkisini iyileştirdiğini ve etkisinin konsantrasyonla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Faktörlerin interaksiton etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyleri Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. *L.paracasei* 70°C 90 saniyede maruziyeti sonunda canlılık düzeyi üzerinde faktörlerin interaksiton etkisini açıklayan grafikler ve 3D boyutlu tepki yüzeyler

4.3.6. SEM (Taramalı elektron mikroskobu)

Taramalı elektron mikroskobu katı formdaki maddelerin yüzeysel detaylarını nanometrik boyutlarda görüntüleme imkânı sunmaktadır. Bu yüzden kurutulmuş mikrokapsüllerin yüzey morfolojisini incelemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. SEM ile elde edilen görüntülere göre enkapsülasyon işlemi sonrasında elde edilen mikro kapsüllerin gözenekli yapıda olduğunu ve enkapsüle probiyotik bakterilerin (*L. paracasei*) bu gözenekli yapıların bulunduğu kapsül duvarının tüm yüzeyine dağılıp kümeler oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Aljinatın gözenekliliği, sindirim sistemi boyunca hareket eden bakterilerin canlılığını sürdürme açısından önemlidir. Aljinat özelliklerini (guluronik ve mannuronik asidin moleküler ağırlığı, içeriği ve sıralı dağılımı) ve jelleşme kinetiğini, iki değerlikli katyon konsantrasyonunu değiştirerek bakteri için daha koruyucu olan daha az gözenekli bir matris (jel) oluşturmak için değiştirilebilir.(Prakash ve Jones, 2005).

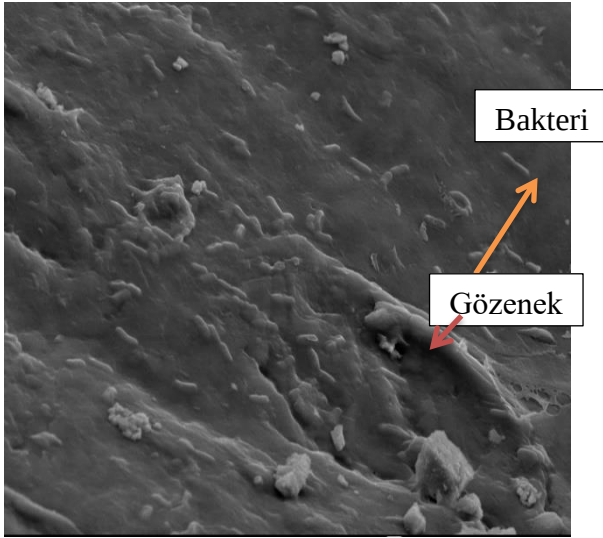
SEM analizi ile bu çalışmada üretilen aljinat mikro kürelerin probiyotik bakterilerle daha yoğun şekilde yüklendiğini ve aljinat matrisinin Sathyabama ve Vijayabharathi (2014) tarafından üretilen çalışmasına kıyasla daha az gözenekli olduğunu ortaya çıkarmıştır. İlginç bir şekilde, çalışmamızda bakterilerin etrafında boşluklar gözlenmezken, Sultana ve diğerlerinin (2000) yaptıkları çalışmada bakteri etrafında gözeneklerin fazlalığının olası açıklaması bakteri varlığının, yakın çevrelerindeki aljinatın jelleşmesini bozması olarak ifade edilmiştir. Mevcut çalışmada yüzey görüntülerinden, tüm mikrokapsül örneklerinde iyonik olarak çapraz bağlanmış Ca^{2+} polisakkarit hidrojelinden kaynaklanan tipik bir damar benzeri yapı kalsiyum karbonat oranı yüksek olan tüm örneklerin yüzeyinde $2000\times$ büyütme altında görüntülenmiştir. Benzer sonuçlar Qi ve diğerlerinin (2020) çalışmasında da elde edilmiştir.

Sodyum aljinat konsantrasyonun düşük (%1) olduğu altı numaralı örnekte (1:7:2:1,5, sodyum aljinat: inülin: kitosan: kalsiyum karbonat) gözenek sayısının fazla olması ve bakteri hücrelerinde şekil bozukluğu enkapsülasyon duvar malzemelerinin etkinliğinin yeterince sağlanamadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca enkapsülasyon duvar malzemelerinin farklı oranlarda kullanılması ile bazı yüzeylerde buruşuk ve katlanmış yüzey yerine daha pürüzlü ve engebeli olma eğiliminde olduğu fark edilmiştir. Bu nedenle, probiyotikler katlanmış yapı olmadan bu yüzeye sığ bir şekilde gömülmüştür. Sonuçlar tüm suşlar için önemli bir canlılık

kaybı olmadığını ve hücrelerin başarıyla yakalandığını göstermektedir (Resim 4.1.). *L. paracasei* çubuk şeklindedir, boyutları 2,0 µm ila 4,0µm genişliğinde ve 0,8 ila 1.0µm uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. Bu suşların etrafında kalın bir tabaka tespit edilmiştir. Farklı oranlardaki enkapsülasyon duvar materyalleri ile birlikte yoğun, kısmen pürüzsüz yüzey özellikleri ve stres faktörlerine karşı daha iyi dayanma yeteneği kazandırdığı görüntülere dayanarak düşünülmektedir. Ancak her örnek için farklı oranlarda enkapsülasyon duvar malzemesi kullanılması yüzey özelliklerini, gözenek varlığını ve boyutunu etkilemiştir. Resim 4.1'e göre bakteri hücrelerinin matrislerde rastgele dağıldığı gözlemlenmiştir. SEM görüntülerinde Resim 4.1'de de görüldüğü gibi farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

Bu oluşan yapılar aljinat matrisindeki boşluk alanı ile çevrilidir. Allan-Wojtas ve diğerleri (2008) ve Hansen ve diğerleri (2002) mikrokapsül içinde bulunan bakteri yapılarını gözlemlemiş ve bakterilerin etrafındaki boşluk alanı ile bakterilerin varlığının aljinatın jelleşmesini bozduğunu ortaya koymuştur (Sousa ve diğerleri, 2015). Bir başka çalışmada elde edilen SEM görüntüleri, probiyotik bakterilerin kalsiyum aljinat küreciklerinin içinde hapsediğini ve bakterilerin yaklaşık 1 ila 2 µm uzunluğunda boyutlara sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, mevcut çalışma enkapsüle bakterilerin önceden yapılan çalışmaları ile tutarlıdır (Yeung ve diğerleri, 2016).

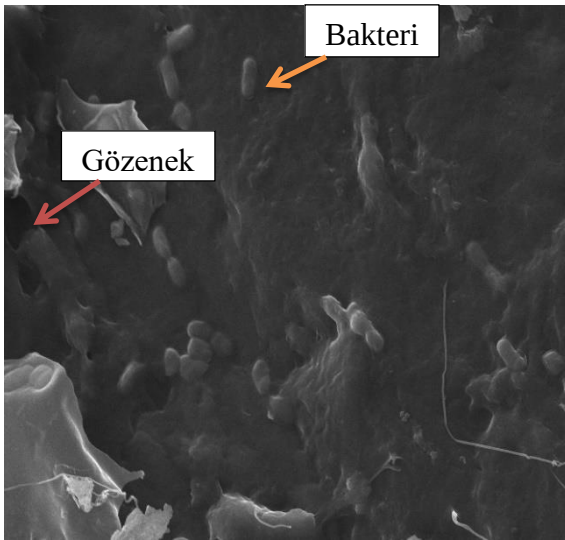
Su ve diğerleri, (2011) yapmış olduğu çalışmada aljinat mikropartiküllerinin, HLC mikropartiküllerinin ve ALg-şeklini ve yüzey morfolojisini göstermiş ve mikropartiküllerin genellikle küresel olup buruşuk yüzeyli olduğunu tespit etmiştir. HLC mikropartikülleri, yüksek HLC seviyesinden dolayı dondurarak kurutma işlemi sırasında kısmi çökme göstermiştir ve aljinat mikropartiküller ve Alg HLC mikropartiküllerin partikül yüzey çatlaklarının boyutunun küçüldüğünü ve HLC konsantrasyonlarının artmasıyla sayılarının azaldığını ortaya koymuştur.



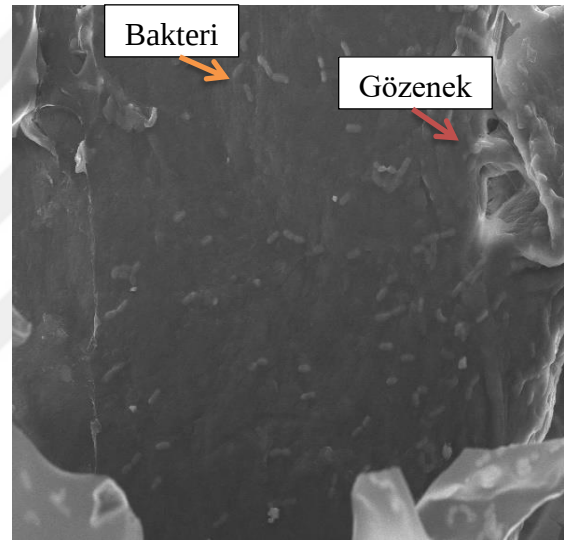
1



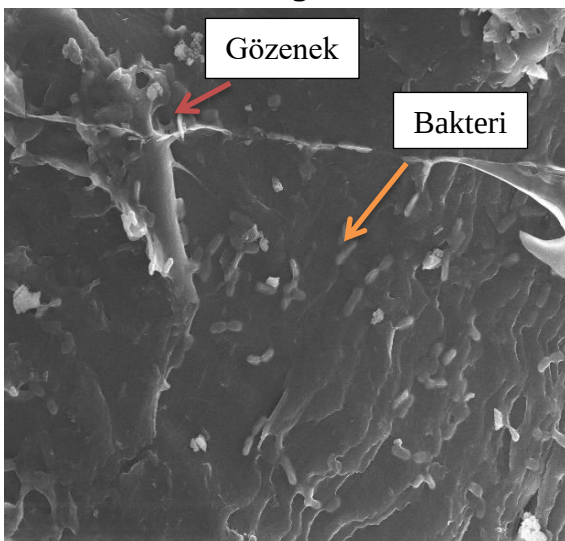
2



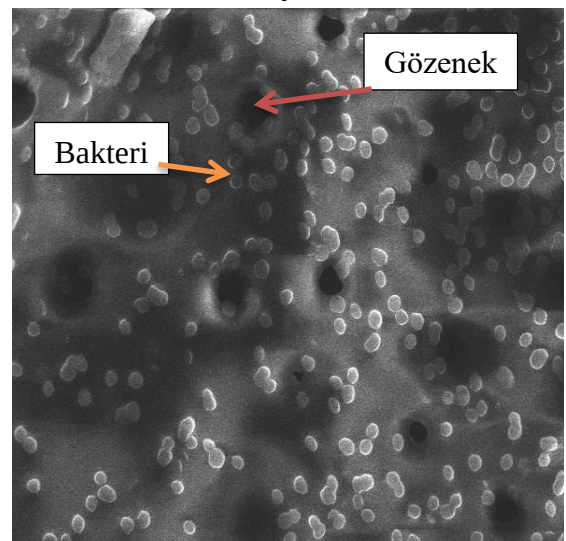
3



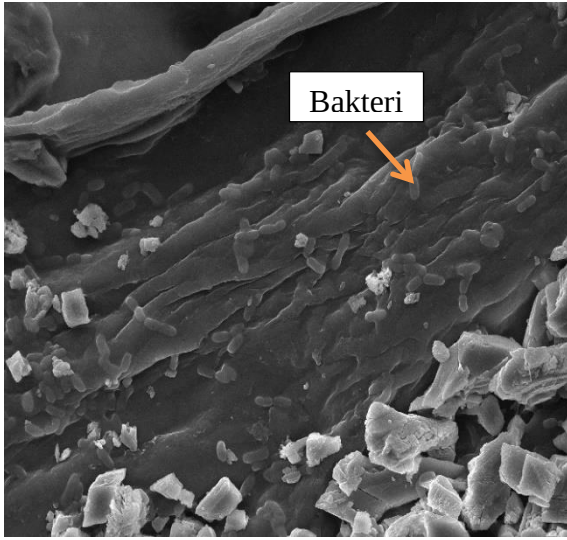
4



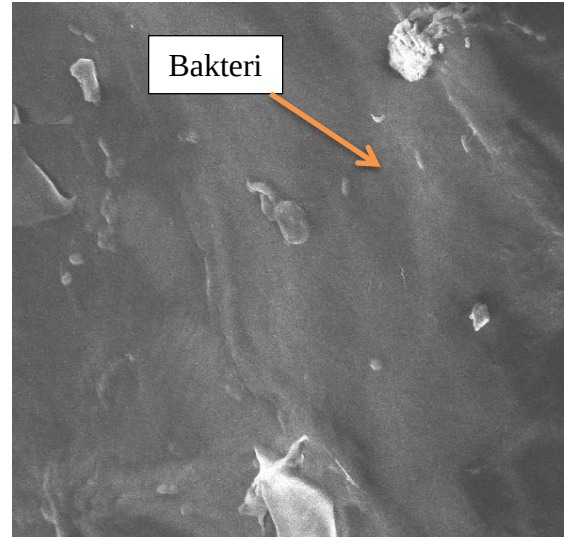
5



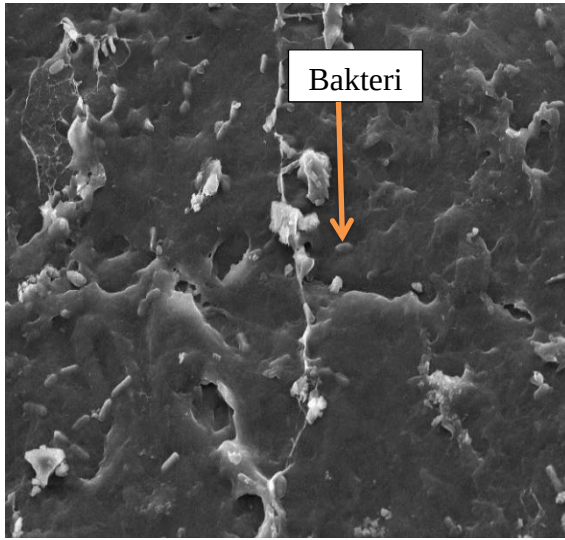
6



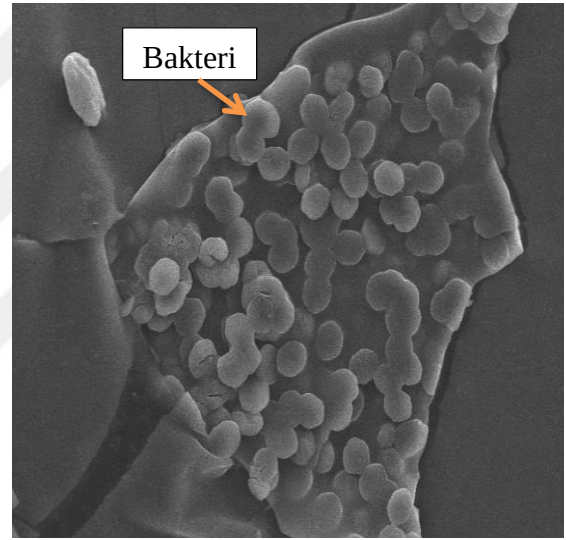
7



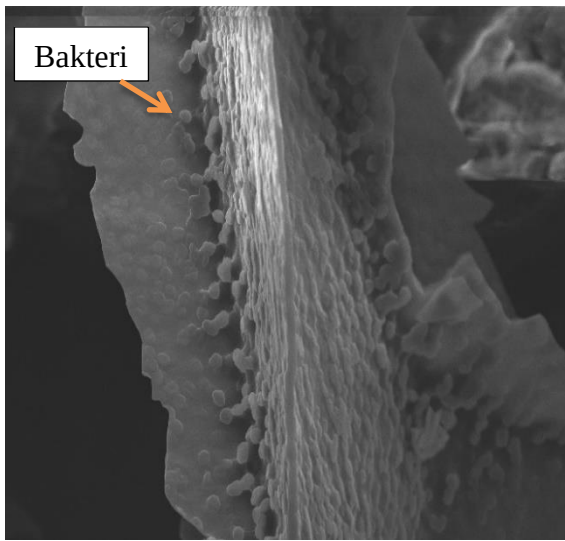
8



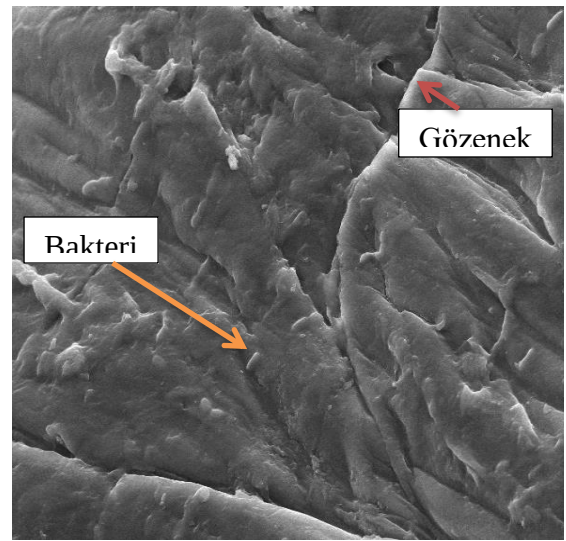
9



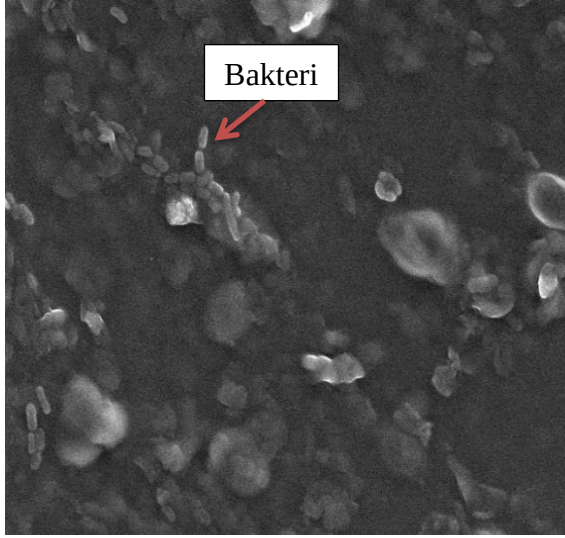
10



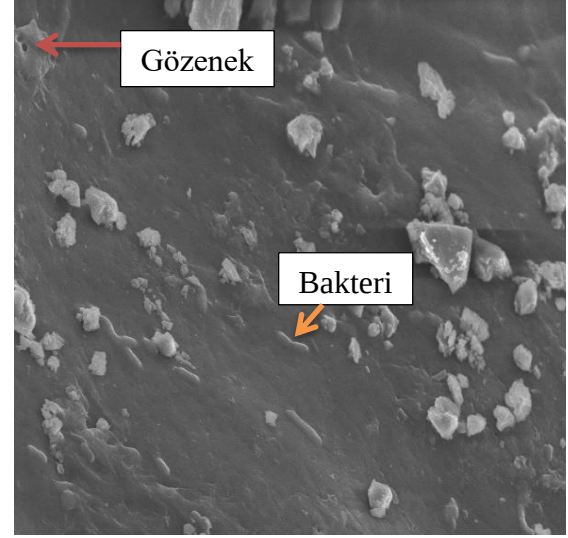
11



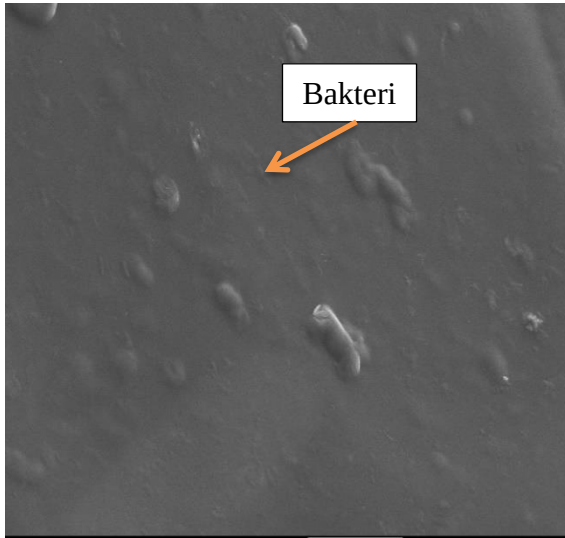
12



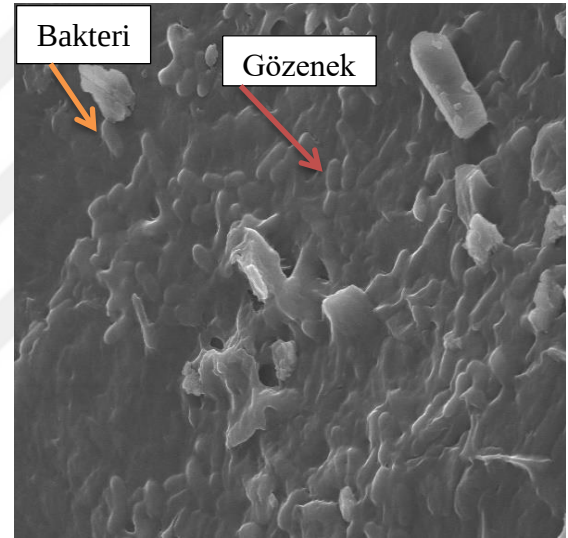
13



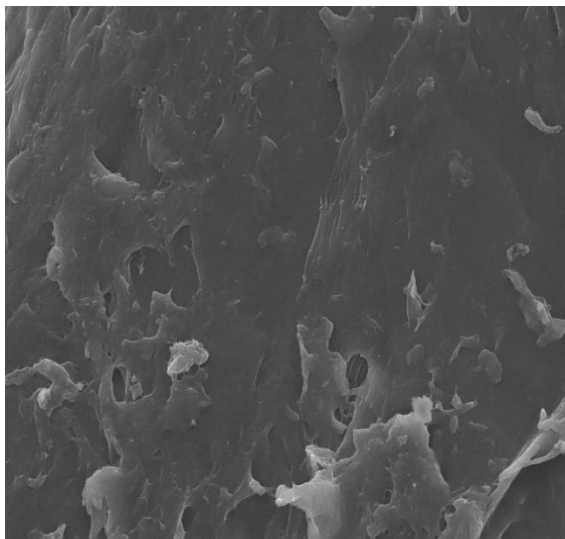
14



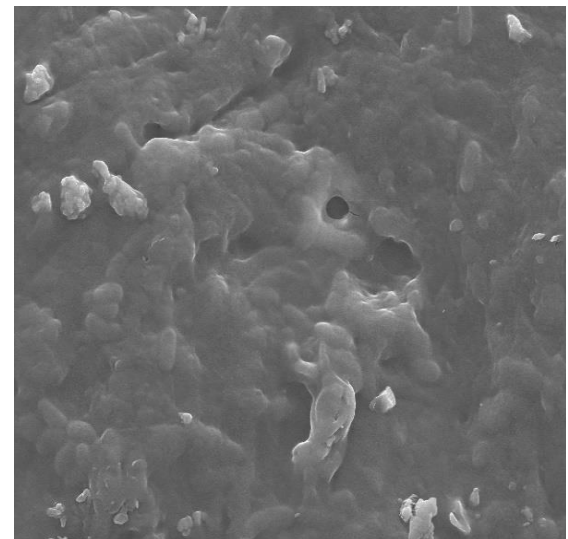
15



16



17



18

Resim 4.1. Enkapsüle bakterilerin SEM görüntüleri

4.3.7. Optimize formülasyonla üretilen enkapsüle bakteri örneklerinin analiz sonuçları

L. paracasei enkapsülasyon duvar malzemelerinin optimizasyonu Design Expert (Versiyon 11.0, StatEase, ABD) istatistiksel paket programı kullanılarak yapılmış ve formülasyona ilave edilmesi gereken sodyum aljinat, kitosan, inülin ve kalsiyum karbonat oranları enkapsülasyon etkinliği için maksimize edilerek diğer analizler için optimum değerlere göre hedef parametreler ışığında belirlenmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Genel optimum duvar malzemelerinin seviyesinin belirlemesi

Yanıtlar	Sodyum Aljinat (%)	İnülin (%)	Kitosan (%)	Kalsiyum Karbonat (%)
Enkapsülasyon Etkinliği	5	2,372	0,582	1,054
Mide Sıvısı Tolerans	3,532	3,689	1,269	1,159
Ph toleransı	2,007	2,416	0,903	0,549
Safra sıvısına tolerans	3,970	6,286	1,526	0,643
Isı toleransı	2,074	4,265	0,885	0,974

Doğrulama deneyi öncesi istatistik programı tarafından belirlenen optimum noktalara göre % 95 güven düzeyinde analiz sonucunun tahmini yapılmış ve optimum noktadaki beklenen değer aralıkları Çizelge 4.14’ de belirlenmiştir.

