

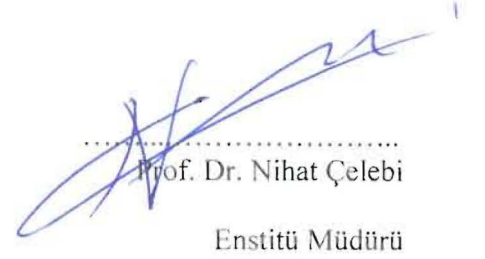
Lactobacillus acidophilus KPb1 ve *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171
PROBİYOTİK KÜLTÜRLERİNİN KOAZERVASYON YÖNTEMİ İLE
KAPLANMASININ VE DONDURMAYA İLAVESİNİN KÜLTÜRLERİN
CANLILIK DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

BUSE YAŞLI

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

EYLÜL 2010

Fen Bilimleri Enstitüsü'nün Onayı


Prof. Dr. Nihat Çelebi
Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinde bir tez olarak gerekli çalışmaları yerine getirdiğini onaylarım.


Prof. Dr. H. Barbaros Özer
Bölüm Başkanı

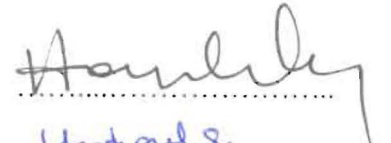
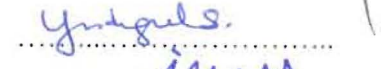
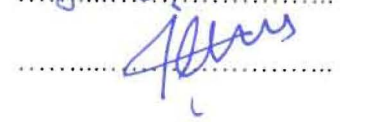
Okuduğumuz bu tezin Yüksek Lisans derecesinde bir tez olarak onaylanması, düşüncemize göre, amaç ve kalite olarak tamamen uygundur.


Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır
Tez Danışmanı

Jüri Üyeleri

İmza

1. Prof. Dr. Hayri Coşkun
2. Doç. Dr. Seyhun Yurdugül
3. Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır

ÖZET

***Lactobacillus acidophilus* KPb1 ve *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 PROBİYOTİK KÜLTÜRLERİNİN KOAZERVASYON YÖNTEMİ İLE KAPLANMASININ VE DONDURMAYA İLAVESİNİN KÜLTÜRLERİN CANLILIK DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Yaşlı, Buse
Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır

Eylül 2010, 85 sayfa

Bu çalışmada *Lactobacillus acidophilus* KPb1 ve *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 probiyotik kültürleri % 2 aljinat + % 2 enzime dirençli mısır nişastası kullanılarak koazervasyon yöntemi ile kaplanmıştır. Elde edilen kapsüllerin boyutları ve salınım özellikleri incelenmiş; kapsüller ve serbest probiyotik kültürlerinin MRS ve RSM sıvı besiyerlerindeki asidifikasyon kinetikleri ve gelişme durumları belirlenmiştir. Araştırmada ayrıca kaplanmış ve serbest kültürler dondurmaya ilave edilerek -18°C’de 3 ay süre ile canlılık düzeyleri ve dondurmanın pH, asitlik, viskozite ve duysal özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Araştırma sonuçlarına göre *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171’in % 2 aljinat+ % 2 enzime dirençli mısır nişastası ile kaplanması sonucu elde edilen kapsüllerin boyutlarının 0,5 - 1 mm arasında olduğu; salınım testinde homojenizasyon işleminin kapsüldeki canlı mikroorganizma sayısı üzerinde olumsuz bir etki göstermediği belirlenmiştir. MRS sıvı ortamındaki asidifikasyon kinetikleri ve gelişme durumları incelendiğinde *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kapsüllerinin pH’yı düşürme hızlarının serbest probiyotik kültürlerle göre daha yavaş olduğu tespit edilmiştir. Kaplanmış kültürlerin gelişme durumlarının ise serbest probiyotik kültürlerle göre daha iyi olduğu; RSM sıvı ortamındaki asidifikasyon kinetikleri ve gelişme durumları incelendiğinde ise *L. acidophilus* KPb1’in kapsül ve serbest formlarının pH’yı düşürme hızları ve ulaştıkları son pH değerleri arasında önemli bir fark olmadığı; *L. reuteri* NRRL B14171 kapsüllerinin pH’yı düşürme hızlarının serbest probiyotik kültürlerle göre daha yavaş olduğu; *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kapsüllerinin RSM sıvı ortamında serbest probiyotik kültürlerle göre daha iyi geliştiği belirlenmiştir. Dondurmaya ilave edilen *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kapsül ve serbest probiyotik kültürlerinin depolama boyunca canlılık düzeyleri incelendiğinde,

kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 probiyotik kültürünün sayısında artış olduğu; serbest *L. acidophilus* KPb1, kaplanmış ve serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 probiyotik kültürlerin sayısında ise azalma meydana geldiği; kaplanmış ve serbest probiyotik kültür ilave edilmesinin dondurmada önemli bir pH ve asitlik değişimine neden olmadığı; viskozite değerlerine bakıldığında depolama sonrasında en fazla viskozite kaybının kontrol grubunda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Depolama öncesi yapılan duyusal analizlerde genel beğeni açısından en yüksek puanı kontrol grubunun aldığı; bunu sırasıyla *L.reuteri* NRRL B-14171 ve *L. acidophilus* KPb1 serbest probiyotik kültürlerinin izlediği; en düşük puanı ise *L. acidophilus* KPb1 kapsüllerini içeren dondurmanın aldığı; depolama sonrasında yapılan duyusal analizlerde ise genel beğeni açısından en yüksek puanı *L.reuteri* NRRL B-14171 serbest probiyotik kültürünü içeren dondurmanın aldığı; bunu sırasıyla *L. acidophilus* KPb1 serbest probiyotik kültür içeren dondurma ve kontrol grubunun izlediği; en düşük puanı ise *L. acidophilus* KPb1 kapsüllerini içeren dondurmanın aldığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *L. acidophilus*, *L. reuteri*, koazervasyon, dondurma, canlılık düzeyi

ABSTRACT

THE EFFECT OF COASERVATION ENCAPSULATION ON THE SURVIVAL RATE OF *Lactobacillus acidophilus* KPb1 AND *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 ADDED IN ICE CREAM

Yaşlı, Buse

M.S., Department of Food Engineering
Supervisor: Assist. Prof. Dr. İbrahim Çakır

September 2010, 85 pages

In this study, *Lactobacillus acidophilus* KPb1 and *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 were coated with 2 % alginate + 2 % Hi- maize resistant corn starch by coacervation technique. Final capsule size and releasing properties were examined; capsules and free probiotic cultures of acidification kinetics and growth cases were determined in MRS and RSM Broth. Also coated and free cultures were added in ice cream and stored at 18°C for 3 months; during storage, pH levels, acidity, viscosity and its effects on sensory properties of ice cream were investigated.

According to the results, the size of capsules were between 0.5 - 1 mm; in the release test, homogenization process does not show a negative effect on the number of live microorganisms in the capsules. *L. acidophilus* KPb1 strain is found to be more stable than *L. reuteri* NRRL B-14171 strain, growth cases and acidification kinetics of *L. acidophilus* KPb1 and *L. reuteri* NRRL B-14171 capsules and free probiotic cultures were examined in MRS Broth. pH reduction ability of *L. acidophilus* KPb1 and *L. reuteri* NRRL B-14171 capsules are slower than free probiotic cultures; growth cases of *L. acidophilus* KPb1 and *L. reuteri* NRRL B-14171 capsules are found to be better than free probiotic cultures; growth cases and acidification kinetics of *L. acidophilus* KPb1 and *L. reuteri* NRRL B-14171 capsules and free probiotic cultures were examined in RSM Broth and pH reduction ability and the final pH value reached of *L. acidophilus* KPb1 capsules and free probiotic cultures are found to be same but pH reduction ability of *L. reuteri* NRRL B-14171 capsules are slower than free *L. reuteri* NRRL B-14171 probiotic cultures. The growth of *L. acidophilus* KPb1 and *L. reuteri* NRRL B-14171 capsules are found to be better than free probiotic cultures. *L. acidophilus* KPb1 and *L. reuteri* NRRL B-14171 capsules and free probiotic cultures were added to ice cream and viability levels were examined throughout the storage; the number of coated *L. acidophilus* KPb1 probiotic culture increased and free *L. acidophilus* KPb1, free and coated *L. reuteri* NRRL B-14171 decreased throughout the storage; coated and free probiotic cultures has been added in to ice cream, didn't cause a significant change in pH and acidity; when compared with the viscosity values after storage of maximum viscosity