Çizelge 4.14.’de optimum noktası belirlenen örnekler enkapsülasyon prosedürüne uygun olarak tekrar üretilmiş ve aşağıdaki deneyler gerçekleştirilmiş olup tahmini değerler ile elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır.

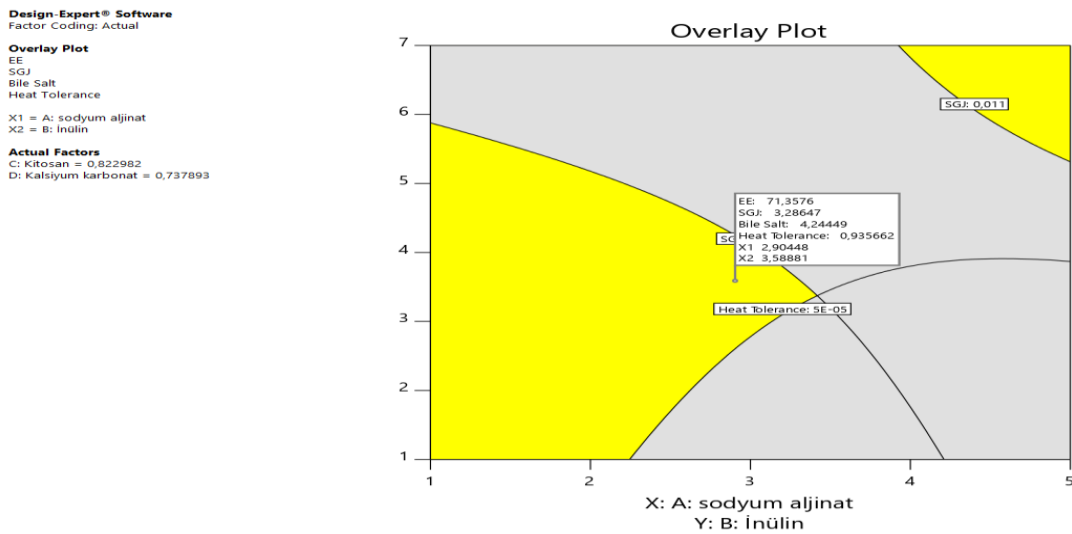
Çizelge 4.14. Doğrulama deneyinde tahmini değerler (%) tablosu

	Tahmini Değerler		Doğrulama Analiz Sonuçları
	Maksimum	Minimum	
Enkapsülasyon Etkinliği	64,3061	104,063	90±0,23
Mide Sıvısı Tolerans	-24,5164	14,1647	0,4±0,00
pH Toleransı	-9,71484	16,1139	4,5±0,25
Safra Sıvısına Tolerans	1,5520	6,3818	3,9±0,56
Isı Toleransı	-1,2215	5,1107	1±0,89

Optimizasyon sonucunda enkapsüle edilen *L. paracasei* için duvar malzemeleri %3,125 sodyum aljinat, %5,503 inülin, %1,001 kitosan, %1,457 kalsiyum karbonat ilaveli kapsüle edilmiş bakteri örneklerinin en uygun model olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre enkapsüle bakterilerin deneysel analizlerinin optimum sonuç noktaları Şekil 4.6’da verilmiştir.

Optimizasyon sonuçlarına göre enkapsüle edilerek üretilen ve 60 dk simüle ortam çözücülerine maruz bırakılan bakteri örneklerinde mide sıvısına maruziyet sonucunda canlılık düzeyi % 0,4 simüle safra çözeltisine maruziyet sonucu canlılık düzeyi % 3,9 pH 2 şartlarında maruziyet sonucu canlılık düzeyi % 4,5 ve 70°C’de 2dk maruziyet sonucunda canlılık düzeyi % 1 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.14). Değişkenlerin tahmin edilen değerleri ve genel optimum arzu edilebilirlik (1.00) sonuçları Şekil 7’de gösterilmektedir. Enkapsülasyon sonucunda bakteri örneklerinin simüle gastroentistinal ortam maruziyet analizleri doğrulama deneyi sonuçlarının deneysel modelleme sonuçlarına göre mide sıvısı toleransı ve safra sıvısı toleransı değerlerinde meydana gelen değişim istatistiksel olarak önemsiz ($p>0,05$) bulunmuş ve sonuçlar doğrulanmıştır.

Enkapsüle bakteri örneklerinin ısı toleransı ve pH toleransı değerlerinde beklenen ve doğrulanan analiz sonuçları arasındaki değişim ise istatistiksel açıdan önemlidir ve sonuçlar doğrulanmamıştır ($p>0,05$). Beklenen değerlerden doğrulama deneyi sonuçlarının deneysel modelleme sonuçlarına göre enkapsülasyon etkinliği (%) değerinin daha yüksek çıkması deneyleri doğrulamıştır (Çizelge 4.14).



Şekil 4.6 Enkapsüle bakterilerin deneysel analizlerinin optimum sonuç noktaları

4.4. Toz İçeceklerin Prebiyotik Bileşen Oranlarının Optimize Edilmesi

4.4.1. Toz içeceklerin pH ve su aktivitesi

Bu çalışma kapsamında prebiyotik bileşenler ile hazırlanan toz kakaolu içeceklerin alternatif formülasyonlarının ürünlerin kalitesini nasıl etkilediğine ilişkin model çalışmalarının değerlendirilmesi için su aktivitesi ve pH parametreleri saptanmıştır.

Çikolatalı toz içecekleri temel olarak süt, şeker, kakao tozu ve kıvamı iyileştirmek ve kakao parçacıklarının çökmesini önlemek için eklenen bazı hidrokolloid türleri ile formüle edilmektedir. Bu içeceklerin bileşen maddelerin özellikleri (yağ içeriği, kakao tozunun alkaliliği ve rengi, hidrokolloid tipi), formüle edilmiş ürünlerin nihai bileşimi, fiziksel ve duysal özellikleri üzerinde farklılıklar oluşturmaktadır (Eduardo ve diğerleri, 2018). Bu anlamda yeni bir ürün seçeneği olarak çikolatalı toz içeceklerin formülasyonlarının özelliklerinin değerlendirilmesi önemlidir.

Farklı konsatrasyonlarda inülin, polideksroz ve maltodekstrin kullanılarak hazırlanmış toz kakaolu içecek formülasyonlarının su aktivitesi ve pH özelliklerinin varyans analizleri ve çoklu karşılaştırma testi belirlenmiş olup sırasıyla Çizelge 4.15’de verilmiştir. Farklı oranlarda hazırlanan prebiyotik bileşenlerin toz içecek örneklerinin pH değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Çizelge 4.15.’de görüldüğü üzere toz içecek örneklerinin pH değerleri $7,21\pm0,08$ – $7,26\pm0,01$ arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Ek olarak, inülin, polidekstroz ve maltodekstrin partiküllerin pH değeri sırasıyla 7,23- 7,22 ve 7,21 olarak belirlenmiştir. Örneklerin pH değerleri dar bir aralıkta değişim göstermiş olup, bu değişim ihmal edilebilir niteliktedir. Bu değişim ile kullanılan bileşenler arasında bir ilişki oluşturulamamıştır. Arıbah ve arkadaşlarının (2020) yürüttüğü başka bir çalışmada ise iota-karagenan, kappa-karagenan ve ksantan zambak çeşitli konsantrasyonlarda (%0,1, %0,2 ve %0,3) formülasyonda kullanılmış ve numunelerin pH değerinin 7,61-7,72 arasında olduğu tespit edilmiş ve pH değerleri yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir. Yapılan başka çalışmalar incelendiğinde guar gum, sodyum aljinat, ksantam gum ve locust bean gum ilave edilerek hazırlanan instant çikolatalı içecek karışımlarının pH değeri $8,06\pm0,02$ ile $8,33\pm0,01$ arasında tespit edilmiştir (Doğan ve diğerleri, 2011). Mevcut çalışmadan farklı olarak gözlenen pH değerleri formülasyondaki değişiklikten dolayı önceki çalışmalardan farklılık göstermiştir. (Doğan ve diğerleri, 2011). Bu tür içeceklerin formülasyonlarının ülke

veya bölgelere göre birbirinden farklılık gösterdiği bilinmektedir. İçmeye hazır çikolata ürünlerinin geliştirilmesinde, süspansiyon stabilitesi teknolojik bir zorluktur. Daha önceki bazı çalışmalar, hidrokolloidler gibi stabilizatörlerin kullanımının çikolatalı içecek ürünlerinin süspansiyon stabilitesini iyileştirebileceğini göstermiştir (Aliakbarian ve diğerleri 2017, Aribah ve diğerleri 2020). Çeşitli tiplerde hidrokolloidlerin eklenmesi koyulaştırıcı madde olarak hareket edebilmesi yalnızca süspansiyon stabilitesi açısından değil, aynı zamanda ağız hissi perspektifinde de tüketici kabulü ve tercihlerini etkileyebilir. Hidrokolloidlerin dahil edilmesi, çikolatalı içeceklerin renk, toplam çözünür kuru madde ve pH parametreleri gibi fiziksel özelliklerini etkileyebilir (Ramírez-Sucre ve Vélez-Ruiz 2011; Doğan ve diğerleri 2013).

Çizelge 4.15. Toz içeceklerin pH ve su aktivitesi değerleri

No	İnülin X ₁ (gr)	Polidekstroz X ₂ (gr)	Malodeksrin X ₃ (gr)	pH	Su aktivitesi
1	0	23	0	7,26±0,01 ^a	0,312±0,009 ^{abc}
2	3,68	3,68	15,64	7,23±0,02 ^a	0,310±0,000 ^{abc}
3	23	0	0	7,25±0,02 ^a	0,303±0,007 ^{abc}
4	11,5	0	11,5	7,21±0,08 ^a	0,297±0,002 ^{abc}
5	23	0	0	7,22±0,02 ^a	0,303±0,002 ^{abc}
6	0	23	0	7,22±0,01 ^a	0,305±0,003 ^{abc}
7	0	0	23	7,23±0,04 ^a	0,320±0,000 ^a
8	7,66	7,66	7,66	7,23±0,00 ^a	0,317±0,012 ^{ab}
9	0	11,5	11,5	7,22±0,01 ^a	0,317±0,000 ^{ab}
10	3,68	15,64	3,68	7,24±0,02 ^a	0,299±0,002 ^{abc}
11	0	0	23	7,23±0,02 ^a	0,319±0,000 ^{ab}
12	11,5	11,5	0	7,25±0,14 ^a	0,293±0,003 ^c
13	15,64	3,68	3,68	7,24±0,02 ^a	0,305±0,004 ^{abc}

^{a,b,c}: Aynı sütundaki benzer harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak fark yoktur. (p>0,05)

Farklı prebiyotik kombinasyonları içeren toz çikolatalı içeceklerin su aktivitesi değerleri 0,293±0,002 ile 0,317±0,012 arasında değişmiştir (Çizelge 4.15.).

Su aktivitesi; prebiyotik tipi, miktarı ve bunların kombinasyonundan etkilenmektedir. Stabilizatörlerin veya emülgatörlerin moleküler yapısı, su emme kapasiteleri, birbirleriyle ve içecekteki diğer bileşenlerle etkileşimleri, fizikokimyasal özellikler üzerinde farklı yönde etkileyebilmektedir. Gama ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada; fıstık ezmesi, kuru yağsız süt tozu, şeker, tuz, propilen glikol aljinat, ksantan zıncı ve lesitin bileşenleri ile fıstık bazlı

içeceklerin su aktivitesi değerlerini belirlemiş ve 0,99 olarak bulmuşlardır. Su aktivitesi değerlerinin mevcut çalışmadaki sonuçlarla rtuşmediği görülmektedir. Çünkü, bahsedilen çalışmada kullanılan bileşenler sıvı formada olup bizim yaptığımız çalışmada ise toz formda ürünler karışıma dahil edilmiştir.

Ostrowska-Ligeza ve Lenart (2015) yaptıkları çalışmada; kristal şeker, şeker tozu, süt tozu, maltodkestrin ve kakao tozu ile hazırladıkları kakaolu içecek karışımında su aktivitesi değeri 0,30 ile 0,34 arasında tespit edilmiştir. Su aktivitesi, nem içeriğinden farklıdır çünkü biyokimyasal reaksiyonlardan sorumlu olan gıda sistemindeki serbest suyun mevcudiyetini ölçmektedir. Genel olarak, su aktivitesi 0,6'nın altında olan gıdaların mikrobiyolojik olarak stabil olduğu kabul edilir (Quek ve diğerleri, 2007).

Çizelge 4.15.'deki su aktivitesi değerleri bu değer aralığından çok daha düşüktür ve böylece toz ürünlerin mikrobiyolojik stabilitesi güvenilirliği açısından doğrulanmıştır ve probiyotik olması planlanan bileşim için tercih edilebilir özellik sağlayabilmektedir.

İnülin, polidekstroz ve maltodekstrinin kullanım oranlarına bağlı olarak su aktivitesi, pH özelliklerinin değişimi için en uygun modeller lineer, kuadratik, kübik ve kübik olarak belirlenmiştir. Bu modellere ait R^2 değeri 0,8108 olarak belirlenmiştir. R^2 değerinden de anlaşıldığı gibi inülin, polidekstroz ve maltodekstrin ilaveli içeceklerin su aktivitesi değerleri üzerindeki etkileri model ile başarılı bir şekilde açıklanabilmektedir (izelge 4.16.).

Ancak pH değerleri için bu mümkün olmamıştır. Kullanılan bu bileşenlerin ilgili parametre üzerine etkisini ifade eden model ($p < 0.05$) nemli iken uyumsuzluk (lack of fit) nemli bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Çizelge 4.16. Toz içeceklerin su aktivitesi değerleri için varyans analiz sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-de- ğeri	P-değeri Prob > F
Model	0,0008	6	0,0001	4,29	0,0500*
Doğrusal karışım	0,0005	2	0,0002	7,68	0,0222*
X₁ * X₂	0,0002	1	0,0002	5,10	0,0646
X₁ * X₃	0,0002	1	0,0002	5,24	0,0620
X₂ * X₃	1,049E- 07	1	1,049E-07	0,003 6	0,9544
X₁ * X₂* X₃	0,0001	1	0,0001	4,90	0,0689
Uyum Eksikliği	0,0002	3	0,0001	7,19	0,0697
Hata	0,0000	3	7,208E-06		
Genel	0,0009	12			
Standart Hata	0,0054				
Ortalama	0,3078				
C.V	1,77				
R²	0,8108				
Adj-R²	0,6216				
Tahmini R²	-1,4233				
Adeq Precision	6,7320				

Varyans analiz sonuçlarında görüldüğü üzere inülin, polidekstroz ve maltodekstrin pozitif yönde doğrusal etkisi önemli ($p < 0,05$) bulunmuş ve etkinin artmasıyla birlikte su aktivitesini artırıcı etkisi bulunduğu saptanmıştır. Çalışma kapsamındaki örneklerde aw değeri üzerinde etkili olduğu belirlenen önemli parametrenin prebiyotik bileşen düzeyi olduğu ortaya konmuş olup, farklı prebiyotik maddeleri aynı oranda içeren örneklerin aw değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Yine toz içecek örnekleri arasında, özellikle %23 inülin içeren örneğin su aktivitesi değerinin ($0,303 \pm 0,002$), %23 polidekstroz ve %23 maltodekstrin içeren örneklerinin sırasıyla aw değerleri $0,312 \pm 0,009$ ve $0,319 \pm 0,000$ açısından istatistiksel olarak önemli olmayan bir fark belirlenmiştir.

Su aktivitesi değerleri incelendiğinde inülin-maltodekstrin harmanları için tahmin edilen denge nem içeriği değerlerinin çok benzer olduğunu göstermektedir (Stępień ve diğerleri 2020). Sonuç olarak, prebiyotik bileşenlerin toz çikolata karışımında kullanımı sonucunda su aktivitesi değeri kabul edilebilir düzeyde olan toz içecek karışımları elde edilebileceği belirtilebilir.

Su aktivitesinin fiziksel yönleri de özellikle higroskopik yapıları, topaklanma ve yapışma eğilimleri ile bilinen şeker içeren gıdalarda büyük ilgi görmüştür (Domian ve Poszytek, 2004). Birçok gıda tozu oldukça ince olduğundan, katı yoğunlukları nispeten düşüktür ve yığın özellikleri, yüzey nemindeki nispeten küçük değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Bu gibi durumlarda (örneğin kristalli tozlar) su aktivitesinin nem içeriğinden daha hassas bir gösterge olduğu görülmektedir (Ostrowska-Ligeza ve Lenart, 2000). Toz halindeki susuz amorf gıda maddeleri, kendiliğinden topaklanma ve kalitenin düşmesine neden olan kekleşme eğilimi nedeniyle, depolanması sorunlu olabilir. Bu kötüleştirici değişiklikler, plastikleşmeye ve hatta çözünmeye neden olabilen partikül yüzeyinin ıslanmasının bir sonucudur (Mathlouthi ve Rogé, 2003). Gıda tozlarının higroskopikliğini azaltmak için uygulanabilecek çözümlerden biri, yüksek moleküler ağırlıklı biyopolimerlerin eklenmesidir. Bitki materyalinin kurutulması için en yaygın olarak kullanılan taşıyıcı maddeler maltodekstrin, arap zıncı, pektinler ve karboksi-metil-selüloz (Bhandari, Dumolin ve Lebert, 2007). Bu alandaki son araştırmalar, inülin gibi ek teknolojik ve besinsel özelliklere sahip yeni taşıyıcı ajanın uygulanmasına odaklanmaktadır (Botrel, Rodrigues, Souza ve Fernandes, 2016).

Toz içeceklerin inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranlarının önemli olduğunun belirlendiği karışım dizaynıyla elde edilen model ile tahmin etmek için su aktivitesi değerleri ile ilişkileri belirlemek için kurulan denklem aşağıdaki gibi bulunmuştur.

$$\text{Su aktivitesi} = 0,3038X_1 + 0,3075X_2 + 0,3191X_3 - 0,539X_1X_2 - 0,0546X_1X_3 + 0,0014X_2X_3 + 0,3845X_1 X_2X_3$$

Eşitliklerde yer alan inülin (X_1), polidekstroz (X_2) ve maltodekstrini (X_3) ifade etmektedir. X_1 , X_2 ve X_3 'ün toplamı 1.0'a eşittir.

Şekil 4.7'de toz çikolata içecek örneklerinin su aktivitesi değerleri üzerine bağımsız değişkenler olan inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranlarının etkisi gösterilmiştir. Grafik yorumlanmasında kırmızı renge yaklaştıkça su aktivitesinin arttığını mavi renge yaklaştığında su aktivitesinin düştüğünü ifade etmektedir.

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1

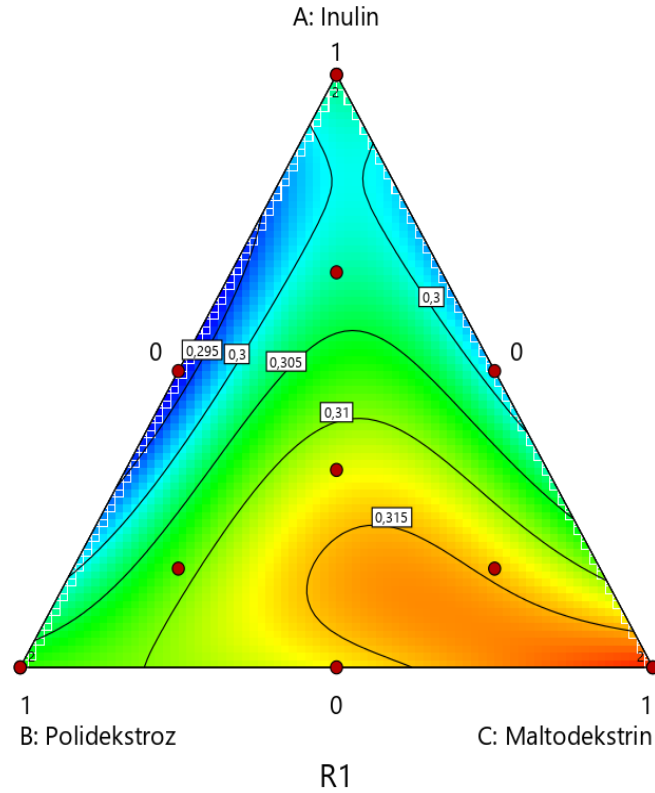
● Design Points

0,293 0,32

X1 = A: İnulin

X2 = B: Polidekstroz

X3 = C: Maltodekstrin



Şekil 4.7. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin su aktivitesi değerleri üzerindeki etkisi

4.4.2 Toz İçeceklerin örneklerinin briks, çözünürlük ve su tutma kapasitesi

Suda çözünür kuru madde, duyuşal özellikleri ve en önemliside tat algısını etkilediği için kakaolu içecek yapımında kakao tozunun kalitesini belirleyen önemli bir parametredir (Benković ve diğerleri, 2013). Çözünür katı madde içeriğinin belirlenmesi içeceklerin anında çözünür özelliklerini değerlendirmek için önemli bir faktördür. Bu nedenle, prebiyotik özellik gösteren bileşenler ile hazırlanan toz içecek örneklerinin çözünür katı madde (Brix), çözünürlük ve su tutma kapasitesi özelliklerine ait bulgular Çizelge 4.17’de gösterilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda prebiyotikler ile hazırlanan toz kakaolu içecek örneklerinin brix değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Çizelge 4.17.’de görüldüğü üzere örneklerin çözünür kuru madde değerleri $22,2\pm0,0$ ile $26,00\pm0,00$ arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Ek olarak Çizelge 4.17’de farklı oranlarda kullanılan

prebiyotik hidrokolloidlerin su tutma kapasitesi, suda çözünürlük değerleri gösterilmiş ve sırasıyla $3,28 \pm 0,37$ – $5,37 \pm 0,70$ ile $77 \pm 1,41$ – $96,5 \pm 4,94$ aralığında tespit edilmiştir.

Çizelge 4.17. Toz içeceklerin çözünür kuru madde, çözünürlük, su tutma kapasitesi değerleri

No	İnülin X ₁ (gr)	Polidekstroz X ₂ (gr)	Malodeksrin X ₃ (gr)	Brix	Çözünürlük (%)	Su tutma ka- pasitesi (g/g)
1	0	23	0	$26 \pm 0,00^a$	$90 \pm 2,12^{ab}$	$3,91 \pm 0,66^f$
2	3,68	3,68	15,64	$26 \pm 0,00^a$	$91 \pm 5,65^{ab}$	$4,37 \pm 0,70^{cd}$
3	23	0	0	$24 \pm 0,0^a$	$77 \pm 1,41^b$	$3,86 \pm 0,26^f$
4	11,5	0	11,5	$25 \pm 0,00^a$	$88 \pm 8,48^{ab}$	$4,56 \pm 0,15^c$
5	23	0	0	$24,5 \pm 0,0^a$	$82 \pm 5,65^{ab}$	$3,62 \pm 0,15^g$
6	0	23	0	$26 \pm 0,00^a$	$92 \pm 7,77^{ab}$	$3,95 \pm 0,18^f$
7	0	0	23	$25 \pm 0,00^a$	$96,5 \pm 4,94^a$	$4,10 \pm 0,58^{ef}$
8	7,66	7,66	7,66	$22,2 \pm 0,0^a$	$89 \pm 5,65^{ab}$	$4,54 \pm 0,12^{cd}$
9	0	11,5	11,5	$24,5 \pm 0,0^a$	$94 \pm 5,65^a$	$3,28 \pm 0,37^h$
10	3,68	15,64	3,68	$22 \pm 0,009^a$	$83,5 \pm 3,53^{ab}$	$5,3 \pm 0,14^a$
11	0	0	23	$25,5 \pm 0,0^a$	$94 \pm 8,48^a$	$4,32 \pm 0,03^{de}$
12	11,5	11,5	0	$23 \pm 0,00^a$	$85 \pm 8,48^{ab}$	$4,80 \pm 0,27^b$
13	15,64	3,68	3,68	$24,5 \pm 0,0^a$	$88 \pm 12,72^{ab}$	$3,95 \pm 0,50^f$

^{a,b,c}: Aynı sütundaki benzer harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak fark yoktur. ($p > 0,05$)

İnülin, polidekstroz ve maltodekstrinin kullanım oranlarına bağlı olarak çözünür kuru madde, suda çözünürlük ve su tutma kapasitesi özelliklerinin değişimi için en uygun modeller sırasıyla lineer, kuadratik ve kübik olarak belirlenmiştir. Bu modellere ait R^2 değerleri sırasıyla brix değerleri için 0,9409, çözünürlük için 0,80 ve son olarak su tutma kapasitesi için 0,9640 belirlenmiştir. R^2 değerinden de anlaşıldığı gibi inülin, polidekstroz ve maltodekstrin ilaveli içeceklerin brix, çözünürlük ve su tutma kapasitesi değerleri üzerindeki etkileri model ile başarılı bir şekilde açıklanabilmektedir (Çizelge 4.18.).

Çizelge 4.18. Toz içeceklerin çözünür kuru madde, çözünürlük ve su tutma kapasitesi değerleri için varyans analiz sonuçları

Kaynak	Brix		Çözünürlük		Su Tutma Kapasitesi	
	F	DF	F	DF	F	DF
Model	7,96*	8	20,62*	2	13,40*	8
Doğrusal karışım	3,75	2	20,62*	2	0,7138	2
X ₁ * X ₂	9,96*	1			26,19*	1
X ₁ * X ₃	0,3157	1			9,97*	1
X ₂ * X ₃	2,53	1			15,47*	1
X ₁ ² * X ₂ * X ₃	0,7413	1			20,71*	1
X ₂ ² * X ₁ * X ₃	21,18*	1			36,25*	1
X ₃ ² * X ₂ * X ₁	4,45	1			0,0401	1
Kalıntı		4		10		4
Uyum Eksikliği	12,81	1	1,27	7	3,77	1
Hata		3		3		3
Genel		12		12		12
Standart Hata	0,5738		2,64		0,1742	
Ortalama	24,48		88,46		4,20	
C.V	2,34		2,99		4,15	
R ²	0,9409		0,8048		0,9640	
Adj-R2	0,8227		0,7658		0,8921	
Tahmini R2	-7,2470		0,6757		-2,4935	
Adeq Precision	9,3661		11,8176		12,9268	
Brix = 24X ₁ + 26,04X ₂ + 25,29X ₃ - 8,06X ₁ X ₂ + 1,44X ₁ X ₃ - 4,06X ₂ X ₃ + 49,64X ₁ ² X ₂ X ₃ - 265,36X ₁ X ₂ ² X ₃ +121,64 X ₁ X ₂ X ₃ ²						
Çözünürlük =80,29X ₁ +89,79X ₂ +95,29X ₃						
Su tutma kapasitesi=3,75X ₁ + 3,94X ₂ + 4,22X ₃ + 3,97X ₁ X ₂ + 2,45X ₁ X ₃ - 3,05X ₂ X ₃ - 79,65X ₁ ² X ₂ X ₃ + 105,39X ₁ X ₂ ² X ₃ +3,51X ₁ X ₂ X ₃ ²						

* P değerinin 0,05'den küçük model terimlerinin önemli olduğunu gösterir.

Toz gıdalar bileşiminde kullanılan maddelerin yararlı ve işlevsel özelliklerini sergileyebilmesi için iyi çözünürlük sağlayabilmelidir (Morr ve diğerleri, 1985). Çözünürlük, tozun çözünmesinin son aşamasıdır ve genel sulandırma kalitesinin temel belirleyicisi olarak kabul edilir. Bu değerlendirmelere göre toz içecek formülasyonunda 23 gr maltodekstrin ilavesi ile hazırlanan örneklerde en yüksek çözünürlük değerleri elde edilmiş ve %94 ile %96,5 değerleri arasında belirlenmiştir. Benzer sonuçlar 23 gr polidekstroz ilavesinin çözünürlük değerlerinde (%92) de elde edilmiş olup maltodekstrin çözünürlüğünden istatistiksel olarak farklı değildir (p>0,05). Ancak toz içecek örneklerinde inülin kullanımının çözünürlük üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve örneklerde %77 ile %82 arasında çözünürlük elde edilmiş olup maltodekstrin ve polidekstroz çözünürlüğünden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05). Bu bileşenin kullanımı ile birlikte örneklerin çözünürlüğünde azalmaya neden olmuştur.

İnülin bileşenin farklı molekül ağırlıkları, polimerin zincir uzunluğu sudaki çözünürlüğünü etkilemekte olup yakından ilişkilidir ve bu nedenle daha kısa oligomerler, uzun zincirli polimerlerden çok daha fazla çözünürdür. İnülinin polimerizasyon derecesi ile birlikte moleküler konformasyondaki varyasyonu da çözünürlüğü etkiler ve inülinin kısa zincirli oligomerleri sulu çözeltide %80 konsantrasyona kadar çözünebilmektedir. Daha uzun zincirli inülin polimerleri çok daha az çözünürdür ve kristal formlarda çökelmektedir (Barclay ve diğerleri, 2016).

Birçok çalışmada, maltodekstrin, uygun maliyetli, yüksek oranda çözünür ve zayıf higroskopik olma avantajı ile yaygın olarak bir kurutma ajanı olarak kullanılır. Ayrıca maltodekstrin, suda düşük viskozite ve yüksek çözünürlüğe sahip olması, kabarma ve film oluşturma özellikleri, duvar matrisinin oksijen geçirgenliğini azaltmada rol oynaması, tat ve koku olmaması gibi avantajlara, aroma ve yağı bağlama gibi işlevlere sahiptir.

Yirmi yılı aşkın bir süredir dünya çapında birçok gıda ürününde hacim kazandırıcı ve tekstüre edici ajan ve çözünür lif bileşeni polidekstroz kullanılmaktadır. Polidekstroz, nötr bir tada sahiptir ve suda yüksek oranda çözünür olduğu ve viskoz olmayan bir çözelti sağladığı için unlu mamuller, şekerlemeler, süt ürünleri ve fonksiyonel içecekler gibi çok çeşitli gıdalarda düşük kalorili bir hacim artırıcı olarak kullanılabilir. Günlük 4-12 g polidekstroz alımının, olumsuz etkiler olmaksızın fizyolojik fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir. (Do-Carmo ve diğerleri, 2016). Polidekstroz %90 çözünür liflerden oluşmaktadır Veena ve diğerleri, 2016) ve benzer sonuçlar mevcut çalışma ile doğrulanmıştır.

Diyet liflerin teknolojik özellikleri arasında yer alan su tutma kapasitesi lifin matrisinde suyun tutulması ölçümüne dayanmaktadır. Su tutma kapasitesi diyet lifinin hidrasyon fonksiyonunu doğrudan etkiler. Çözünür diyet liflerin teknolojik işlevselliği ve beslenme etkileri, hidrasyon özellikleri ile belirlenmektedir (Chen ve diğerleri, 2018).

Çizelge 4.17. 'den elde edilen sonuçlar, üç çeşit prebiyotiğin kullanımı ile hazırlanan toz kakaolu içeceklerin su tutma kapasitesi değerlerini göstermektedir. En yüksek su tutma kapasitesi sırasıyla 3,68: 15,64: 3,36 gr inülin, polidekstroz ve maltodekstrin kullanılarak hazırlanan toz içecek formülasyonunda (10. deneme noktası) $5,3 \pm 0,14$ (g/g) bulunurken en düşük ise sırasıyla 0: 11,5: 11,5 oranında inülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan formülasyonda (9. deneme noktası) $3,28 \pm 0,37$ (g/g) olarak gözlemlenmiştir. Farklı oranlarda

üç çeşit prebiyotiğin kullanımı su tutma kapasitesi karakteristiğinin geliştirilmesini sağlamıştır. Su bağlama karakteristiğinin geliştirilmesi, bir polidekstroz konsantrasyonuna bağlıydı. Bu bulgu, su bağlama potansiyeli nedeniyle polidekstrozun stabilizatör ve vücut oluşturuca ajan olarak kullanılabileceğini yansıtmaktadır (Amid ve diğerleri, 2013; Huang ve diğerleri, 2020). Benzer sonuçlar Srisuvor ve diğerleri (2013) tarafından da rapor edilmiştir. İnülin veya polidekstroz ilavesinin, sulandırılmış süten üretilen az yağlı yoğurdun su tutma yüzdesini arttırdığı çalışma sonucundaki bulgularla desteklenmiştir.

Maltodekstrin kullanılarak hazırlanan toz içecek örneklerinde su tutma kapasitesi 4,10 ile 4,32 arasında tespit edilmiş olup inülin (su tutma kapasitesi 3,86-3,32 (g/g)) ve polidekstroz (su tutma kapasitesi 3,91-3,95 (g/g)) kullanılarak hazırlanan örneklerden yüksek olup istatistiksel olarak önemlidir.

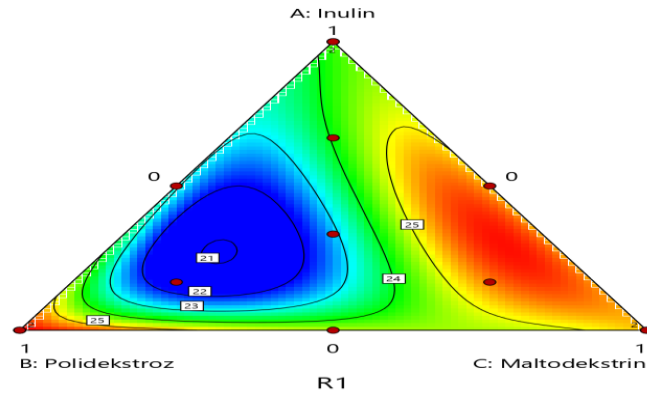
Zhao ve diğerleri (2020) soya fasulyesi protein izolatı ve maltodekstrin ile konjuge edildiği çalışmasında maltodekstrin ilavesi ile protein ağının daha fazla çapraz bağlantısını destekleyen hidrofobik etkileşimler yoluyla soya fasulyesi proteini kümelerinin oluşumuna neden olabileceği ve su bağlama kapasitesinde artışa yol açmaktadır.

Şekil 4.8., Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da sırasıyla toz içecek örneklerinin çözünen katı madde, çözünürlük ve su tutma kapasitesi özellikleri üzerine bağımsız değişkenler olan inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranlarının etkisi gösterilmiştir.

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
22 26

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin

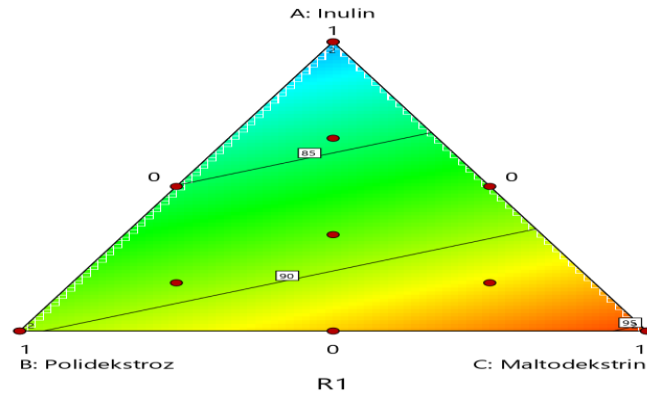


Şekil 4.8. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin briks değerleri üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
77 96,5

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin

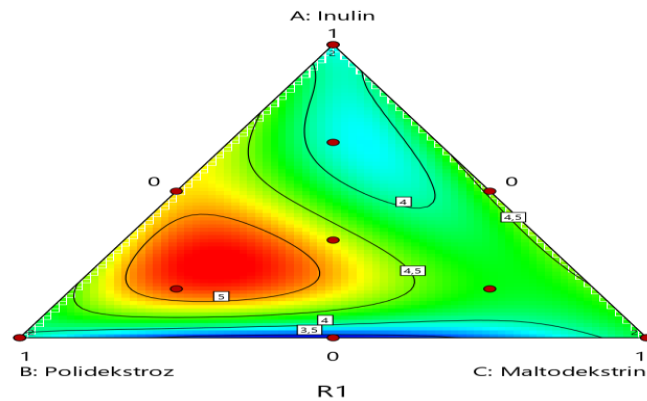


Şekil 4.9. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin çözünürlük üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
3,28 5,3

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin



Şekil 4.10. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin su tutma kapasitesi üzerindeki etkisi

4.4.3. Toz İçeceklerin örneklerinin ıslanma süresi

Hazır toz gıdaların dağıtılması veya çözülmesi sürecinin tamamı dört aşamaya ayrılmıştır (Schubert, 1987). İlk olarak, parçacıklar sıvı yüzeyinin altına batmadan önce sıvı, gözenek sistemine (ıslanma olarak da bilinir) nüfuz eder. Daha sonra parçacıklar düşük enerjili karıştırma ile dağılır. Son olarak, parçacıklar sıvı içinde çözünür olmaları koşuluyla çözeltiye geçerler, aksi takdirde askıda kalırlar. Toz halindeki gıdanın sıvıdan önce dökülmesi de mümkündür. İkinci sıra takip edildiğinde, ıslatma işleminin rolü böylece önemsiz hale gelir. Gıda tozunun yeniden yapılandırılmasında izlenen sıra, aynı zamanda, ürünün doğasına ve arzu edilen nihai kullanımına da bağlıdır. Bu süreçlerin her birinin gerçekleşme kolaylığı, hazır gıdaların nihai kullanım kalitesiyle doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, ıslanabilirlik, dağılılabilirlik ve çözünürlük gibi ürün özellikleri, hazır toz gıdaları karakterize etmek için sıklıkla kullanılmıştır. Toz haline getirilmiş gıda katkılarının anlık özelliklerini geliştirmek için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmıştır. Aglomerasyon, kurutulmuş gıda tozlarının rehidrasyon özelliklerini geliştirmek için en etkili yöntemdir (Barletta ve Barbosa-Carnovas, 1993). Daha hızlı kapiler etki nedeniyle partikül boyutu dağılımını, yığın yoğunluğunu ve ayrıca ıslanmayı (veya sıvının gözenekli sisteme girmesini) artırır. Mekanik stabilite sağlar ve çözünürlüğü iyileştirir.

Bu nedenle, prebiyotik özellik gösteren bileşenler ile hazırlanan toz içecek örneklerinin ıslanma süresi özellikleri değerlendirilmiş ve bu özelliğe ait bulgular Çizelge 4.19.'da gösterilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda prebiyotikler ile hazırlanan toz kakaolu içecek örneklerinin ıslanma süreleri istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). Çizelge 4.19.'da görüldüğü üzere örneklerin ıslanma süreleri $3,70 \pm 0,23$ ile $16,59 \pm 0,89$ arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. Toz içeceklerin ıslatma süresi değerleri

No	İnülin X ₁ (gr)	Polidekstroz X ₂ (gr)	Maltodeksrin X ₃ (gr)	Islanma Süresi
1	0	23	0	4,93±0,58 ^c
2	3,68	3,68	15,64	10,71±1,24 ^b
3	23	0	0	5,38±0,54 ^c
4	11,5	0	11,5	16,59±0,89 ^a
5	23	0	0	4,40±0,06 ^c
6	0	23	0	4,38±1,12 ^c
7	0	0	23	10,01±1,6 ^b
8	7,66	7,66	7,66	6,21±1,83 ^c
9	0	11,5	11,5	5,52±1,4 ^c
10	3,68	15,64	3,68	3,70±0,23 ^c
11	0	0	23	8,64±0,74 ^b
12	11,5	11,5	0	4,76±1,78 ^c
13	15,64	3,68	3,68	4,06±0,19 ^c

^{a,b,c}: Aynı sütundaki benzer harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak fark yoktur. (p>0,05)

İnülin, polidekstroz ve maltodekstrinin kullanım oranlarına bağlı olarak ıslanma süresi özelliklerinin değişimi için en uygun modeller sırasıyla lineer, kuadratik ve kübik olarak belirlenmiştir. Bu modellere ait R² değerleri sırasıyla ıslanma süresi değerleri için 0,9811 olarak belirlenmiştir. R² değerinden de anlaşıldığı gibi inülin, polidekstroz ve maltodekstrin ilaveli içeceklerin ıslanma süresi değerleri üzerindeki etkileri model ile başarılı bir şekilde açıklanabilmektedir (Çizelge 4.20.).

Çizelge 4.20. Toz içeceklerin ıslanma süresi değerleri için varyans analiz sonuçları

Kaynak	Islanma Süresi	
	F	DF
Model	25,99*	8
Doğrusal karışım	46,89*	2
X ₁ * X ₂	0,0217	1
X ₁ * X ₃	90,59*	1
X ₂ * X ₃	2,66	1
X ₁ ² * X ₂ * X ₃	21,71*	1
X ₂ ² * X ₁ * X ₃	25,97	1
X ₃ ² * X ₂ * X ₁	1,77	1
Kalıntı		4
Uyum Eksikliği	2,95	1
Hata		3
Genel		12
Standart Hata	0,8827	
Ortalama	6,87	
C.V	1,85	
R ²	0,9811	
Adj-R2	0,9434	
Tahmini R2	-0,6394	
Adeq Precision	16,5992	

* P değerinin 0,05'den küçük model terimlerinin önemli olduğunu gösterir.

Çizelge 4.19.'dan elde edilen sonuçlar, üç çeşit prebiyotiğin kullanımı ile hazırlanan toz ka-
kaolu içeceklerin ıslatma değerlerini göstermektedir. En yüksek ıslanma süresi, sırasıyla
11,5: 0: 11,5gr inülin, polidekstroz ve maltodekstrin kullanılarak hazırlanan toz içecek for-
mülasyonunda (4. deneme noktası) 16,59±0,89 (g/g) bulunurken en düşük ise sırasıyla 3,68:
15,64: 3,68gr inülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan formülasyonda (10. de-
neme noktası) 3,70±0,23 (g/g) olarak gözlemlenmiştir.

Doğan ve diğerleri (2016) tarafından kullanılan yöntemle göre hazırlanmış instant toz çiko-
lata içecek formülasyonunda şeker, süt tozu, peynir altı suyu tozu, kakao, patates nişastası,
modifiye mısır nişastası, çikolata tozu, çikolata aroması, tuz ve sakız (ksantan, keçiyoynuzu
zamkı) bileşenleri karıştırılmış ve ıslatma sürelerinin değerlendirildiği çalışmada örneklerin
ıslanma süreleri ıslanma süresi minimum 18 ile maksimum 170 s arasında tespit edilmiştir.
Örneklerin ıslanma sürelerinin yüksek olmasının nedeninin bileşenlerin (kakao ve süt tozu)
yağ oranının fazlalığına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Bunlara kıyasla yaptığımız çalışmada;
ıslanma süreleri minimum 3 ile maksimum 16 s arasında belirlenmiş olup yağ oranı değişken
olmadığı için ıslanma süreleri düşük olarak tespit edilmiştir.