loss occurred in the control group. General appreciation of the sensory analysis before storage control group received the highest score following by *L. reuteri* NRRL B-14171 and *L. acidophilus* KPb1 free probiotic cultures respectively, *L. acidophilus* KPb1 capsules received the lowest score; general appreciation of the sensory analysis after storage the ice cream which contain *L. reuteri* NRRL B-14171 free probiotic cultures received the highest score, following by *L. acidophilus* KPb1 free probiotic cultures and control group respectively, *L. acidophilus* KPb1 capsules received the lowest score.

Keywords: *L. acidophilus*, *L. reuteri*, coacervation, ice cream, survival

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmam boyunca yol gösterici olan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır'a; kaplamada kullanılan enzime dirençli mısır nişastasını ve lesitini sağlayan Sayın Yaşar Yazgan'a (Ülker Bisküvi Sanayi A.Ş.); laboratuvar çalışmalarında ve istatistik analizlerinde destek olan Sayın Uzman M. Fatih İşleyen'e ve Sayın Uzman Hülya Yaman'a; çalışmalarım süresince aldığım izinlerde gerekli kolaylığı sağlayan Sayın M. Rıdvan Mendi'ye ve çalışma arkadaşlarıma;

Yüksek lisans çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan, beni maddi ve manevi olarak destekleyen değerli eşim Burak Yaşlı'ya ve Aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Probiyotikler.....	5
2.1.1. Probiyotik Teriminin Anlamı ve Probiyotiklerin Tarihçesi	5
2.1.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar	7
2.1.3. Probiyotik Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikler	9
2.1.4. Probiyotik Etkinin Mekanizması ve Bilimsel Temeli.....	10
2.1.5. Probiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri.....	13
2.1.5.1. Tedavi Edici Etki	14
2.1.5.2. Patojenlerin Kontrol Edilmesindeki Etkileri.....	14
2.1.5.3. Kanser Üzerine Etkisi	15
2.1.5.4. Bağışıklık Üzerine Etkileri.....	16
2.1.5.5. Alerjinin Engellenmesi.....	17
2.1.5.6. Laktoz İntoleransı.....	18
2.1.5.7. Kolesterol Düşürücü Etki.....	18

2.1.6. Probiyotiklerin Güvenilirlik Kriterleri	20
2.2. Mikroenkapsülasyon	21
2.2.1. Mikroenkapsülasyon Teknikleri	21
2.2.2. Probiyotiklerde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları	24
2.3. Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Bazı Materyaller ve Özellikleri.....	31
2.3.1. Kaplama Materyalinde Bulunması Gereken Özellikler	31
2.3.2. Kaplama Materyallerinin Bazı Teknolojik Özellikleri	33
2.3.2.1. Aljinatlar	33
2.3.2.2. Nişasta	34
3. MATERYAL VE YÖNTEM	36
3.1. Materyal	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Bakteri Kültürlerinin Geliştirilmesi ve Peletin Hazırlanması	37
3.2.2. Kaplama Materyalinin Hazırlanması	38
3.2.3. Yağ-Lesitin Çözeltilisinin Hazırlanması	38
3.2.4. Kalsiyum Klorür Çözeltilisinin Hazırlanması	38
3.2.5. Kapsül Yıkama Çözeltilisinin Hazırlanması	39
3.2.6. Koazervasyon Yöntemi ile Bakteri Kültürlerinin Enkapsülasyonu	39
3.2.7. Kapsüldeki Mikroorganizma Sayısının Belirlenmesi	40
3.2.8. Kapsüllerin Boyutlarının Belirlenmesi	40
3.2.9. Kapsüllerden Hücre Salınımı	41
3.2.10. Enkapsüle Edilen Bakterilerin Asidifikasyon Kinetiklerinin Belirlenmesi ...	41
3.2.11. Dondurmaların Hazırlanması ve Kaplanmış Probiyotik İlavesi	42
3.2.11.1. Depolama Boyunca Dondurmaların pH'larının Ölçülmesi.....	43
3.2.11.2. Depolama Süresince Dondurmalarda Asitlik Tayini	43