Alkalize kakao tozunun doğal olandan daha uzun bir ıslanma süresine sahip olduğunu gösteren bu çalışmada, elde edilen ıslanma süresi verileri (Çizelge 4.20.) bu sonucu doğrulamaktadır. Islanabilirlik arttıkça partiküller içerde daha uzun süre askıda kalabilir.

Muhammad ve diğerleri (2020), doğal ve alkalize kakao tozunun ıslanma süresi sırasıyla 82 ± 12 ve 347 ± 34 s düzeyinde ölçülmüştür. Bu sonucun uygulanan kakao tozunun alkalizasyon parametrelerinden kaynaklandığı belirtilmiştir.

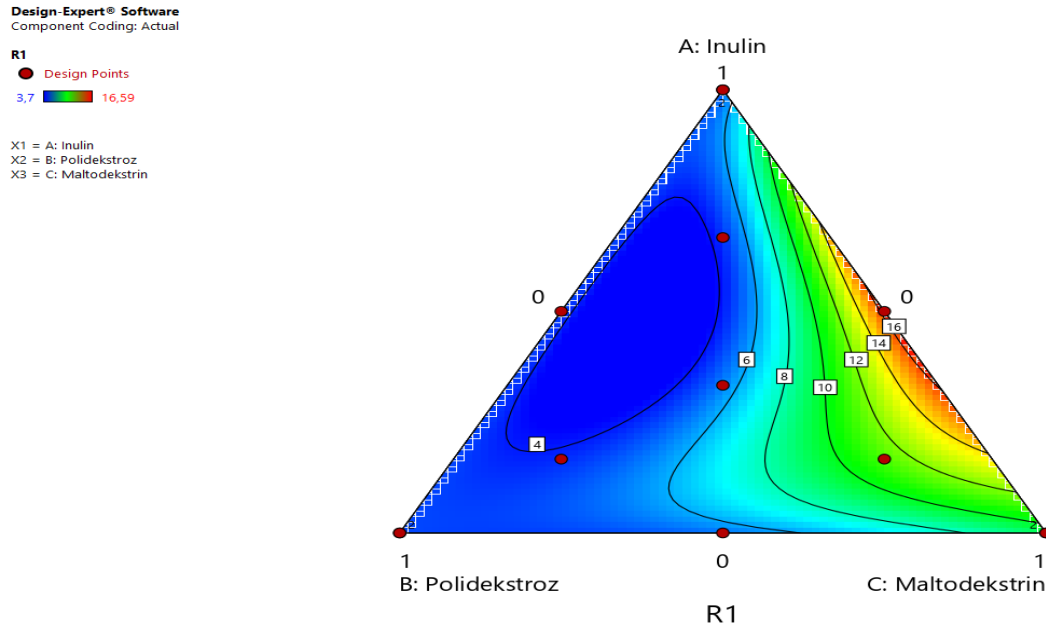
Toz içecekörneklerinde inülin ve maltodekstrin oranlarının artışıyla ıslanma süresinde artış görülmüştür. Doğrusal karışım, inülin ve maltodekstrin interaksyonunun istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu sonucun oluşabilmesi için toz bileşenlerin su ile sulandırılması katıların kılcılık özelliği sayesinde sıvının granülün gözenekli matrisine nüfuz etme kolaylığı artırılarak, ıslatma sürelerinde belirgin bir azalma sağlanması gerekmektedir (Visotto ve diğerleri, 2010). Bundan dolayı ıslanma süresi düşük olan örneklerde suyun yapıya hızlı nüfuz etmesinin etkisi olduğu düşünülmektedir.

Toz içeceklerin inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranlarının önemli olduğunun belirlendiği karışım dizaynıyla elde edilen model ile tahmin etmek ve ıslanma süresi değerleri ile ilişkileri belirlemek için kurulan denklem aşağıdaki gibi bulunmuştur.

$$\text{Islatma süresi} = 4,85X_1 + 4,61X_2 + 9,28X_3 - 0,5789X_1X_2 + 37,41X_1X_3 - 6,41X_2X_3 - 413,21X_1^2 X_2X_3 - 45,20X_1X_2^2X_3 + 117,97X_1X_2X_3^2$$

Eşitliklerde yer alan inülin (X_1), polidekstroz (X_2) ve maltodekstrini (X_3) ifade etmektedir. X_1 , X_2 ve X_3 'ün toplamı 1.0'a eşittir.

Şekil 4.11'de toz içecek örneklerinin ıslanma süresi değerleri üzerine bağımsız değişkenler olan inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranlarının etkisi gösterilmiştir. Grafik yorumlanmasında kırmızı renge yaklaştıkça ıslanma süresinin arttığını, mavi renge yaklaştığında ıslanma süresinin düştüğünü ifade etmektedir.



Şekil 4.11. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin ıslanma süreleri üzerindeki etkisi

4.4.4. Toz içecek örneklerinde kütle yoğunluk, Carr İndeks ve Hausner Oranı

Paketleme yoğunluğu olarak da adlandırılan yığın yoğunluğu, birim hacim başına tozun ağırlığını temsil eder ve genellikle kg/m^3 veya g/cm^3 olarak ifade edilebilir. Yığın yoğunluğu, toz ürünler için hayati önem taşır çünkü parçacıkların kendi hacimlerinin yanı sıra parçacıklar arasındaki boşlukları da içerir. Bu yüzden bir tozun yığın yoğunluğu, sıkıştırma, konsolidasyon vb. gibi parçacıkların paketlenme şekline bağlı olarak büyük ölçüde değişir ve paketlenmesini, taşınmasını ve işlenmesini etkilemektedir.

Bu anlamda yeni bir ürün seçeneği olarak çikolatalı toz içeceklerin formülasyonlarının kütle yoğunluğu, HR ve CI özelliklerinin değerlendirilmesi önemlidir.

Farklı konsantrasyonlarda prebiyotikler ile hazırlanan toz kakaolu içecek örneklerinin kütle yoğunluğu değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Çizelge 4.21’de görüldüğü üzere örneklerin kütle yoğunluğu değerleri $0,59\pm0,01$ ile $0,62\pm0,02$ arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Ek olarak Çizelge 4.21’de farklı oranlarda kullanılan prebiyotik hidrokolloidlerin Hausner oranları (HO), Carr indeks (CI) değerleri gösterilmiş ve sırasıyla $1,3\pm0,00$ - $1,39\pm0,03$ ile $22,25\pm1,16$ - $28,18\pm1,92$ aralığında tespit edilmiştir.

Çizelge 4.21. Toz içeceklerin kütle yoğunluğu, HO ve CI değerleri

No	İnülin X ₁ (gr)	Polidekstroz X ₂ (gr)	Malodeksrin X ₃ (gr)	Kütle Yoğunluğu g/cm ³	HO	CI
1	0	23	0	0,58±0,01 ^a	1,34±0,01 ^{abc}	22,25±1,16
2	3,68	3,68	15,64	0,62±0,00 ^a	1,31±0,05 ^{cc}	24,07±2,99
3	23	0	0	0,6±0,00 ^a	1,32±0,06 ^{bc}	24,41±3,76
4	11,5	0	11,5	0,6±0,00 ^a	1,3±0,00 ^c	23,25±0,00
5	23	0	0	0,615±0,02 ^a	1,34±0,01 ^{abc}	24,4±0,84
6	0	23	0	0,58±0,05 ^a	1,32±0,05 ^c	22,86±2,76
7	0	0	23	0,61±0,01 ^a	1,34±0,02 ^{abc}	25,83±1,17
8	7,66	7,66	7,66	0,6±0,00 ^a	1,38±0,05 ^{ab}	27,56±2,80
9	0	11,5	11,5	0,615±0,07 ^a	1,38±0,03 ^{ab}	27,77±1,57
10	3,68	15,64	3,68	0,6±0,00 ^a	1,39±0,03 ^{ab}	28,18±1,92
11	0	0	23	0,61±0,02 ^a	1,34±0,03 ^{abc}	25,85±1,99
12	11,5	11,5	0	0,62±0,02 ^a	1,35±0,02 ^{abc}	25,91±1,29
13	15,64	3,68	3,68	0,6±0,00 ^a	1,3±0,00 ^c	23,53±0,39

^{a,b,c}: Aynı sütundaki benzer harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak fark yoktur. (p>0,05)

İnülin, polidekstroz ve maltodekstrinin kullanım oranlarına bağlı olarak kütle yoğunluğu ve Carr indeks (CI) özelliklerinin değişimi için en uygun modeller sırasıyla lineer, kuadratik ve kübik olarak belirlenmiştir. Bu modellere ait R² değerleri sırasıyla kütle yoğunluğu değerleri için 0,8114, Carr indeks (CI) için 0,9524 belirlenmiştir. R² değerinden de anlaşıldığı gibi inülin, polidekstroz ve maltodekstrin ilaveli içeceklerin kütle yoğunluğu ve Carr indeks (CI) değerleri üzerindeki etkileri model ile başarılı bir şekilde açıklanabilmektedir (Çizelge 4.21.). Ancak HO değerleri için bu mümkün olmamıştır. Kullanılan bu bileşenlerin ilgili parametre üzerine etkisini ifade eden model (p>0.05) ve uyumsuzluk (lack of fit) değerleri önemli bulunmamıştır (P>0.05).

Kullanılan bu bileşenlerin kütle yoğunluğu parametresi üzerinde modelin uyumsuzluğu (lack of fit) (p>0.05) önemsiz iken CI değeri için uyumsuzluk (lack of fit) önemli bulunmuştur. (P<0.05).

Çizelge 4.22. Toz içeceklerin kütle yoğunluğu ve CI değerleri için varyans analiz sonuçları

Kaynak	Kütle Yoğunluğu		CI	
	F	DF	F	DF
Model	4,64*	5	10,00*	8
Doğrusal karışım	5,88*	2	3,39	2
X ₁ * X ₂	5,04	1	7,76*	1
X ₁ * X ₃	2,51	1	6,09	1
X ₂ * X ₃	4,11	1	17,48*	1
X ₁ ² * X ₂ * X ₃			1,59	1
X ₂ ² * X ₁ * X ₃			17,91*	1
X ₃ ² * X ₂ * X ₁			4,31	1
Kalıntı		7		4
Uyum Eksikliği	2,43	4	31,87*	1
Hata		3		3
Genel		12		12
Standart Hata	0,0083		0,7358	
Ortalama	0,6038		25,07	
C.V	1,37		2,94	
R ²	0,7681		0,9524	
Adj-R2	0,6025		0,8571	
Tahmini R2	-0,0124		-6,4738	
Adeq Precision	5,8540		10,2376	

* P değerinin 0,05'den küçük model terimlerinin önemli olduğunu gösterir.

Şekil 4.22'de toz çikolatalı içecek örneklerinin kütle yoğunluğu ve Carr indeks (CI) değerleri üzerine bağımsız değişkenler olan inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranlarının etkisi gösterilmiştir. Grafik yorumlanmasında kırmızı renge yaklaştıkça kütle yoğunluğunun arttığını mavi renge yaklaştığında kütle yoğunluğunun düştüğünü ifade etmektedir.

Varyans analiz sonuçlarında görüldüğü üzere inülin, polidekstroz ve maltodekstrin pozitif yönde doğrusal karışımın etkisi önemli ($p < 0,05$) bulunmuş ve etkinin artmasıyla birlikte kütle yoğunluğunu artırıcı etkisi bulunduğu saptanmıştır. Çalışma kapsamındaki örneklerde farklı prebiyotik maddeleri aynı oranda içeren örneklerin kütle yoğunluğu değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Benzer sonuçlar Han ve arkadaşlarının (2018) yüksek lifli çerez yapımı için farklı ticari lif malzemeleri (inülin, polidekstroz, maltodekstrin) ve mısır unu ile birlikte ekstrüde edilen örneklerinde elde edilmiş olup yığın yoğunluğu dirençli maltodekstrin ilavesi ile kontrolden daha düşük kütle yoğunluğu elde edilirken, karışıma polidekstroz ilavesi ile ürün yığın yoğunluğunu değiştirmediği tespit edilmiştir.

Lourenço ve diğerleri (2020) ananas kabuğundaki fenolik bileşiklerin maltodekstrin, inülin ve arap zımkı ile enkapsülasyonu sonucunda elde edilen örneklerin yığın yoğunluk değeri 0,18 ile 0,30 g/cm³ arasında değışmektedir. Mevcut çalışmada sonuçlar daha yüksek olup bu farklılığın püskürtölerek kurutma gibi aglomerasyon işlemlerinin yığın yoğunluğunu düşürücü etkisinden kaynaklandığı düşünölmektedir.

En yüksek su tutma kapasitesi sırasıyla 3,68: 15,64: 3,36 gr inülin, polidekstroz ve maltodekstrin kullanılarak hazırlanan toz içecek formölasyonunda (10. deneme noktası) 1,39±0,03 bulunurken en düşük ise sırasıyla 15,64: 3,68: 3,68 oranında inülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan formölasyonda (13. deneme noktası) 1,3±0,00 olarak gözlemlenmiştir.

Tozun akışkanlığının ve yapışkanlığının sınıflandırılması sırasıyla CI ve HO değeriğine göre yapılmıştır. CI değeri 20-35 orta düzey akışkanlığı göstermektedir. Benzer şekilde Hausner oranı 1,19–1,25 değeri arasında ise orta düzeyde yapışkanlık anlamına gelmektedir. Bu sınıflandırmaya dayanarak mevcut çalışmada prebiyotik toz kakaolu içeceklerin akabiirliğı ve yapışkanlığı orta düzey bulunmuştur. CI değeri orta düzey olan bir toz ürünün HR değeriğinin de orta düzey olması beklenen bir durumdur. Ayrıca toz ürünlerde farklı prebiyotik bileşenlerin farklı konsantrasyonda kullanılması düzensizliğe sahip aglomeralar, partiküller arası bir kenetlenmeye neden olmuş olabileceğı (Johansen ve Schæfer, 2001) ve ürünün akışkanlık davranışını olumsuz yönde etkilediğı düşünölmektedir.

Taşıma özellikleriyle ilgili olarak, daha düşük Hausner oranı (HO) değeriğeri, daha iyi akışkanlık özellikleriyle bağlantılı arzu edilen kohezyon özelliklerini gösterir. Serbest akışlı bir malzeme, daha fazla konsolidasyon eğilimine sahiptir ve bu, endüstriyel ölçekte üretim durmalarını önlemeye yardımcı olur. Ananas kabuğundaki fenolik bileşiklerin, maltodekstrin, inülin ve arap zımkı kullanılarak sprey kurutma işlemi ile stabilizasyonun sağlandığı çalışmada akışkanlık ve yapışkanlık açısından önemli istatistiksel farklılıklar (p<0,05) göstermemiş ve bu tüm tozlar için orta düzeyde bir yapışkanlık ve orta ile iyi arasında bir akışkanlık ile ilişkilendirilmiştir. Tüm tozlar için orta düzeyde bir yapışkanlık ve orta ile iyi arasında bir akışkanlık ile ilişkilendirilebilir. Mevcut çalışma ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Toz içeceklerin inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranlarının önemli olduğunun belirlendiği karışım dizaynıyla elde edilen model ile tahmin etmek için kütle yoğunluğu ve Carr indeks değerleri ile ilişkileri belirlemek için kurulan denklem aşağıdaki gibi bulunmuştur.

$$\text{Kütle yoğunluğu} = 0,6068X_1 + 0,5799X_2 + 0,6123X_3 + 0,0737X_1X_2 - 0,0520X_1X_3 + 0,0666X_2X_3$$

$$CI = 24,36X_1 + 25,51X_2 + 25,79X_3 + 9,13X_1X_2 - 8,08X_1X_3 + 13,70X_2X_3 - 93,25 X_1^2 X_2X_3 + 312,83 X_1X_2^2X_3 - 153,55 X_1X_2X_3^2$$

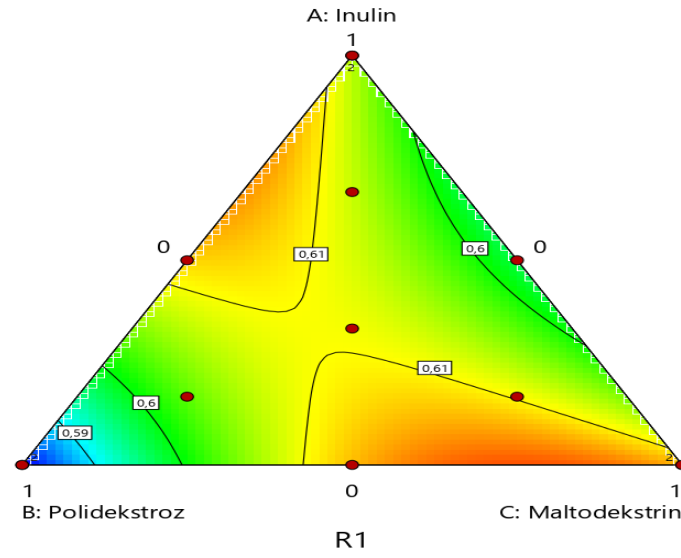
Eşitliklerde yer alan inülin (X_1), polidekstroz (X_2) ve maltodektrini (X_3) ifade etmektedir. X_1 , X_2 ve X_3 'nün toplamı 1.0'a eşittir.

Şekil 4.13'de toz içecek örneklerinin kütle yoğunluğu değerleri üzerine bağımsız değişkenler olan inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranlarının etkisi gösterilmiştir. Grafik yorumlanmasında kırmızı renge yaklaştıkça kütle yoğunluğunun arttığını, mavi renge yaklaştığında kütle yoğunluğunun düştüğünü ifade etmektedir.

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
0,58 0,62

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin

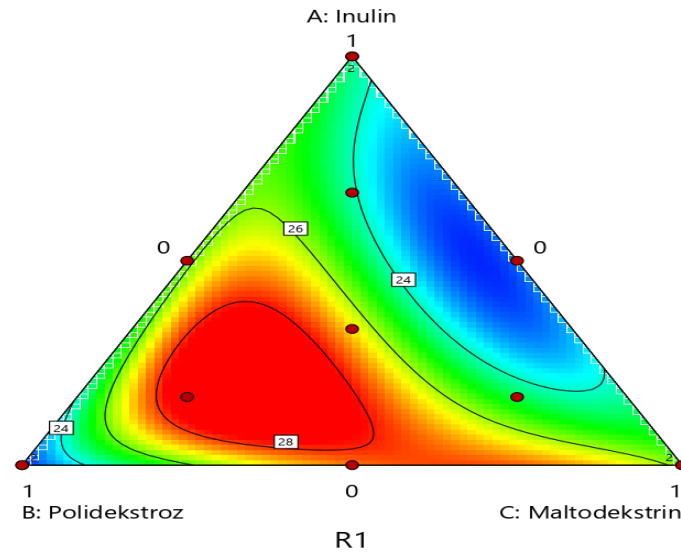


Şekil 4.12. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin kütle yoğunluğu üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
22,25 28,18

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin



Şekil 4.13. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin CI grafiği

4.4.5 Toz İçeceklerin örneklerinin renk özellikleri

Renk gıda maddelerinin en önemli kalite göstergelerindendir (Sarabandi ve diğerleri, 2019). Tüketiciler üzerindeki etkisi yalnızca görsel olmayıp ayrıca çeşidi, kalitesi ve bileşimi ile ilişkilendirilmektedir (Wu ve diğerleri, 2013). Toz içecek örneklerinin başlıca renk özellikleri (L^* , a^* , b^*) ve bu özelliklerin bileşimde kullanılan inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranları ile ilişkisi çalışma kapsamında incelenmiş olup, bu özelliklere ait bulgular Çizelge 4.23’de yer almaktadır. Kakao tozu, çikolata içeceğinde kahverengi renk ve özel lezzet sağlar. Prebiyotik bileşenlerin dahil edilmesi, çikolatalı içeceklerin renk parametrelerini etkileyebilir. Gıda ürünlerinin yüzey rengi, tüketiciler tarafından değerlendirilen ilk kalite parametresi olmuştur. Gıda ürünlerinde renk görünümü, duyuşal, beslenme ve görünür veya görünmez unsurlar gibi diğer kalite parametreleriyle bağlantılıdır. İçeceklerin rengi, farklı renkli bileşenlerin kullanımına atfedilebilir (Jayeola ve Akınwale 2002). İçeceklerin rengini (L^* , a^* ve b^* değerleri) belirlemek için bir kolorimetre ile belirlenmiştir.

Renk skalası 0 ile 100 aralığında ölçülen L^* değeri ürün parlaklığı ile ilgili bilgi vermekte olup, toz içecek örneklerinde $40,34 \pm 0,86$ - $48,62 \pm 0,83$ aralığında bir değişim göstermiştir. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışımının 015,64: 3,68: 3,68 oranlarında kullanılması sonucu hazırlanan 13 numaralı örneken yüksek parlaklık değerine sahiptir. a^* ve b^* değerleri sırasıyla artan pozitif değerlerde kırmızılık ve sarılığı, azalan negatif değerlerde yeşillik ve maviliği temsil etmekte olup, şekerleme örneklerinde yine sırasıyla $10,79 \pm 4,51$ - $14,02 \pm 0,43$ ile $10,33 \pm 0,29$ - $12,84 \pm 0,20$ aralığında değişim göstermişlerdir.

Çizelge.4.23.’de görüldüğü gibi kalite değerlendirmesinde ve tüketicinin kararlarında büyük rol oynayan numunelerin renk özellikleri (Antonelli ve diğerleri, 2004), karışım tasarımı yaklaşımı ile tatmin edici bir şekilde tahmin edilmiştir. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrinin kullanım oranlarına bağlı olarak renk özelliklerinin değişimi için en uygun modeller sırasıyla lineer, kuadratik ve kübik olarak belirlenmiştir. Bu modellere ait R^2 değerleri L , a^* ve b^* değerleri için sırasıyla 0,9389, 0,9915 ve 0,9904 olarak belirlenmiştir. R^2 değerinden de anlaşıldığı gibi inülin, polidekstroz ve maltodekstrin ilaveli içeceklerin L , a^* ve b^* değerleri üzerindeki etkileri model ile başarılı bir şekilde açıklanabilmektedir (Çizelge 4.24.). Kullanılan bu bileşenlerin b renk değerleri parametresi üzerinde modelin uyumsuzluğu (lack of fit) ($p > 0.05$) önemsiz iken L ve a^* değerleri için uyumsuzluk (lack of fit) önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Çizelge 4.23. Toz içeceklerin L, a* ve b* değerleri

No	İnülin X ₁ (%)	Polidekstroz X ₂ (%)	Malodeksrin X ₃ (%)	L	a*	b*
1	0	23	0	46,70±3,00	12,91±0,90	11,98±2,56
2	3,68	3,68	15,64	44,94±2,33	13,15±0,38	11,09±0,23
3	23	0	0	46,80±0,84	13,87±0,40	12,14±1,10
4	11,5	0	11,5	41,60±0,67	13,02±0,40	11,38±0,54
5	23	0	0	46,80±1,39	13,80±0,14	12,39±0,40
6	0	23	0	46,71±0,85	12,97±0,30	11,98±0,25
7	0	0	23	47,63±1,14	12,75±0,38	10,33±0,29
8	7,66	7,66	7,66	40,34±0,86	13,31±0,45	11,89±0,53
9	0	11,5	11,5	43,49±1,29	10,79±4,51	11,09±0,73
10	3,68	15,64	3,68	40,68±1,52	14,02±0,43	12,84±0,20
11	0	0	23	47,62±1,12	12,63±0,48	10,23±0,31
12	11,5	11,5	0	47,93±1,06	12,34±0,10	11,24±0,22
13	15,64	3,68	3,68	48,62±0,83	12,02±0,15	10,41±0,05

^{a,b,c}: Aynı sütundaki benzer harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak fark yoktur. (p>0,05)

Modelin işlevsel bir ortak değişkenin etkisinin olmadığını kontrol etmek için matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hataya, model uygunsuzluğu (Lack of fit) denmektedir. İdeal olarak, istatistiksel açıdan modelin matematiksel formunun uygunsuzluğunun önemsiz ve regresyon modeli için önemli olması gerekmektedir (Koç ve diğerleri, 2010; Patilea ve diğerleri, 2020).

Çizelge 4.24. Toz içeceklerin L, a* ve b* değerleri için varyans analiz sonuçları

Kaynak	L		a*		b*	
	F	DF	F	DF	F	DF
Model	7,68*	8	58,18*	8	51,78*	8
Doğrusal karışım	0,7314	2	36,12*	2	107,94*	2
X ₁ * X ₂	1,09	1	44,21*	1	33,74*	1
X ₁ * X ₃	15,10*	1	1,99	1	0,3047	1
X ₂ * X ₃	6,15	1	169,81*	1	0,1566	1
X ₁ ² * X ₂ * X ₃	7,63	1	96,08*	1	81,62*	1
X ₂ ² * X ₁ * X ₃	21,68*	1	195,19*	1	123,64*	1
X ₃ ² * X ₂ * X ₁	0,3741	1	36,51*	1	2,77	1
Kalıntı		4		4		4
Uyum Eksikliği	1,837E+05*	1	15,78*	1	3,47	1
Hata		3		3		3
Genel		12		12		12
Standart Hata	1,24		0,1376		0,1398	
Ortalama	45,37		12,89		11,46	
C.V	2,73		1,07		1,22	
R ²	0,9389		0,9915		0,9904	
Adj-R2	0,8166		0,9744		0,9713	
Tahmini R2	-9,4683		-0,2317		0,1035	
Adeq Precision	8,3944		26,9715		22,8074	

* P değerinin 0,05'den küçük model terimlerinin önemli olduğunu gösterir.

Şekil 4.14., Şekil 4.15, Şekil 4.16'da sırasıyla toz çikolata örneklerinin L*, a* ve b* özellikleri üzerine bağımsız değişkenler olan inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranlarının etkisi gösterilmiştir. Varyans analiz sonuçlarında görüldüğü üzere inülin, polidekstroz ve maltodekstrin pozitif yönde doğrusal karışımın etkisi önemli (p<0,05) bulunmuş ve etkinin artmasıyla birlikte a ve b değerlerinde yükselmeye neden olmuştur. Doğrusal karışımın L değeri üzerindeki etkisi ise önemsiz olarak belirlenmiştir.

Vissotto ve diğerleri (2010) Brezilya pazarında mevcut formülasyonlara benzer içerik maddeleri ve katkı maddeleri kullanılarak formüle edilen kakaolu içecek örneklerinin L, a* ve b* değerleri sırasıyla 46,63–49,95; 11,93–12,16 ve 14,29–15,25 arasında renk değerleri tespit edilmiştir. Mevcut çalışmanın sonuçları ile karşılaştırıldığında L (40,34±0,86–48,62±0,83) ve a* (10,79±4,51–14,02±0,43) değerlerin benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak b* değerleri 10,33–12,84 aralığında tespit edilmiş olup b* değerleri sırasıyla artan pozitif değerlerde sarılığı, azalan negatif değerlerde maviliği temsil etmekte olup prebiyotik bileşenler sarılığın azalması yönünde etki göstermiştir.

Prebiyotik toz çikolatalı içeceklerde, ürün bileşiminde kullanılan inülin, maltodekstrin ve polidekstroz oranlarının önemli olduğu belirlendiği L, a* ve b* parametreleri gibi renk özellikleri ile ilişkileri için sırasıyla aşağıdaki eşitlikler oluşturulmuştur.

$$\text{Toz karışım L değeri} = 46,89X_1 + 46,79X_2 + 47,71X_3 + 5,75X_1X_2 - 21,41X_1X_3 - 13,66X_2X_3 + 343,33 X_1^2X_2 X_3 - 578,81 X_1X_2^2X_3 + 76,03 X_1X_2X_3^2$$

$$\text{Toz karışım a* değeri} = 13,84X_1 + 12,94X_2 + 12,70X_3 - 4,07X_1X_2 - 0,8636X_1X_3 - 7,98X_2X_3 - 135,52X_1^2X_2 X_3 + 193,16X_1X_2^2X_3 + 83,54X_1X_2X_3^2$$

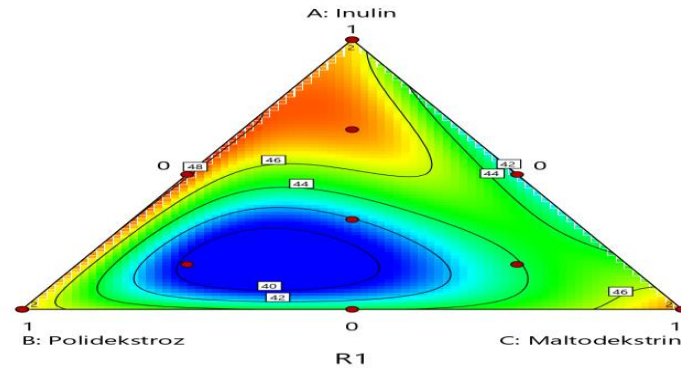
$$\text{Toz karışım b* değeri} = 12,26X_1 + 11,97X_2 + 10,27X_3 - 3,62X_1X_2 + 0,3436X_1X_3 - 0,2464X_2X_3 - 126,92X_1^2X_2 X_3 + 156,22X_1X_2^2X_3 + 23,38X_1X_2X_3^2$$

Eşitliklerde yer alan X_1 , inülin, X_2 , polidekstroz, X_3 ise maltodekstrini ifade etmektedir.

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
40,34 48,62

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin

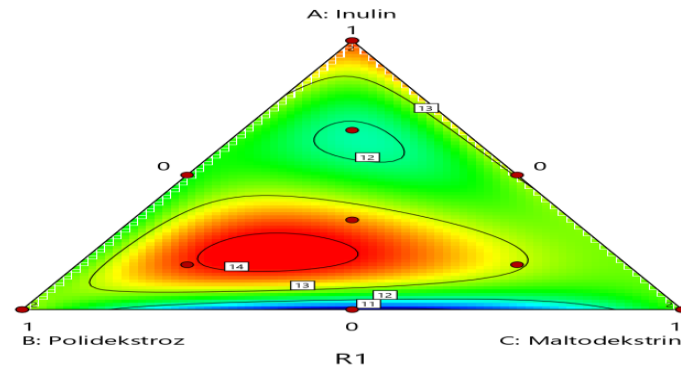


Şekil 4.14. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin L üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
10,79 14,02

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin

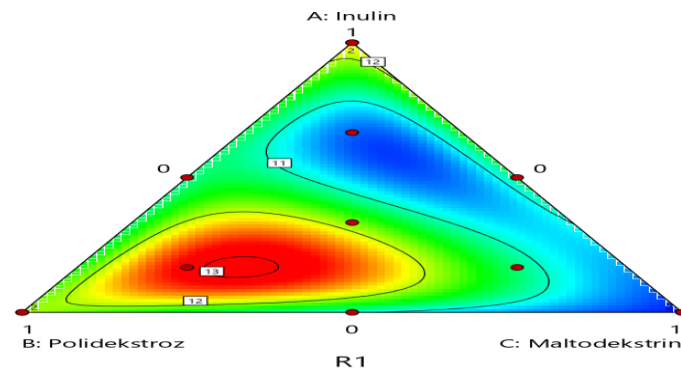


Şekil 4.15. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin b* üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
10,23 12,84

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin



Şekil 4.16. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin a* üzerindeki etkisi

4.4.6. Toz İçeceklerin örneklerinin duysal özellikleri

Gıdaların duysal analizi bileşim ve proses geliştirme ile re-formülasyon çalışmalarında kritik bir aşamadır (Sarabandi ve diğerleri, 2019). Özellikle re-formülasyon çalışmalarında kullanılan yeni bileşenlerin ikame edilen ile aynı duysal etkileri sağlaması gerekmektedir (Di Monaco ve diğerleri, 2018). Tüketicilerin daha sağlıklı ve fonksiyonel ürünlere yönelik talepleri bulunmaktadır. Lif ve biyoaktif maddelerce zenginleştirilmiş yeni kakao ve çikolata ürünlerinin dizayn edilmesine yönelik ilgi ve talepte de artış bulunmaktadır (Cappa ve diğerleri, 2015). Ancak bu yeni ürünlerin de konvansiyonel olanlarla aynı duysal özelliklere sahip olmasını talep etmektedirler. Haz amaçlı olarak ürünlerde ise duysal özelliklerde önemli sapmalar meydana gelmeden yeni ürün geliştirmek daha da önemli bir sorundur.

Toz prebiyotik çikolata örneklerinin bazı duysal (asılı parçacıklar, renk, kıvam, kremsi, tatlılık, bitter, dengeli ve genel beğeni) özelliklerine ait bulgular, Çizelge 4.25 ve 4.26'de yer almaktadır. Toz prebiyotik çikolata örneklerinin asılı parçacıklar, renk, kıvam, kremsilik, bitter, tatlılık, dengeli ve genel beğeni özellikleri sırasıyla 1.25-4.75, 7.12-8.25, 5.12-6.75, 3.12-4.87, 4.00-6.50, 4.87-6.75, 4.00- 6.37 ve 5.62-8.12 aralıklarında puanlanmıştır. Kıvam ajanları olarak ile tamamen prebiyotikler ile hazırlanan 9 numaralı örnek genel beğeni duysal parametresinde en yüksek puan değerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.25. Toz içeceklerin duysal özelliklerinin değerleri

No	İnülin X ₁ (%)	Poli dektroz X ₂ (%)	Malto deksrin X ₃ (%)	Asılı parçacıklar	Renk	Kıvam	Kremsi
1	0	23	0	4,75±3,28	7,12±3,90	6,12±2,79	3,5±3,11
2	3,68	3,68	15,64	3,25±2,43	7,25±3,73	5,12±2,41	3,12±2,16
3	23	0	0	2,37±2,72	7,62±2,77	5,12±2,41	3,62±2,44
4	11,5	0	11,5	2,12±1,72	7,75±3,10	5,37±1,06	3,87±1,80
5	23	0	0	2,25±2,43	7,87±1,92	5,50±2,67	3,37±1,68
6	0	23	0	4,25±2,37	7,25±1,90	6,25±1,28	3,12±1,45
7	0	0	23	1,62±2,72	7,25±3,19	5,25±2,12	2,62±1,76
8	7,66	7,66	7,66	1,75±0,70	8,25±1,66	6,62±1,06	4,87±1,80
9	0	11,5	11,5	1,25±0,43	8,25±1,48	6,50±1,30	4,62±2,50
10	3,68	15,64	3,68	3,25±3,61	7,12±2,74	6,75±1,03	4,37±2,06
11	0	0	23	1,87±1,45	7,62±1,84	5,25±1,92	2,25±1,90
12	11,5	11,5	0	2,75±1,38	7,87±1,55	6,00±2,13	3,12±2,16
13	15,64	3,68	3,68	1,5±0,75	7,87±1,64	6,12±2,03	3,75±2,65

Ortalama ± Standart Sapma; Toplam panelist sayısı 34'tür (20-46 yaş); 1= çok kötü, 9=çok iyi

Çizelge 4.26. Toz içeceklerin duysal özelliklerinin değerleri (Devamı)

No	İnulin X ₁ (%)	Poli dekstroz X ₂ (%)	Malto deksrin X ₃ (%)	Bitter	Tatlı	Dengeli	Genel Beğeni
1	0	23	0	5,87±2,29	4,87±2,94	4,75±2,54	5,625±3,11
2	3,68	3,68	15,64	4,00±2,00	5,0±2,44	4,00±2,67	5,85±2,16
3	23	0	0	4,12±2,41	4,87±2,23	5,45±2,32	7,62±2,44
4	11,5	0	11,5	5,37±2,06	5,87±1,88	5,12±2,47	5,87±1,80
5	23	0	0	5,25±2,18	5,62±1,30	5,50±1,60	7,6±1,68
6	0	23	0	5,87±2,29	6,62±1,76	4,87±0,83	5,25±1,45
7	0	0	23	4,87±2,35	5,00±2,87	6,00±2,20	7,00±1,76
8	7,66	7,66	7,66	6,00±2,26	6,37±1,92	6,5±1,51	7,87±1,80
9	0	11,5	11,5	6,50±2,50	6,75±1,75	6,37±1,30	8,12±2,50
10	3,68	15,64	3,68	5,87±2,16	6,25±1,98	6,00±1,51	8,12±2,06
11	0	0	23	4,87±1,80	6,25±1,45	6,12±2,10	7,62±1,90
12	11,5	11,5	0	5,12±2,47	6,15±1,66	5,25±1,66	7,87±2,16
13	15,64	3,68	3,68	4,87±2,03	6,37±2,61	5,75±1,48	7,37±2,65

İnulin, polidekstroz ve maltodekstrinin kullanım oranlarına bağlı olarak duysal özelliklerinin değişimi (asılı parçacıklar, renk, kıvam, kremsilik, bitter, tatlılık, dengeli ve genel beğeni) için en uygun modeller sırasıyla lineer, kuadratik ve kübik olarak belirlenmiştir. Bu modellere ait R^2 değerleri sırasıyla 0,9413, 0,4735, 0,8033, 0,9616, 0,8620, 0,8694, 0,8432 ve 0,9613 olarak tespit edilmiştir. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrinin asılı parçacıklar, kremsi, kıvam, genel beğeni özellikleri üzerindeki etkilerine ait modeller önemli olarak belirlenmiştir. Bunlardan renk özelliklerine ait modellere R^2 değeri güvenilirlik açısından düşük bir değere sahiptir. Renk, bitter, tatlılık ve dengeli tat parametreleri için oluşturulan model önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Kullanılan bu bileşenlerin renk, kremsi, kıvam, tatlılık, dengeli değerleri parametresi üzerinde modelin uyumsuzluğu (lack of fit) ($p>0.05$) önemsiz iken asılı parçacıklar görünümü, bitter, dengeli tat değerleri için uyumsuzluk (lack of fit) önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Çizelge 4.27. Toz içeceklerin asılı parçacıklar, renk, kıvam, kremsilik, bitter, tatlılık, dengeli ve genel beğeni özellikleri üzerine etkisi

	Asılı Parçacıklar		Renk		Kremsi		Kıvam	
Kaynak	F	DF	F	DF	F	DF	F	DF
Model	8,018*	8	1,26	5	5,72*	5	12,53*	8
Doğrusal karışım	19,12*	2	1,09	2	2,40	2	26,00	2
X₁ * X₂	1,29	1	0,5375	1	0,0045	1	0,9658	1
X₁ * X₃	0,1252	1	0,0175	1	4,25	1	0,0693	1
X₂ * X₃	612,72*	1	3,19	1	17,65	1	11,09	1
X₁²* X₂* X₃	7,70	1	96,08				6,92	1
X₂²* X₁* X₃	0,1241	1					5,89	1
X₃²* X₂* X₁	9,27*	1					11,86	1
Kalıntı		4		7		7		4
Uyum Eksikliği	0,0410*	1	6,22	4	5,13	4	3,13	1
Hata		3		3		3		3
Genel		12		12		12		12
Standart Hata	0,4504		0,3789		0,4387		0,2029	
Ortalama	2,54		7,62		3,55		5,84	
C.V	17,75		4,97		12,35		3,47	
R²	0,9413		0,4735		0,8033		0,9616	
Adj-R²	0,8238		0,0974		0,6628		0,8849	
Tahmini R²	-7,0809		-0,8716		0,4647		-2,4281	
Adeq Precision	8,9864		3,1257		7,9109		9,6692	

* P değerinin 0,05'den küçük model terimlerinin önemli olduğunu gösterir.

Çizelge 4.28. Toz içeceklerin asılı parçacıklar, renk, kıvam, kremsilik, bitter, tatlılık, dengeli ve genel beğeni özellikleri üzerine etkisi (Devamı)

Kaynak	Bitter		Tatlı		Dengeli		Genel Beğeni	
	F	DF	F	DF	F	DF	F	DF
Model	3,12	8	3,33	8	2,69	8	12,41	8
Doğrusal karışım	7,73*	2	6,69	2	0,8690	2	6,57	2
X₁ * X₂	0,0007	1	0,1918	1	0,0001	1	10,93	1
X₁ * X₃	1,68	1	0,1238	1	1,89	1	17,54	1
X₂ * X₃	3,24	1	0,5467	1	2,33	1	18,72	1
X₁²* X₂* X₃	0,7444	1	7,11	1	3,58	1	0,8888	1
X₂²* X₁* X₃	0,9855	1	0,0103	1	4,06	1	9,95	1
X₃²* X₂* X₁	5,85	1	10,00	1	10,21	1	13,31	1
Kalıntı		4		4		4		4
Uyum Eksikliği	366,84*	1	9,53	1	180,93*	1	2,66	1
Hata		3		3		3		3
Genel		12		12		12		12
Standart Hata	0,5103		0,3129		0,4898		0,3520	
Ortalama	5,20		6,15		5,51		7,06	
C.V	9,82		5,08		8,88		4,99	
R²	0,8620		0,8694		0,8432		0,9613	
Adj-R2	0,5859		0,6083		0,5297		0,8838	
Tahmini R2	-22,4527		-16,1317		-25,4252		-2,1998	
Adeq Precision	5,1997		5,7461		4,9078		9,9117	

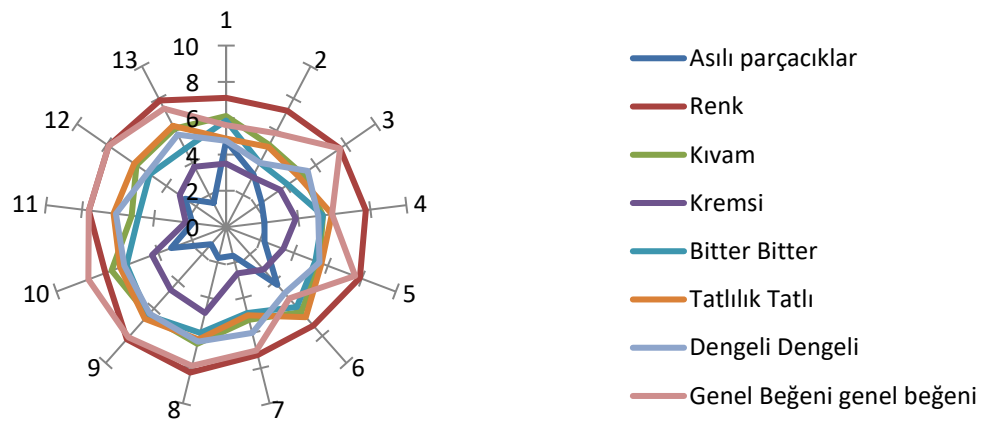
* P değerinin 0,05'den küçük model terimlerinin önemli olduğunu gösterir.

Çizelge 4.27 ve 4.28'da toz içecek örneklerinin asılı parçacıklar, renk, kıvam, kremsilik, bitter, tatlılık, dengeli ve genel beğeni özellikleri üzerine bağımsız değişkenler olan inülin, polidekstroz ve maltodekstrin oranlarının etkisi gösterilmiştir. Varyans analiz sonuçlarında görüldüğü üzere inülin, polidekstroz ve maltodekstrin pozitif yönde doğrusal karışımın etkisi önemli ($p < 0,05$) bulunmuş ve etkinin artmasıyla birlikte asılı parçacıklar ve bitter değerlerinde yükselmeye neden olmuştur.

Genel olarak prebiyotik bileşenlerin tek olarak kullanımının diğer bileşenlerle ortak kullanımına göre; duyuşal değerlendirmede tatlılık beğenme düzeyinin daha düşük beğeniye sahip olduğu toz içecek elde edilmesini sağladığı belirlenmiştir. Toz içecek örneklerinde kakao ve şeker oranı sabit olmasına rağmen farklı oranlarda prebiyotik bileşenlerin kullanılması bitter tat düzeyinin farklı algılanması dikkat çekici bulunmuştur. Bu değerlendirmelerin sebebi soğuk tüketim anında inülin sakaroza (sukroz = 1) kıyasla 0,1'lik nispi tatlılığa sahiptir, bu da şekerden 10 kat daha az tatlı olduğu anlamına gelmektedir. Ancak sıcak koşullarda inülin şeker olarak değil yağ ikamesi olarak kullanıldığı için pratikte hiç tatlılığa sahip değildir (Anonim,2021). Bunun yanı sıra maltodekstrinler neredeyse şekersizdir (sakkarozun %0-%5

tatlılığı), ve suda kolayca çözünürler, bu da lezzetleri için önemlidir (Tiefenbacher, 2017). Polidekstroz ise tatlı değildir ancak hafif ekşi bir tada sahiptir ve bu nedenle tatlılık eklemeden gıdaya doku katabilir. Kek, şekerleme, puding ve tatlılar gibi gıdalarda genellikle şeker, nişasta ve yağın yerine kullanılır (Tiefenbacher, 2017). Koyulaştırıcı olarak seçilen prebiyotiklerin algılanan tat düzeylerini değiştirmelerinin sebebi yapılarındaki özelliklerden kaynaklandığı ön görülmektedir.