3.2.11.3. Depolama Süresince Dondurmalarda Probiyotik Bakteri Sayımı.....	43
3.2.11.4. Depolama Süresince Dondurmalarda Viskozite Ölçümü	44
3.2.11.5. Dondurmaların Depolama Öncesi ve Sonrası Duyusal Analiz Sonuçları...	44
3.2.12. İstatistiksel Analizler.....	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	46
4.1. Kapsüldeki Probiyotik Mikroorganizma Sayıları	46
4.2. Kapsül Boyutlarının Belirlenmesi.....	47
4.3. Kapsüllerden Hücre Salınımı	48
4.4. Kaplanmış ve Serbest Kültürlerin Asidifikasyon Kinetiği Sonuçları	50
4.5. Kaplanmış Probiyotik Kültür İçeren Dondurmaların Bazı Özellikleri	55
4.5.1. Depolama Süresince Dondurmalardaki pH Değişimi	55
4.5.2. Depolama Süresince Dondurmalardaki Asitlik Gelişimi	56
4.5.3. Depolama Süresince Dondurmalarda Probiyotik Bakteri Sayımı.....	57
4.5.4. Depolama Süresince Dondurmaların Viskozitelerindeki Değişim	59
4.5.5. Dondurmaların Depolama Öncesi ve Sonrası Duyusal Analiz Sonuçları.....	63
5. SONUÇLAR	71
KAYNAKLAR	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar	7
Çizelge 2. Sindirim sisteminde yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar	11
Çizelge 3. Gıda bileşenlerinin kaplanmasıda kullanılan bazı kaplama materyalleri	31
Çizelge 4. Kapsüllerin içerdikleri probiyotik mikroorganizma sayıları.....	46
Çizelge 5. <i>L. acidophilus</i> KPb1 ve <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 kapsüllerinin boyutları	47
Çizelge 6. Depolama süresince dondurmalarda probiyotik bakteri sayısında meydana gelen değişimler	59
Çizelge 7. Dondurmaların depolama öncesi duyuşal analiz sonuçları (Ortalama±SD)	64
Çizelge 8. Dondurmaların depolama sonrası duyuşal analiz sonuçları (Ortalama±SD)	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>L. acidophilus</i> KPb1 (A, B) ve <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 (C, D) kapsüllerinin mikroskopik görüntüleri.....	48
Şekil 2. <i>L. acidophilus</i> KPb1 ve <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 kapsüllerinden bakteri salınım testi sonuçları	49
Şekil 3. Kaplanmış ve serbest kültürlerin MRS Broth'da gelişme durumu	50
Şekil 4. MRS Brothda asidifikasyon kinetiği pH analiz sonuçları.....	51
Şekil 5. RSM Brothda yapılan asidifikasyon kinetiği analizinde sayım sonuçları	53
Şekil 6. RSM brothda yapılan asidifikasyon kinetiği analizinde ölçülen pH değerleri	54
Şekil 7. Depolama süresince dondurmaların pH değişimleri.....	55
Şekil 8. Depolama süresince dondurmalarındaki asitlik gelişimi	56
Şekil 9. Depolama süresince dondurmaların mikrobiyolojik sayım sonuçları.....	57
Şekil 10. Kaplanmış <i>L. acidophilus</i> KPb1 içeren dondurmanın viskozite sonuçları	60
Şekil 11. Serbest <i>L. acidophilus</i> KPb1 içeren dondurmanın viskozite sonuçları.....	60
Şekil 12. Kaplanmış <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 içeren dondurmanın viskozite sonuçları	61
Şekil 13. Serbest <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 içeren dondurmanın viskozite sonuçları.....	61
Şekil 14. Kontrol/ sade dondurmanın viskozite sonuçları	62
Şekil 15. Dondurma numunelerinin depolama öncesi duyuşal değerlendirme – genel beğeni sonuçları.....	67
Şekil 16. Dondurma numunelerinin depolama sonrası duyuşal değerlendirme – genel beğeni sonuçları.....	70