Çikolatalı içeceklerin formülasyonun bir işlevi olarak fizikokimyasal ve duysal özellikler açısından önemli farklılıklar gösterir. Renk, görünüm, koku, tat ve doku içeceğin kabulüne katkıda bulunur ve tüketici tercihi için belirleyicidir. İçecek formülasyonlarındaki kakao ve diğer bileşenler genel duyum için olağanüstü bir rol oynar. Ticari çikolatalı içecekler, ana bileşenlerine göre önemli farklılıklar gösterir, bu nedenle farklı duysal profiller beklenmelidir (Yanes ve diğerleri, 2002). Şekil. 4.17.'de toz çikolatalı örneklerin duysal özelliklerinin örneklere göre değerlendirildiği dairesel grafik gösterilmiştir. Bu toz içecek örneklerinde suda asılı parçacıklarının yoğunlukları panelistler tarafından farklı algılanma düzeyi elde edilmiştir. Mazo Rivas ve diğerleri (2018) ticari sıcak çikolata içeceklerin kakao, şeker, emülsifiyer yağ bileşen ve oranları değiştirilerek yapılan duysal değerlendirmelerde yağ içeriğinin kremsilik ile bağlantılı olduğu bunun yanı sıra ayrıca, sıcak çikolata içeceklerinin asılı parçacıkların özellikleriyle pozitif bir korelasyon etkisi gözlemlenmiştir.



Şekil.4.17. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin karışım oranlarının toz içeceklerin duysal özelliklerine etkisi

Prebiyotik toz çikolatalı içeceklerde, ürün bileşiminde kullanılan inülin, maltodekstrin ve polidekstroz oranlarının önemli olduğu belirlendiği asılı parçacıklar, renk, kıvam, kremsi,

tatlılık, bitter, dengeli ve genel beğeni parametreleri gibi duysal özellikleri ile ilişkileri için sırasıyla eşitlik (4.24), (4.25), (4.26), (4.27), (4.28), (4.29), (4.30), (4.31), (4.32) ve (4.33) oluşturulmuştur.

$$\text{Asılı parçacık} = 2,34X_1 + 4,53X_2 + 1,77X_3 - 2,28X_1X_2 + 0,7094X_1X_3 - 7,15X_2X_3 - 125,54X_1X_2X_3 + 15,94X_1X_2X_3 + 137,80X_1X_2X_3$$

$$\text{Renk} = 7,79X_1 + 7,13X_2 + 7,39X_3 + 1,11X_1X_2 + 0,1993X_1X_3 + 2,69X_2X_3$$

$$\text{Kremsi} = 3,48X_1 + 3,35X_2 + 2,31X_3 - 0,1175X_1X_2 + 3,60X_1X_3 + 7,34X_2X_3$$

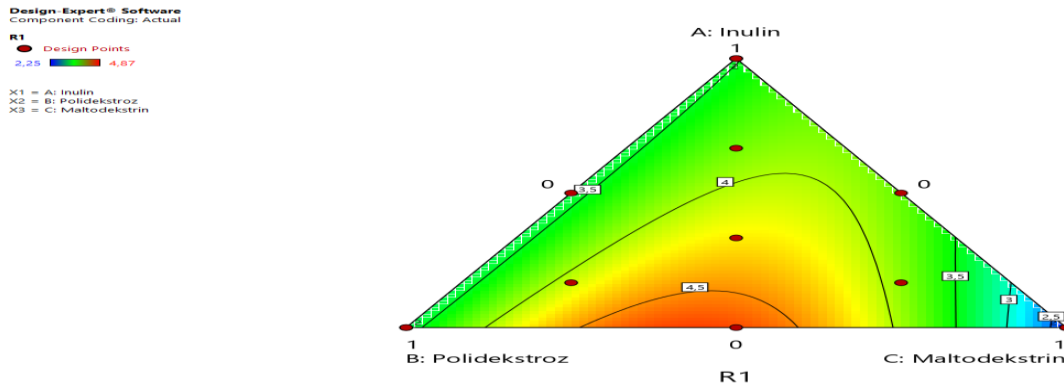
$$\text{Kıvam} = 5,30X_1 + 6,17X_2 + 5,24X_3 + 0,8878X_1X_2 + 0,2378X_1X_3 + 3,01X_2X_3 + 53,62X_1X_2X_3 + 49,48X_1X_2X_3 - 70,22X_1X_2X_3$$

$$\text{Bitter} = 4,15X_1 + 5,83X_2 + 4,83X_3 - 0,0586X_1X_2 + 0,294X_1X_3 + 4,09X_2X_3 + 44,24X_1X_2X_3 + 50,90X_1X_2X_3 - 124,06X_1X_2X_3$$

$$\text{Tatlı} = 5,73X_1 + 6,73X_2 + 6,11X_3 - 0,6101X_1X_2 - 0,4901X_1X_3 + 1,03X_2X_3 + 83,83X_1X_2X_3 + 3,19X_1X_2X_3 - 99,41X_1X_2X_3$$

$$\text{Genel Beğeni} = 5,44X_1 + 4,78X_2 + 6,03X_3 - 0,0204X_1X_2 - 3,00X_1X_3 + 3,33X_2X_3 + 93,15X_1X_2X_3 + 99,09X_1X_2X_3 - 157,23X_1X_2X_3$$

Eşitliklerde yer alan X_1 , inülin, X_2 , polidekstroz, X_3 ise maltodekstrini ifade etmektedir.

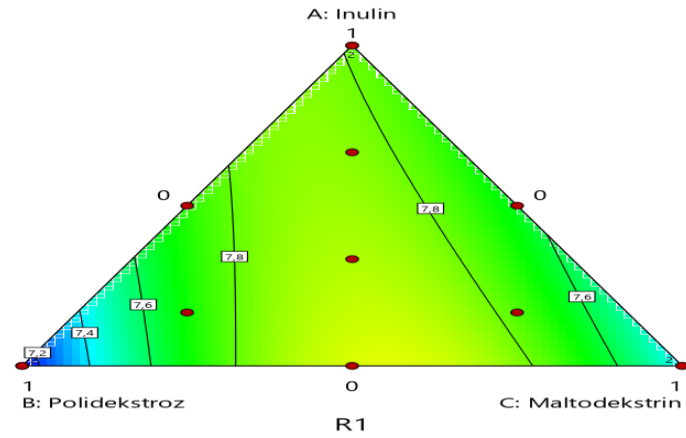


Şekil 4.18. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin kremsi yapısı üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
7,12 8,25

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin

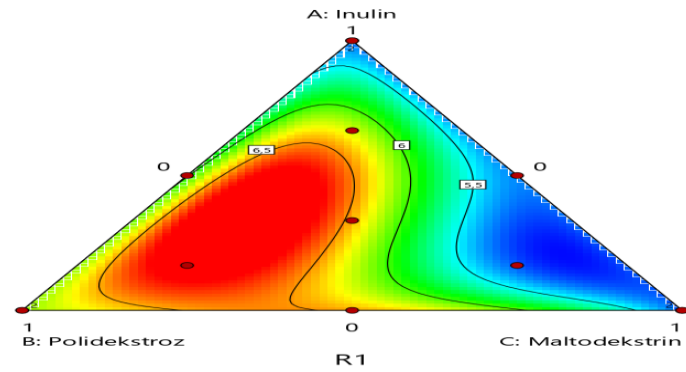


Şekil 4.19. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin renk üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
5,12 6,75

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin

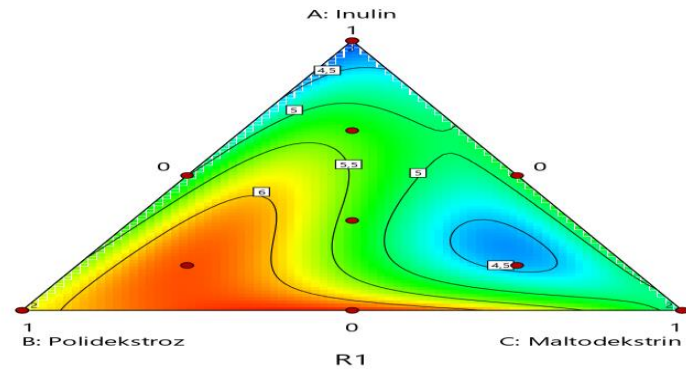


Şekil 4.20. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin kıvam üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
4 6,5

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin

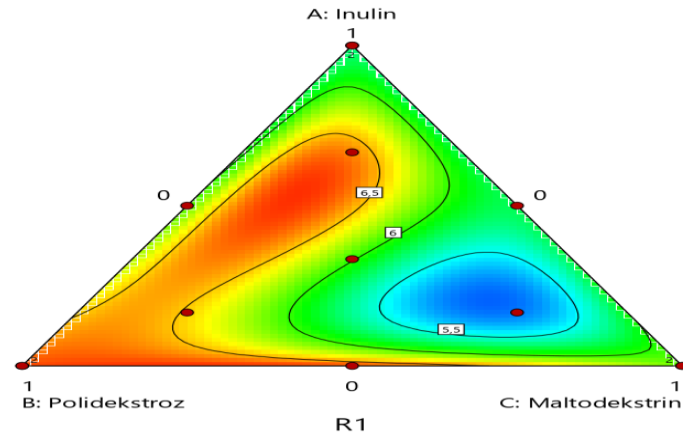


Şekil 4.21. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin bitter tat üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
5 6,87

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin

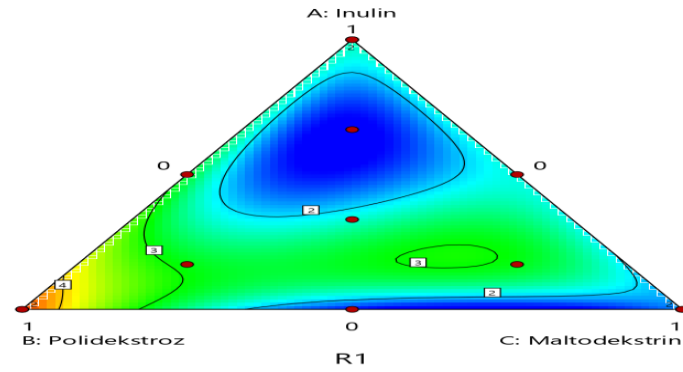


Şekil 4.22. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin tatlılık üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
1,25 4,75

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin

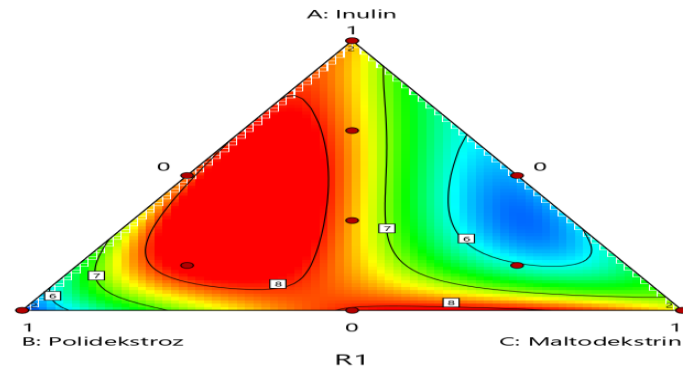


Şekil 4.23. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin asılı parçacıklar kapasitesi üzerindeki etkisi

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual

R1
● Design Points
5,25 6,12

X1 = A: İnulin
X2 = B: Polidekstroz
X3 = C: Maltodekstrin



Şekil 4.24. İnulin, polidekstroz ve maltodekstrin ile hazırlanan toz içeceklerin genel beğeni üzerindeki etkisi

4.4.8. Toz İçeceklerin örneklerinin optimum formülasyonu

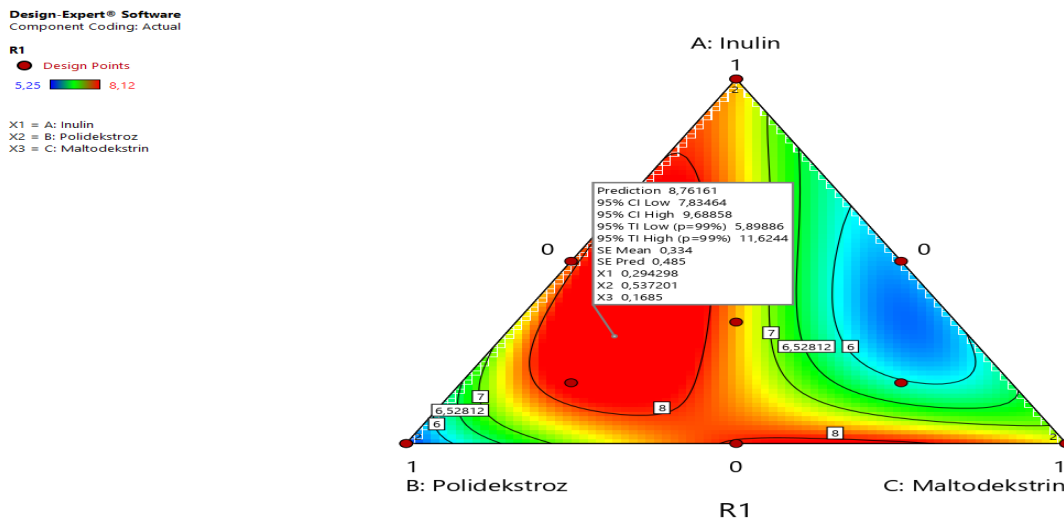
Bu çalışmanın ikinci aşamasında, prebiyotik bileşenlerin koyulaştırıcı ajan olarak ikame edildiği toz prebiyotik çikolatalı içecek bileşiminde inülin, polidekstroz ve maltodekstrin düzeylerinin optimizasyonu için yanıt olarak duyusal analiz sonucu belirlenen genel beğeni sonuçları esas alınmış olup, bu parametrede maksimum düzeye ulaşmak için ürün bileşimi optimize edilmiştir (Şekil 4.25). Her üç bağımsız değişken içinde optimizasyon sonucunda belirlenen dizayn noktalarına ait istenebilirlik değeri (desirability) genel beğeni için 0.8761 olup; dizayn noktaları ise;

$$X_1 = \text{Inülin} = 0,294$$

$$X_2 = \text{Polidekstroz} = 0,537$$

$$X_3 = \text{Maltodekstrin} = 0,1685$$

olarak tespit edilmiştir. Duyusal değerlendirme sonuçları dikkate alındığında prebiyotik koyulaştırıcı ajanlar kullanılarak duyusal özellikleri kabul edilebilir nitelikte olan toz çikolatalı içecek eldesi sağlayabileceğini ortaya çıkartmıştır. Bu sonuç ise düşük kalorili ve yüksek lif içeriğine sahip ürün geliştirme açısından önemli avantajlar sağlayabilir.



Şekil 4.25. İnülin, polidekstroz ve maltodekstrin düzeylerinin optimizasyonu için yanıt olarak duyusal analiz sonucu belirlenen genel beğeni üzerine etkisi

4.5. Toz İçeceklerin Örneklerine *L. Paracasei* İlavesi ve Canlılık Düzeyi

Anında çözünür çikolatalı içecek üretimi için belirlenen optimum formülasyona göre 4 gr şeker, 2 gr kahve sı, 6 gr kakao, 6,762 gr inülin, 12,351 gr polidekstroz, 3,875 gr maltodekstrin karıştırılarak hazır toz sıcak çikolatalı içeceklerinin içerisine enkapsüle *L. paracasei* bakterisinin ekleneceği miktarı belirlemek için çeşitli ön denemeler sonucunda 1 gr enkapsüle bakteri miktarı belirlenmiştir. Her bir 36 gr'lık porsiyonlar halinde hazırlanan anında çözünür çikolatalı içecek için 1 gram kapsüle bakteri eklenerek toplamda 37 gr ürün hazırlanmıştır. Hazır sıcak çikolatalı içecekleri hazırlamak için, bileşenler ve enkapsüle bakteri içeren toz bileşenler 70°C'de 100 ml suya yavaşça ilave edildi ve 30 saniye boyunca sürekli karıştırıldı ve 2. dakikada örneklerin gastroentisinal sistemde canlılığını değerlendirmek için bakteri sayımı gerçekleştirildi. Isı ile karşılaşması sonucunda enkapsüle bakteri örneklerinin simüle mide, safra ve bağırsak ortamında bakteri sayımlarının sonuçları Çizelge 4.29'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.29. Simüle edilmiş gastrointestinal koşulların her adımında toz içeceklerin içerisine ilave edilmiş enkapsüle *Lactobacillus paracasei* 'nin canlı sayısı (kob/g)

	Mide ortamı (pepsin /ph:2/ 60 dk)	Safra ortamı (safra tuzu/ 60 dk)	Bağırsak ortamı (pankreatin/ 60 dk)	<i>In Vitro</i> Sindirim (gastrik sıvısı, safra ve intestinal sıvısı 60dk)
Toz örnek hayatta kalma oranı (kob/gr)	5.10 ⁶	1.10 ⁷	10.10 ⁷ 46. 10 ⁶	5.10 ⁵
Toz örnek hayatta kalma oranı (%)	0,25	0,5	23	0,025

Çizelge 4. 29'a göre, öncelikle 70°C'de 2 dk süreyle ısıya maruz kalan ve daha sonra gastroentistinal ortamında asit, enzim şartlarına maruz kalması ile enkapsüle bakterilerin sayısı azalmıştır. Buna göre enkapsüle *L. paracasei* simüle mide ortamında ortalama %0,25 oranında canlılığını sürdürebilmişken safra ve bağırsak ortamında sırasıyla ortalama %0,5 ve %23 oranında canlı kalabilmiştir. Probiyotik ürünlerde herhangi bir sağlık yararı sağlayabilmesi için tüketim anında üründe minimum 10⁶ kob/g konsantrasyon önerilir (Tripathi ve Giri, 2014). Elde edilen verilere göre enkapsülasyon işlemi ile ~10⁹ kob/g bakteri ürünün

içerisinde enkapsülasyonu sağlanmıştır ve tüketim anında $\sim 10^9$ cfu/g konsantrasyonda olup tüketilmesi halinde bağırsak sistemine ulaşan bakteri sayısı 5.10^5 civarında olduğu tespit edilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında; sütün izole edilen *L. paracasei* probiyotik bakterisinin kaplama materyal oranları optimize edilmiş bileşenlerin liyofilizasyon işlemi uygulanarak enkapsülasyonu ile probiyotik katı maddesi üretim yönteminin geliştirilmiştir. Toz prebiyotik (polidekstroz, maltodekstrin, inülin) içecek bileşenlerinin tekrar formüle edilmesi sonucu toz içecek üretim yönteminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Gıda ürünlerinde uygulama için probiyotik mikroorganizmaların kapsüllenmesini teşvik etmek için çeşitli yöntemler kullanılabilmektedir. En uygun kapsülleme yönteminin seçimi esasen çekirdek malzemesinin tipine ve kapsüllemenin uygulanacağı nihai ürünün özelliklerine ve oranlarına bağlıdır. Ek olarak, kapsül duvar malzemesinin seçimi, kapsüllenmiş maddenin özellikleri üzerinde, özellikle kapsülleme verimliliği üzerinde büyük bir etkiye sahiptir ve dikkatle düşünülmelidir. Bu sebeple kaplama içeriğini oluşturan bileşen oranlarının optimizasyonun amacı, enkapsülasyon verimini maksimize eden duvar materyali kombinasyonunu tespit etmektir. Optimizasyon sonucunda enkapsüle edilen *L. paracasei* için duvar malzemeleri %3,125 sodyum aljinat, %5,503 inülin, %1,001 kitosan, %1,457 kalsiyum karbonat ilaveli kapsüle edilmiş bakteri örneklerinin en uygun model olduğu tespit edilmiştir.

Proje kapsamında ulaşılması hedeflenen diğer bir amaç ise prebiyotik olarak nitelendirilen koyulaştırıcı bileşenler (inülin, maltodekstrin polidekstroz) toz içecek ürün bileşimine ilave edilmiştir ve ürün formülasyonu tekrar oluşturulmuştur. Buna göre toz içecekler duysal sonuçları kullanılarak Design Expert programında optimizasyonu değerlendirilmiş, prebiyotik toz örneklerin optimum fomülasyonu oluşturulmuştur. Elde edilen verilere göre 5gr şeker, 2 gr kahvekrema, 6 gr kakao, 6,762 gr inülin, 12,351 gr polidekstroz, 3,875 gr maltodekstrin karıştırılarak hazır toz sıcak çikolatalı içecekleri üretilmiştir.

Yapılan çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda aşağıdaki öneriler yapılabilir;

1. Probiyotik bakteriler bağırsak kökenli olduğundan dolayı, oksijen hayatta kalmaları için zararlıdır. Antioksidanların kapsülleme matrisine dahil edilmesi, bu sorunu kısmen çözebilir. Anaerobik bir ortam sağlanabilir ancak kullanımı elverişsizdir ve büyük ölçekli bir işlemde uygulanması zordur. Bu nedenle, uygun maliyetli yeniliklerle oksijenin anaerobik mikroorganizmalar üzerindeki toksik etkisiyle yüzleşmek için daha fazla araştırma yapılmalıdır (Corona-Hernandez ve diğerleri., 2013).

2. Aljinat mikro boncuklarının aşırı monovalent iyonlar, Ca^{2+} şelatlama maddeleri veya olumsuz kimyasal ortamlar varlığında parçalanmaya yatkın gözenekli yapıları nedeniyle probiyotik bakterileri zorlu koşullardan korumada her zaman etkili olmadığı bildirilmiştir. Bu yüzden işlem başarısı sadece kapsülleme yöntemlerine değil, aynı zamanda kullanılan aljinatın yapısına ve moleküler ağırlığına da bağlıdır. Bu nedenle, kapsülleyici ajanların yapısal özellikleri ve bunlardan ortaya çıkan mikro boncukların üretimi ve davranışı üzerindeki etkileri hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Frakolaki ve diğerleri., 2020).
3. Probiyotiklerin ısıl direncini artırmak için uygun malzeme arayışı pişirme veya pastörizasyon gibi ısıl işlem gerektiren gıda matrislerine katılmalarını kolaylaştırmak için önemli kabul edilir. Geliştirilen kapsülleme sistemi, probiyotik hücreler için bir yalıtım ortamı görevi görmelidir. Sodyum aljinat, ısı koruması için sıklıkla kullanılmıştır. Ancak sonuçlar umut verici değildir. Sodyum aljinat tarafından üretilen mikro boncuklar oldukça gözeneklidir, bu nedenle matris içinde sıcak sıvının difüzyonuna izin verir. Bir yalıtım ortamının başarılı bir şekilde geliştirilmesi için, araştırma aynı zamanda çeşitli gıda sınıfı biyomalzemelerin ve lipitlerin ısıl iletkenlik özelliklerine odaklanmalıdır (Anal ve Singh 2007).
4. Toz haline getirilmiş kakaolu içecek üretimi, dünya çapında en yavaş gelişen içecek gıda endüstrilerinden biridir. Bu nedenle, bileşen kombinasyonu ve ürün formülasyonunun ürünlerin kalitesini nasıl etkilediğine ilişkin model çalışmalarından elde edilen teknik veriler gerektirir, bu tür bilgiler literatürde genellikle yetersizdir (Shittu ve Lawal, 2007). Bu konuda yapılan çalışmalar artırılmalıdır.
5. Aglomerasyon teknikleri arasında uzun ve zor, kapsamlı teknikler kullanmak yerine tüm rehidrasyon sürecini benzersiz ve hızlı bir deneyde takip edecek dinamik bir yöntem geliştirmek ve uyarlamakla ilgili çeşitli çalışmalar da araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abbaszadeh, S., Gandomi, H., Misaghi, A., Bokaei, S., & Noori, N. (2014). The effect of alginate and chitosan concentrations on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2210-2216.
- Abdullah, E. C., & Geldart, D. (1999). The use of bulk density measurements as flowability indicators. *Powder technology*, 102(2), 151-165.
- Adebola, O. O., Corcoran, O., & Morgan, W. A. (2014). Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. *Journal of Functional Foods*, 10, 75-84.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry. *LWT-food science and technology*, 43(6), 837-842.
- Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Nani, A., & Perego, P. (2017). Production of chocolate powdered beverage with enhanced instant properties. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 877-882.
- Allan-Wojtas, P., Hansen, L. T., & Paulson, A. T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *LWT-Food Science and Technology*, 41(1), 101-108.
- Amid, B. T., Mirhosseini, H., Poorazarang, H., & Mortazavi, S. A. (2013). Implications of partial conjugation of whey protein isolate to durian seed gum through maillard reactions: foaming properties, water holding capacity and interfacial activity. *Molecules*, 18(12), 15110-15125.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240-251.
- And, C. I., & Kailasapathy, K. (2005). Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of food science*, 70(1), M18-M23.
- Anekella, K., & Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 17-24.
- Ann, E. Y., Kim, Y., Oh, S., Imm, J. Y., Park, D. J., Han, K. S., & Kim, S. H. (2007). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *International journal of food science & technology*, 42(4), 411-419.

- Ansari, F., Pourjafar, H., Jodat, V., Sahebi, J., & Ataei, A. (2017). Effect of Eudragit S100 nanoparticles and alginate chitosan encapsulation on the viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. *AMB express*, 7(1), 1-8
- Antonelli, A., Cocchi, M., Fava, P., Foca, G., Franchini, G. C., Manzini, D., & Ulrici, A. (2004). Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to wavelet-based classification algorithm. *Analytica Chimica Acta*, 515, 3–13.
- Archacka, M., Białas, W., Dembczyński, R., Olejnik, A., Sip, A., Szymanowska, D., ... & Rogodzińska, M. (2019). Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. *Food chemistry*, 274, 733-742.
- Archacka, M., Białas, W., Dembczyński, R., Olejnik, A., Sip, A., Szymanowska, D., ... & Rogodzińska, M. (2019). Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. *Food chemistry*, 274, 733-742.
- Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019). Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *Lwt*, 99, 583-593.
- Arepally, D., Reddy, R. S., & Goswami, T. K. (2020). Studies on survivability, storage stability of encapsulated spray dried probiotic powder. *Current Research in Food Science*, 3, 235-242.
- Aribah, S. A., Sanjaya, A. P., Muhammad, D. R. A., & Praseptianga, D. (2020). Sensorial and physical properties of chocolate beverage prepared using low fat cocoa powder. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2219, No. 1, p. 070007). AIP Publishing LLC.
- Aryana, K. J., & McGrew, P. (2007). Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *LWT-Food Science and Technology*, 40(10), 1808-1814.
- Atia, A., Gomaa, A., Fliss, I., Beyssac, E., Garrait, G. ve Subirade, M. (2016). Probiyotiklerin kapsüllenmesi için bir prebiyotik matris: fizikokimyasal ve mikrobiyolojik çalışma. *Mikrokapsülleme Dergisi* , 33 (1), 89-101.
- B.R. Bhandari, S. A, E.D. Dumolin, A. Lebert, Dry. Technol. 11 (2007) 1081–1092 Dry. Technol. An Int. Journa.
- Babu, G., Rath, S., & Nithyalakshmi, V. (2011). Internet Journal of Food Safety. *Internet Journal of Food Safety*, 13, 62-68.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., ... & Zhang, H. (2010). Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus fermentum*'un potansiyel probiyotik özelliklerinin taranması. *Gıda Kontrolü* , 21 (5), 695-701.
- Barajas-Álvarez, P., González-Ávila, M., & Espinosa-Andrews, H. (2021). Recent Advances in Probiotic Encapsulation to Improve Viability under Storage and Gastrointestinal Conditions and Their Impact on Functional Food Formulation. *Food Reviews International*, 1-22.

- Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Cooper, P., & Petrovsky, N. (2010). Inulin-a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *The Journal of Excipients and Food Chemicals*, 1(3), 27-50.
- Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Cooper, P., & Petrovsky, N. (2016). Inulin-a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 1(3), 1132.
- Barletta, B. J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (1993). An attrition index to assess fines formation and particle size reduction in tapped agglomerated food powders. *Powder technology*, 77(1), 89-93.
- Benković, M., Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., & Bauman, I. (2013). Physical properties of non-agglomerated cocoa drink powder mixtures containing various types of sugar and sweetener. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 1044-1058.
- Bepeyeva, A., de Barros, J. M., Albadran, H., Kakimov, A. K., Kakimova, Z. K., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2017). Encapsulation of *Lactobacillus casei* into calcium pectinate-chitosan beads for enteric delivery. *Journal of food science*, 82(12), 2954-2959.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., & Majkowska, A. (2002). Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*, 35(2-3), 125-131.
- Bosscher, D., Loo, J. V., & Franck, A. (2006). Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. *Nutrition Research Reviews*, 19(02), 216-226.
- Braber, N. V., Vergara, L. D., Rossi, Y. E., Aminahuel, C. A., Mauri, A. N., Cavaglieri, L. R., & Montenegro, M. A. (2020). Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, 118, 108844.
- Briones, V., & Aguilera, J. M. (2005). Image analysis of changes in surface color of chocolate. *Food research international*, 38(1), 87-94.
- Bron, P. A., Marco, M., Hoffer, S. M., Van Mullekom, E., De Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2004). Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 7829-7835. <https://doi.org/10.1128/JB.186.23.7829-7835.2004>.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering*, 104(4), 467-483.
- Calabuig-Jiménez, L., Betoret, E., Betoret Valls, N., Patrignani, F., Barrera Puigdollers, C., Seguí Gil, L., ... & Dalla Rosa, M. (2019). High pressures homogenization (HPH) to

- microencapsulate *L. salivarius* spp. *salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and in vitro digestion. *Journal of Food Engineering*, 240, 43-48.
- Călinoiu, L. F., Ștefănescu, B. E., Pop, I. D., Muntean, L., & Vodnar, D. C. (2019). Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation. *Coatings*, 9(3), 194.
- Carr, R.L. (1965), "Evaluating flow properties of solids", Chemical Engineering, Vol. 72 No. 2, pp. 163-168.
- Carvalho AS, Silva J, Hob P, Teixeira P, Xavier M, Malcata F, Gibbs P (2003). Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Le Lait* 83(3):203-210.
- Chaturvedi, S., Khartad, A., & Chakraborty, S. (2021). The potential of non-dairy synbiotic instant beverage powder: Review on a new generation of healthy ready-to-reconstitute drinks. *Food Bioscience*, 101195.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & del Carmen Villarán, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International journal of food microbiology*, 142(1-2), 185-189.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & del Carmen Villarán, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International journal of food microbiology*, 142(1-2), 185-189.
- Chávez, B. E., & Ledebor, A. M. (2007). Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying technology*, 25(7-8), 1193-1201.
- Chen, H., Ouyang, W., Lawuyi, B., Martoni, C., & Prakash, S. (2005). Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 75(4), 917-927.
- Chen, H., Zhao, C., Li, J., Hussain, S., Yan, S., & Wang, Q. (2018). Effects of extrusion on structural and physicochemical properties of soluble dietary fiber from nodes of lotus root. *Lwt*, 93, 204-211.
- Chen, K. N., Chen, M. J., Liu, J. R., Lin, C. W., & Chiu, H. Y. (2005). Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of food science*, 70(5), M260-M266.
- Collins, J. K., Thornton, G., & Sullivan, G. O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International dairy journal*, 8(5-6), 487-490.
- Collins, M. D., Phillips, B. A., & Zannoni, P. (1989). Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and

- subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(2), 105-108.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2014). Micro-encapsulation of a synbiotic into PLGA/alginate multiparticulate gels. *International journal of pharmaceutics*, 466(1-2), 400-408.
- Corcoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J. Appl. Microbiol.* 96:1024-1039.
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Dockery, P., & Stanton, C. (2006). Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5104-5107.
- Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L., & Augustin, M. (2006). Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 2280-2282.
- Çam, M., & Aaby, K. (2010). Optimization of extraction of apple pomace phenolics with water by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9103-9111.
- D.A. Botrel, I.C.B. Rodrigues, H.J.B. de Souza, R.V. de B. Fernandes, Application of inulin in thin-layer drying process of araticum (*Annona crassiflora*) pulp, *LWT Food Sci. Technol.* 69 (2016) 32–39, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.018>
- da Conceição, R. C. N., Batista, R. D., Zimmer, F. M. D. A. L., Trindade, I. K. M., de Almeida, A. F., & do Amaral Santos, C. C. A. (2021). Effect of co-encapsulation using a calcium alginate matrix and fructooligosaccharides with gelatin coating on the survival of *Lactobacillus paracasei* cells. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-10.
- da Silva Guedes, J., Pimentel, T. C., Diniz-Silva, H. T., da Cruz Almeida, E. T., Tavares, J. F., de Souza, E. L., ... & Magnani, M. (2019). Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. *LWT*, 116, 108496.
- da Silva, T. M., Lopes, E. J., Codevilla, C. F., Cichoski, A. J., de Moraes Flores, É. M., Motta, M. H., ... & de Menezes, C. R. (2018). Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying. *LWT*, 90, 412-417.
- Darjani, P., Nezhad, M. H., Kadkhodaei, R., & Milani, E. (2016). Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, 73, 162-167.
- Darjani, P., Nezhad, M. H., Kadkhodaei, R., & Milani, E. (2016). Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, 73, 162-167.

- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*, 36(8), 981-1014.
- de Araújo Etchepare, M., Raddatz, G. C., de Moraes Flores, É. M., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Barin, J. S., ... & de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 511-517.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International dairy journal*, 20(4), 292-302.
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Preparation and characterization of drug-loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying. *Drug development research*, 64(2), 114-128.
- Desmond C, Ross RP, O'Callaghan E, Fitzgerald G, Stanton C (2002). Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J. Appl. Microbiol.* 93:1003-1011.
- Dimitrellou, D., Kandylis, P., Lević, S., Petrović, T., Ivanović, S., Nedović, V., & Kourkoutas, Y. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in alginate capsules for probiotic fermented milk production. *LWT*, 116, 108501.
- Ding WK, Shah NP (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *J. Food Sci.* 72(9):446-450.
- Ding, H., Li, B., Boiarkina, I., Wilson, D. I., Yu, W., & Young, B. R. (2020). Effects of morphology on the bulk density of instant whole milk powder. *Foods*, 9(8), 1024.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of food science*, 72(9), M446-M450.
- Do Carmo, M. M. R., Walker, J. C. L., Novello, D., Caselato, V. M., Sgarbieri, V. C., Ouwehand, A. C., ... & Dos Santos, E. F. (2016). Polydextrose: Physiological function, and effects on health. *Nutrients*, 8(9), 553.
- Dogan, M., Aslan, D., Aktar, T., & Sarac, M. G. (2016). A methodology to evaluate the sensory properties of instant hot chocolate beverage with different fat contents: multi-criteria decision-making techniques approach. *European Food Research and Technology*, 242(6), 953-966.
- Dogan, M., Toker, O. S., & Goksel, M. (2011). Rheological behaviour of instant hot chocolate beverage: Part 1. Optimization of the effect of different starches and gums. *Food Biophysics*, 6(4), 512-518.
- Dogan, M., Toker, O. S., Aktar, T., & Goksel, M. (2013). Optimization of gum combination in prebiotic instant hot chocolate beverage model system in terms of rheological aspect: mixture design approach. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 783-794.

- Doherty SB, Gee VL, Ross RP, Stanton C, Fitzgerald G.F, Brodtkorb A (2011). Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids* 25(6):1604-1617.
- Domian, E., Koper, T., & Lenart, A. (2004). Effect of drying method on instant coffee flowability. *Acta Agrophysica*, 3(3), 425-433.
- Doron, S., & Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S129-S134.
- Dos Reis, S. A., da Conceição, L. L., Siqueira, N. P., Rosa, D. D., da Silva, L. L., & Maria do Carmo, G. P. (2017). Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutrition Research*, 37, 1-19.
- Dotan, I., & Rachmilewitz, D. (2005). Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action. *Current opinion in gastroenterology*, 21(4), 426-430.
- Durchschein, F., Petritsch, W., & Hammer, H. F. (2016). Diet therapy for inflammatory bowel diseases: The established and the new. *World journal of gastroenterology*, 22(7), 2179.
- Edens, F. W. (2003). An alternative for antibiotic se in poultry: probiotics. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5(2), 75-97.
- Eduardo, M. F., Correa De Mello, K. G. P., Polakiewicz, B., & Da Silva Lannes, S. C. (2018). Evaluation of chocolate milk beverage formulated with modified chitosan.
- Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T. R., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. P. (2015). Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, 19, 882-892.
- Eslami, M., Shahedi, M., & Fathi, M. (2018). Development of hydrogels for entrapment of vitamin D3: physicochemical characterization and release study. *Food Biophysics*, 13(3), 284-291.
- Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., & Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 138-155.
- FAO/WHO, Probióticos en los alimentos (2006). Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO alimentación y nutrición, 85:6-11.
- Farias, J. M., Stamford, T. C. M., Resende, A. H. M., Aguiar, J. S., Rufino, R. D., Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2019). Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: an eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. *International journal of biological macromolecules*, 129, 853-860.

- Fávaro-Trindade CS, Grosso CR (2002). Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *J. Microencapsulation* 19(4):485-494.
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45(1), 306-312.
- Fu S, Thacker A, Sperger DM, Boni RL, Buckner IS, Velankar S, Munson EJ, Block LH (2011). Relevance of Rheological Properties of Sodium Alginate in Solution to Calcium Alginate Gel Properties. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 12(2):453-460.
- Gama, A. P., Hung, Y. C., & Adhikari, K. (2019). Optimization of emulsifier and stabilizer concentrations in a model Peanut-Based beverage system: a mixture design approach. *Foods*, 8(4), 116.
- Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 365-371.
- Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 365-371.
- Garcia-Ceja, A., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 482-489.
- Gardiner, G. E., O'sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., ... & Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2605-2612.
- Gåserød, O., Sannes, A., & Skjak-Bræk, R. (1998). Capsules of alginate-chitosan—I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials*, 19, 1815-1825.
- Gbassi GK, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E (2010). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *Int. J. Food Microbiol.* 129:103-105.
- Ghour, Y. A., Richards, D. M., Rahimi, E. F., Krill, J. T., Jelinek, K. A., & DuPont, A. W. (2014). Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental gastroenterology*, 7, 473.

- Gu, M., Zhang, Z., Pan, C., Goulette, T. R., Zhang, R., Hendricks, G., ... & Xiao, H. (2019). Encapsulation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G7 in gastroprotective microgels: Improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 91, 283-289.
- Guerin, J., Petit, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Perroud, C., ... & Gaiani, C. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *Journal of Food Engineering*, 193, 10-19.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X. M., & Zhang, H. P. (2009). In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT-Food Science and Technology*, 42(10), 1640-1646.
- Guo, Z., Yang, X., Sun, F., Jiang, R., Linn, DE, Chen, H., ... & Qiu, Y. (2009). Yeni bir androjen reseptörü ek varyantı, prostat kanseri ilerlemesi sırasında yukarı regüle edilir ve androjen tükenmesine dirençli büyümeyi destekler. *Kanser araştırması* , 69 (6), 2305-2313.
- Han, F., Zhou, F., Yang, X., Zhao, J., Zhao, Y., & Yuan, X. (2015). A pilot study of conically graded chitosan–gelatin hydrogel/PLGA scaffold with dual-delivery of TGF- β 1 and BMP-2 for regeneration of cartilage–bone interface. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 103(7), 1344-1353.
- Han, Y. J., & Tran, T. T. T. (2018). Corn snack with high fiber content: effects of different fiber types on the product quality. *LWT*, 96, 1-6.
- Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., & Paulson, A. T. (2002). Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food microbiology*, 19(1), 35-45.
- Hausner, H.H. (1967), “Friction conditions in a mass of metal powder”, *International Journal of Powder Metallurgy*, Vol. 3 No. 4 pp. 7-13
- Heidebach T, Forst P, Kulozik U (2009). Transglutaminase - induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *Int. Dairy J.* 19:77-84.
- Heidebach T, Forst P, Kulozik U (2010). Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotics cells. *J. Food Eng.* 98:309-316.
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(4), 291-311.
- Hessle, C., Hanson, L. Å., & Wold, A. E. (1999). *Lactobacilli* from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clinical and experimental immunology*, 116(2), 276.
- Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Nunes, G. L., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., & de Menezes, C. R. (2016). Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 302-308.

- Horwitz, W., & Latimer, G. W. (2000). AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.
- Horwitz, W., & Latimer, G. W. (2007). Official methods of analysis of AOAC International, 2000. Gaithersburg, Maryland.
- Hotel, A. C. P., & Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), 1-10.
- Hou RC, Lin MY, Wang MM, Tzen JT (2003). Increase of Viability of Entrapped Cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in Artificial Sesame Oil Emulsions. *J. Dairy Sci.* 86:424-428.
- Huang, L., Abdel-Hamid, M., Romeih, E., Zeng, Q. K., Yang, P., Walker, G., & Li, L. (2020). Textural and organoleptic properties of fat-free buffalo yogurt as affected by polydextrose. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 1-8.
- Izydorczyk, M., Cui, S. W., & Wang, Q. (2005). Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications. *Food carbohydrates: Chemistry, physical properties, and applications*, 293, 299.
- İnternet: Jordibordas Ulam.URL: <https://www.jordibordas.com/en/blog/2019/05/28/10-most-frequently-asked-questions-about-inulin/> Son Erişim Tarihi: 22.10.2021
- Jankovic I, Sybesma W, Phothirath P, Ananta E, Mercenier A (2010). Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Curr. Opin Biotechnol.* 21:175-181.
- Jantarathin, S., Borompichaichartkul, C., & Sanguandeeikul, R. (2017). Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings*, 4(5), 6166-6172.
- Jantarathin, S., Borompichaichartkul, C., & Sanguandeeikul, R. (2017). Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings*, 4(5), 6166-6172.
- Jantzen, M., Göpel, A., & Beermann, C. (2013). Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), 1029-1036.
- Jayeola, C. O., & Akinwale, T. O. (2002). Utilization of kolanut and cocoa in beverage production. *Nutrition & Food Science*.
- Ji, R., Wu, J., Zhang, J., Wang, T., Zhang, X., Shao, L., ... & Wang, J. (2019). Extending viability of *Bifidobacterium longum* in chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology. *Frontiers in microbiology*, 10, 1389.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Ali MA, Jalaludin S (1998). Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 70:197-209.

- Jinapong, N., Supphantharika, M., & Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of food engineering*, 84(2), 194-205.
- Johansen, A., & Schæfer, T. (2001). Effects of interactions between powder particle size and binder viscosity on agglomerate growth mechanisms in a high shear mixer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 297-309
- Kailasapathy K (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Lebensmittelwissenschaft und-Technologie* 39:1221-1227.
- Kalita, D., Saikia, S., Gautam, G., Mukhopadhyay, R., & Mahanta, C. L. (2018). Characteristics of synbiotic spray dried powder of litchi juice with *Lactobacillus plantarum* and different carrier materials. *LWT*, 87, 351-360.
- Kamalian, N., Mirhosseini, H., Mustafa, S., & Abd Manap, M. Y. (2014). Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. *Carbohydrate polymers*, 111, 700-706.
- Khoramnia A, Abdullah N, Liew SL, Sieo CC, Ramasamy K, Ho YW (2011). Enhancement of viability of a probiotic *Lactobacillus* strain for poultry during freeze-drying and storage using the response surface methodology. *Anim. Sci. J.* 82:127-135.
- Kim, J. U., Kim, B., Shahbaz, H. M., Lee, S. H., Park, D., & Park, J. (2017). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by ionic gelation with electrostatic extrusion for enhancement of survival under simulated gastric conditions and during refrigerated storage. *International journal of food science & technology*, 52(2), 519-530.
- Koç, B., & Kaymak-Ertekin, F. (2010). Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. *Gıda*, 35(1), 1-8.
- Konar, N. (2013). Influence of conching temperature and some bulk sweeteners on physical and rheological properties of prebiotic milk chocolate containing inulin. *European Food Research and Technology*, 236(1), 135-143.
- Koo, S. M., Cho, Y. H., Huh, C. S., Baek, Y. J., & Park, J. Y. (2001). Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(3), 376-383.
- Kos, B. S. J. G. J. M. S., Šušković, J., Goreta, J., & Matošić, S. (2000). Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology*, 38(2), 121-127.
- Krasaekoopt W, Bhandari W, Deeth H (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* 13:3-13.
- Krasaekoopt W, Bhandari W, Deeth H (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 14:737-743.

- Krasaekoopt W, Bhandari W, Deeth H (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT - Food Sci. Technol.* 39:177-183.
- Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 761-766.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International dairy journal*, 14(8), 737-743.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International dairy journal*, 14(8), 737-743.
- Kumar, A., Misra, P., & Dube, A. (2013). Amplified fragment length polymorphism: an adept technique for genome mapping, genetic differentiation, and intraspecific variation in protozoan parasites. *Parasitology research*, 112(2), 457-466.
- Kumar, P., Jeon, M. Y., Tsapatsis, M., & Mkhoyan, K. A. (2017). Early Growth Stages of Directly Synthesized Large-Area Zeolite Nanosheets. *Microscopy and Microanalysis*, 23(S1), 1986-1987.
- Lee, S., Jang, D. H., Choi, H. J., & Park, Y. S. (2013). Optimization of soymilk fermentation by the protease-producing *Lactobacillus paracasei*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 45(5), 571-577.
- Liserre, A.M.; Ré, M.I.; Franco, B.D.G.M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in Modified Alginate-chitosan Beads and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Food Biotechnol.* 2007, 21, 1–16. [CrossRef]
- Lotfipour, F., Mirzaeei, S., & Maghsoodi, M. (2012). Evaluation of the effect of CaCl₂ and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 2(1), 71.
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2020). Microencapsulation of Pineapple Peel Extract by Spray Drying Using Maltodextrin, Inulin, and Arabic Gum as Wall Matrices. *Foods*, 9(6), 718.
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2020). Microencapsulation of Pineapple Peel Extract by Spray Drying Using Maltodextrin, Inulin, and Arabic Gum as Wall Matrices. *Foods*, 9(6), 718.
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International dairy journal*, 11(1-2), 1-17.

- Loyeau, P. A., Spotti, M. J., Braber, N. V., Rossi, Y. E., Montenegro, M. A., Vinderola, G., & Carrara, C. R. (2018). Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 using whey proteins and dextrans conjugates as wall materials. *Food Hydrocolloids*, 85, 129-135.
- M. Mathlouthi, B. Rogé, Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders, *Food Chem.* 82 (2003) 61–71, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00534-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00534-4).
- Makras, L., Van Acker, G., & De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700: 2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6531-6537.
- Malakar, J., & Nayak, A. K. (2012). Formulation and statistical optimization of multiple-unit ibuprofen-loaded buoyant system using 23-factorial design. *Chemical Engineering Research and Design*, 90(11), 1834-1846.
- Malmo, C., Giordano, I., & Mauriello, G. (2021). Effect of Microencapsulation on Survival at Simulated Gastrointestinal Conditions and Heat Treatment of a Non Probiotic Strain, *Lactiplantibacillus plantarum* 48M, and the Probiotic Strain *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938. *Foods*, 10(2), 217.
- Mandal, S., Puniya, A. K., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16(10), 1190-1195.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 15-25.
- Mi, F. L., Sung, H. W., & Shyu, Sh. (2002). Drug release from alginate-chitosan reinforced by a naturally accruing cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers*, 48, 61–72
- Moayyedi, M., Eskandari, M. H., Rad, A. H. E., Ziaee, E., Khodaparast, M. H. H., & Golmakani, M. T. (2018). Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of functional foods*, 40, 391-399.
- Mohamad Zen, N. I., Abd Gani, S. S., Shamsudin, R., & Fard Masoumi, H. R. (2015). The use of D-optimal mixture design in optimizing development of okara tablet formulation as a dietary supplement. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Molan, A. L., Flanagan, J., Wei, W., & Moughan, P. J. (2009). Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chemistry*, 114(3), 829-835.
- Molin, G., Jeppsson, B., Johansson, M. L., Ahrné, S., Nobaek, S., Ståhl, M., & Bengmark, S. (1993). Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and

- diseased mucosa of the human intestines. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(3), 314-323.
- Morales, M. E., & Ruiz, M. A. (2016). Microencapsulation of probiotic cells: applications in nutraceutical and food industry. *Nutraceuticals*, 1, 627-668.
- Morr, C. V., German, B., Kinsella, J. E., Regenstein, J. M., Buren, J. P. V., Kilara, A., et al. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50, 1715–1719
- Mortazavian, A. M., Azizi, A., Ehsani, M. R., Razavi, S. H., Mousavi, S. M., Sohrabvandi, S., & Reinheimer, J. A. (2008). Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft*, 63(4), 427.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms.
- Muhammad, D. R. A., Kongor, J. E., & Dewettinck, K. (2020). Investigating the effect of different types of cocoa powder and stabilizers on suspension stability of cinnamon-cocoa drink. *Journal of Food Science and Technology*, 1-9.
- Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P., & Holley, R. A. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of food science*, 71(1), M20-M24.
- Nami, Y., Lornezhad, G., Kiani, A., Abdullah, N., & Haghshenas, B. (2020). Alginate-Persian Gum-Prebiotics microencapsulation impacts on the survival rate of *Lactococcus lactis* ABRIINW-N19 in orange juice. *LWT*, 124, 109190.
- Nayak, M. R., Nayak, C. K., & Rout, P. K. (2012). Application of multi-objective teaching learning based optimization algorithm to optimal power flow problem. *Procedia Technology*, 6, 255-264.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 182-186.
- Ndoye B, Weekers F, Diawarad B, Tidiane-Guirob A, Thonarta P (2007). Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Subsaharan Africa. *J. Food Eng.* 79:1374-1382.
- Okuro, P. K., Thomazini, M., Balieiro, J. C., Liberal, R. D., & Fávoro-Trindade, C. S. (2013). Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food Research International*, 53(1), 96-103.
- O'Riordan K, Andrews D, Buckle K, Conway P (2001). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *J. Appl. Microbiol.* 91:1059-1066.

- Ortakci, F. A. T. İ. H., & Sert, S. (2012). Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *Journal of dairy science*, 95(12), 6918-6925.
- Ortakçı, F. (2010). Probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonla sağlığa yararlı etkilerinin artırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Erzurum, Türkiye, 50s.
- Ostrowska-Ligęza, E., & Lenart, A. (2000). Effect of water activity on mechanical properties of cacao powders. In *Materials from XI seminar properties of water in foods*, Kudowa Zdrój (pp. 60-72).
- Ostrowska-Ligęza, E., & Lenart, A. (2015). Influence of water activity on the compressibility and mechanical properties of cocoa products. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 1054-1060.
- Ouwehand, A. C., & Salminen, S. J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 8(9), 749-758.
- Ov, Zeng ZP, Jiang JG (2011). Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids* 25(6):1596-1603.
- Özdemir, E. E., Görgüç, A., Gençdağ, E., & Yılmaz, F. M. (2021). Püskürtmeli Kurutma ve Dondurarak Kurutma Yöntemlerinin Temelleri ve Bu Yöntemler ile Gıda Atıklarından Toz Ürünlerin Üretimi. *Gıda*, 46(3), 583-607.
- Özkul, H. (2016). Süt orjinli *Lactococcus lactis* izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi ve identifikasyonu (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Pantoflickova D, Corthésy-Theulaz I, Dorta G, Stolte M, Isler P, Rochat F, Enslen M, Blum AL (2003). Favourable effect of regular intake of fermented milk containing *Lactobacillus johnsonii* on *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Alim. Pharmacol. Therapeutics* 18:805-813.
- Parra-Huertas RA (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(2):5669-5684.
- Picot A, Lacroix C (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. Dairy J.* 14:505-515.
- Plessas, S., Alexopoulos, A., Bekatorou, A., & Bezirtzoglou, E. (2012). Kefir immobilized on corn grains as biocatalyst for lactic acid fermentation and sourdough bread making. *Journal of food science*, 77(12), C1256-C1262.
- Poddar, D., Das, S., Jones, G., Palmer, J., Jameson, G. B., Haverkamp, R. G., & Singh, H. (2014). Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by the drying method. *International Dairy Journal*, 39(1), 1-7.

- Pradeep Prasanna, P. H., & Charalampopoulos, D. (2019). Encapsulation in an alginate–goats’ milk–inulin matrix improves survival of probiotic *Bifidobacterium* in simulated gastrointestinal conditions and goats’ milk yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 132-141.
- Pradeep Prasanna, P. H., & Charalampopoulos, D. (2019). Encapsulation in an alginate–goats’ milk–inulin matrix improves survival of probiotic *Bifidobacterium* in simulated gastrointestinal conditions and goats’ milk yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 132-141.
- Prakash, S., & Jones, M. L. (2005). Artificial cell therapy: New strategies for the therapeutic delivery of live bacteria. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2005(1), 44-56.
- Prakash, S., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., & Cantor, A. (2011). The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Qi, X., Simsek, S., Chen, B., & Rao, J. (2020). Alginate-based double-network hydrogel improves the viability of encapsulated probiotics during simulated sequential gastrointestinal digestion: Effect of biopolymer type and concentrations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1675-1685.
- Quek, S. Y., Chok, N. K., & Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), 386-392.
- Quigley E (2010). Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharm. Res.* 61:213-218. Qv XY,
- Quigley, E. M. (2010). Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological research*, 61(3), 213-218.
- Patilea, V., & Sanchez-Sellero, C. (2020). Testing for lack-of-fit in functional regression models against general alternatives. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 209, 229-251.
- Raise, A., Dupont, S., Iaconelli, C., Caliri, C., Charriau, A., Gervais, P., ... & Beney, L. (2020). Comparison of two encapsulation processes to protect the commensal gut probiotic bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* from the digestive tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101608.
- Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 773-780.
- Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 773-780.

- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S., & Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein–alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 891-898.
- RAMÍREZ-SUCRE, M. O., & VÉLEZ-RUIZ, J. F. (2011). The physicochemical and rheological properties of a milk drink flavoured with cajeta, a Mexican caramel jam. *International journal of dairy technology*, 64(2), 294-304.
- Reddy, C. K., Suriya, M., & Haripriya, S. (2013). Physico-chemical and functional properties of Resistant starch prepared from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*. L) starch by enzymatic method. *Carbohydrate polymers*, 95(1), 220-226.
- Ricci, A., Cirlini, M., Levante, A., Dall'Asta, C., Galaverna, G., & Lazzi, C. (2018). Volatile profile of elderberry juice: Effect of lactic acid fermentation using *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *L. casei* strains. *Food research international*, 105, 412-422.
- Ricci, G., Borgo, F., Ferrario, C., & Fortina, M. (2011). Cocoa powder as delivery medium for probiotic *Lactobacillus* strains. *Advances in Microbiology*, 1(1), 1-6.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications-a narrative review. *Food Res. Int*, 137(109682.10), 1016.
- Rodrigues, F. J., Omura, M. H., Cedran, M. F., Dekker, R. F., Barbosa-Dekker, A. M., & Garcia, S. (2017). Effect of natural polymers on the survival of *Lactobacillus casei* encapsulated in alginate microspheres. *Journal of microencapsulation*, 34(5), 431-439.
- Rogan, W. J., Gladen, B. C., Hung, K. L., Koong, S. L., Shih, L. Y., Taylor, J. S., ... & Hsu, C. C. (1988). Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science*, 241(4863), 334-336.
- Rosas-Ledesma, P., León-Rubio, J. M., Alarcón, F. J., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2012). Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research*, 43(1), 106-116.
- Rosmini MR, Sequeira GJ, Guerrero-Legarreta I, Marti LE, Dalla – Santana R, Frizzo L, Bonazza JC. (2004). Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3:181-191.
- Saarela, M., Hallamaa, K., Mattila-Sandholm, T., & Mättö, J. (2003). The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy Journal*, 13(4), 291-302.

- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.
- Samakradhamrongthai, R. S., Angeli, P. T., Kopermsub, P., & Utama-Ang, N. (2019). Optimization of gelatin and gum arabic capsule infused with pandan flavor for multi-core flavor powder encapsulation. *Carbohydrate polymers*, 226, 115262.
- Santos, M. A., & Machado, M. T. (2020). Coated alginate–chitosan particles to improve the stability of probiotic yeast. *International Journal of Food Science & Technology*.
- Sarabandi, K., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., & Mohammadi, A. (2019). Application of gum Arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source. *International journal of biological macromolecules*, 140, 59-68..
- Sathyabama, S., & Vijayabharathi, R. (2014). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 419-425.
- Schneeman, B. O. (2002). Gastrointestinal physiology and functions. *British Journal of Nutrition*, 88(S2), S159-S163.
- Schubert, H. (1987). Food particle technology. Part I: Properties of particles and particulate food systems. *Journal of food engineering*, 6(1), 1-32.
- Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, Levin-Brener L, Gurevich N, Shimoni E (2010). Micro-encapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Res. Int.* 43:193-202.
- Semyonov, D., Ramon, O., Kovacs, A., Friedlander, L., & Shimoni, E. (2012). Air-suspension fluidized-bed microencapsulation of probiotics. *Drying Technology*, 30(16), 1918-1930.
- Serrano-Casas, V., Pérez-Chabela, M. L., Cortés-Barberena, E., & Totosa, A. (2017). Improvement of lactic acid bacteria viability in acid conditions employing agroindustrial co-products as prebiotic on alginate ionotropic gel matrix co-encapsulation. *Journal of Functional Foods*, 38, 293-297.
- Shafizadeh, A., Golestan, L., Ahmadi, M., Darjani, P., & Ghorbani-HasanSaraei, A. (2020). Encapsulation of *Lactobacillus casei* in alginate microcapsules: improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions using flaxseed mucilage. *Journal of food measurement and characterization*, 14(4), 1901-1908.
- Shah, N. P., & Ravula, R. R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(3), 139.
- Shittu, T. A., & Lawal, M. O. (2007). Factors affecting instant properties of powdered cocoa beverages. *Food Chemistry*, 100(1), 91-98.

- Shu, G., Wang, Z., Chen, L., Wan, H., & Chen, H. (2018). Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. *LWT*, 90, 70-76.
- Silva J, Carvalho AS, Teixeira P, Gibbs PA (2002). Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters Appl. Microbiol.* 34:77-81.
- Silva, M. P., Tulini, F. L., Ribas, M. M., Penning, M., Fávaro-Trindade, C. S., & Poncelet, D. (2016). Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei* BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes. *Food Research International*, 89, 582-590.
- Simpson NE, Stabler CL, Simpson CP, Sambanis A, Constantinidis I (2004). The role of the CaCl₂-guluronic acid interaction on alginate encapsulated TC3 β cells. *Biomaterials* 25: 2603-2610.
- Šipailienė, A., & Petraitytė, S. (2018). Encapsulation of probiotics: proper selection of the probiotic strain and the influence of encapsulation technology and materials on the viability of encapsulated microorganisms. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(1), 1-10.
- Smokvina, T., Wels, M., Polka, J., Chervaux, C., Brisse, S., Boekhorst, J., ... & Siezen, R. J. (2013). *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. *PloS one*, 8(7), e68731.
- Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., Bostrom, T., & Bhandari, B. (2011). Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 162-168.
- Sørensen, I. H. (1978). Analytical methods for dry milk products.
- Soto LP, Frizzo LS, Avataneo E, Zbrun MV, Bertozzi E, Sequeira G, Signorini ML, Rosminia MR (2011). Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Anim. Sci. Technol.* 165:176-183.
- Sousa, S., Gomes, A. M., Pintado, M. M., Silva, J. P., Costa, P., Amaral, M. H., ... & Freitas, A. C. (2015). Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food and Bioprocesses*, 93, 90-97.
- Srisuvor, N.; Chinprahast, N.; Prakitchaiwattana, C.; Subhimaros, S. Effects of Inulin and Polydextrose on Physicochemical and Sensory Properties of Low-fat Set Yoghurt with Probiotic-cultured Banana Purée. *LWT - Food Sci. Technol.* 2013, 51(1), 30–36. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.10.018.
- Stępień, A., Witczak, M., & Witczak, T. (2020). Moisture sorption characteristics of food powders containing freeze dried avocado, maltodextrin and inulin. *International journal of biological macromolecules*, 149, 256-261.

- Su, R., Zhu, X. L., Fan, D. D., Mi, Y., Yang, C. Y., & Jia, X. (2011). Encapsulation of probiotic *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920 with alginate–human-like collagen and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *International journal of biological macromolecules*, 49(5), 979-984.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3), 257-272.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & 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(1-2), 47-55.
- Surono, I., Verhoeven, J., Verbruggen, S., & Venema, K. (2018). Microencapsulation increases survival of the probiotic *Lactobacillus plantarum* IS-10506, but not *Enterococcus faecium* IS-27526 in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the upper gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*, 124(6), 1604-1609.
- Suryabhan, P., Lohith, K., & Anu-Appaiah, K. A. (2019). Sucrose and sorbitol supplementation on maltodextrin encapsulation enhance the potential probiotic yeast survival by spray drying. *LWT*, 107, 243-248.
- Tan, S., Zhong, C. ve Langrish, T. (2019). Kontrollü salım için püskürtülerek kurutulmuş WPI (peynir altı suyu protein izolatları) matrislerinde pepsin mikrokapsüllemesi. *Gıda mühendisliği dergisi*, 263, 147-154.
- Teoh, P. L., Mirhosseini, S. H., Mustafa, S., & Manap, M. Y. A. (2011). Tolerance of free and encapsulated probiotics towards heat treatment and high sodium concentration. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(1), 69-73.
- Tiefenbacher, K. F., & Tiefenbacher, K. F. (2017). Technology of Main Ingredients Sweeteners and Lipids. *Wafer and Waffle*, 123-225.
- Toker, S., & Moseley, J. L. (2013). The mental model comparison of expert and novice performance improvement practitioners. *Performance Improvement Quarterly*, 26(3), 7-32.
- Trabelsi, D., & Mhamdi, R. (2013). Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *BioMed research international*, 2013.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225-241.
- Varankovich, N., Martinez, M. F., Nickerson, M. T., & Korber, D. R. (2017). Survival of probiotics in pea protein-alginate microcapsules with or without chitosan coating during storage and in a simulated gastrointestinal environment. *Food science and biotechnology*, 26(1), 189-194.
- Vaziri, A. S., Alemzadeh, I., Vossoughi, M., & Khorasani, A. C. (2018). Co-microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites. *Carbohydrate polymers*, 199, 266-275.

- Veena, N., Nath, S., & Arora, S. (2016). Polydextrose as a functional ingredient and its food applications: a review. *Indian Journal of Dairy Science*, 69(3), 239-251.
- Vega C, Roos YH (2006). Invited Review: Spray-Dried Dairy and Dairy- Like Emulsions—Compositional Considerations. *J. Dairy Sci.* 89:383-401.
- Viazis, N., Keyoglou, A., Kanellopoulos, A. K., Karamanolis, G., Vlachogiannakos, J., Triantafyllou, K., ... & Karamanolis, D. G. (2012). Selective serotonin reuptake inhibitors for the treatment of hypersensitive esophagus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *American Journal of Gastroenterology*, 107(11), 1662-1667.
- Vickers, N. J. (2017). Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. *Current biology*, 27(14), R713-R715.
- Vissotto, F. Z., Jorge, L. C., Makita, G. T., Rodrigues, M. I., & Menegalli, F. C. (2010). Influence of the process parameters and sugar granulometry on cocoa beverage powder steam agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 97(3), 283-291.
- Vissotto, F. Z., Montenegro, F. M., Santos, J. M. D., & Oliveira, S. J. R. D. (2006). Avaliação da influência dos processos de lecitinação e de aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. *Food Science and Technology*, 26(3), 666-671.
- Vodnar, D. C., & Socaciu, C. (2012). Green tea increases the survival yield of Bifidobacteria in simulated gastrointestinal environment and during refrigerated conditions. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 1-8.
- Vodnar, D. C., & Socaciu, C. (2014). Selenium enriched green tea increase stability of Lactobacillus casei and Lactobacillus plantarum in chitosan coated alginate microcapsules during exposure to simulated gastrointestinal and refrigerated conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 406-411.
- Vodnar, D. C., Socaciu, C., Rotar, A. M., & Stănilă, A. (2010). Morphology, FTIR fingerprint and survivability of encapsulated lactic bacteria (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) in simulated gastric juice and intestinal juice. *International journal of food science & technology*, 45(11), 2345-2351.
- Qin, Y., Jiang, J., Zhao, L., Zhang, J., & Wang, F. (2018). Applications of alginate as a functional food ingredient. In *Biopolymers for food design* (pp. 409-429). Academic Press.
- Wang, S., Ahmadi, S., Nagpal, R., Jain, S., Mishra, S. P., Kavanagh, K., ... & Yadav, H. (2020). Lipoteichoic acid from the cell wall of a heat killed *Lactobacillus paracasei* D3-5 ameliorates aging-related leaky gut, inflammation and improves physical and cognitive functions: from *C. elegans* to mice. *Geroscience*, 42(1), 333-352.
- Ward, L. J. H., & Timmins, M. J. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 90-92.

- Wu, Y., & Zhang, G. (2018). Synbiotic encapsulation of probiotic *Latobacillus plantarum* by alginate-arabinoxylan composite microspheres. *LWT*, 93, 135-141.
- Yanes, M., Durán, L., & Costell, E. (2002). Effect of hydrocolloid type and concentration on flow behaviour and sensory properties of milk beverages model systems. *Food hydrocolloids*, 16(6), 605-611.
- Yañez J, Salazar J, Montoya L, Chaires J, Jiménez M, Márquez E (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21:313-319.
- Yao, M., Li, B., Ye, H., Huang, W., Luo, Q., Xiao, H., ... & Li, L. (2018). Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 83, 246-252.
- Yeung, T. W., Üçok, E. F., Tiani, K. A., McClements, D. J., & Sela, D. A. (2016). Microencapsulation in alginate and chitosan microgels to enhance viability of *Bifidobacterium longum* for oral delivery. *Frontiers in microbiology*, 7, 494.
- Youssefi, S., Emam-Djomeh, Z., & Mousavi, S. M. (2009). Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in the prediction of quality parameters of spray-dried pomegranate juice. *Drying Technology*, 27(7-8), 910-917.
- Zaeim, D., Sarabi-Jamab, M., Ghorani, B., & Kadkhodae, R. (2019). Double layer co-encapsulation of probiotics and prebiotics by electro-hydrodynamic atomization. *LWT*, 110, 102-109.
- Zanjani, M. A. K., Tarzi, B. G., Sharifan, A., & Mohammadi, N. (2014). Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 13(3), 843.
- Zhao, C., Yin, H., Yan, J., Qi, B., & Liu, J. (2020). Structural and physicochemical properties of soya bean protein isolate/maltodextrin mixture and glycosylation conjugates. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(10), 3315-3326.
- Zuidam NJ, Nedovic VA (2010). *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer. USA. View publication.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Osman YILMAZ

Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

1-) Prebiyotik Bakterilerin Enkapsülasyonu ve İntant Toz Çikolatalı İçecek Üretimi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 2019-2020 (Ulusal).