1. GİRİŞ

Gıda ve sağlık arasında bulunan güçlü ilişki nedeniyle, son yıllarda fonksiyonel gıdalara olan ilgi oldukça artmıştır. Fonksiyonel gıdalar, besleyici etkilerinin yanında ihtiva ettikleri biyoaktif bileşenler ile birçok kronik hastalıklardan korunmada veya tedavilerinde etkili olan, sağlıklı yaşamı teşvik eden gıdalar olarak tanımlanmaktadır (Başyigit 2004; Turgut 2006; Tzortzis ve Vulevic 2009). Fonksiyonel gıdalara yönelik çalışmalar Japonya’da başlamış ve Japonya Sağlık Bakanlığı tarafından fonksiyonel gıdalar FOSHU (Food for Specific Health Use) olarak adlandırılmıştır. Fonksiyonel gıdalarda bulunan biyoaktif bileşenler antioksidanlar, şeker alkoller, glikozitler, diyet lifler, probiyotikler, çoklu doymamış yağ asitleri, prebiyotikler, oligosakkaritler, peptitler, proteinler, kolinler, isoprenoitler ve fitokimyasallardır (Çakır 2005; Turgut 2006; Tzortzis ve Vulevic 2009). Günümüzde gıdalar besleyici özelliklerinin yanında sağlık üzerindeki olumlu etkilerine göre de tercih edilmeye başlanmıştır. Özellikle probiyotik ve prebiyotik içeren ürünlere olan ilgi oldukça artmıştır (Başyigit ve ark. 2005; Roberfroid 2008).

İnsanların bağırsak sisteminde patojen ve patojen olmayan birçok mikroorganizma türü bir arada, denge halinde bulunmaktadır. Sağlıklı bir insanın bağırsak sisteminde bulunan bu denge, olumsuz çevre şartları, stres, düzensiz beslenme, çeşitli ilaçların kullanımı sonucunda patojen mikroorganizmalar lehine bozulabilmektedir. Bu durumda dengenin yeniden sağlanabilmesi için dışarıdan patojen olmayan mikroorganizma desteğine ihtiyaç duyulmaktadır. Konakçının

bağırsak sistemini destekleyerek ve düzenleyerek sağlık üzerine olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar ‘probiyotik’ olarak tanımlanmaktadır. Yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalar, *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait türlerdir (Lee ve Salminen 1995; Çakır 2003; Champagne ve ark. 2005; Crittenden ve ark. 2006; Tzortzis ve Vulevic 2009). Probiyotiklerin etki mekanizmalarından bazıları:

1. Bağırsağa tutunarak patojenlerin mukoza üzerindeki bu tutunma bölgelerine yerleşmesini engellemek
2. Patojenlerin ürettiği oldukları zararlı metabolitlerin parçalanmasını sağlayarak diyareyi önlemek veya azaltmak,
3. Kandaki kolesterol seviyesini düşürücü etki göstermek,
4. Bağışıklık sistemini güçlendirmek,
5. Karsinogenleri parçalayarak kanser yapıcı etkilerini ortadan kaldırmak,
6. Laktoz sindirimini gerçekleştirerek laktoz intoleransı olan bireylerin süt tüketimini sağlamak şeklinde sıralanabilmektedir (Çakır 2003; Rautawa ve Walker 2009). Probiyotik olarak üretilen mikroorganizmalar FDA tarafından GRAS (generally recognized as safe) olarak tanımlanmış mikroorganizmalardır (Lee ve ark.1999). Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak nitelendirilebilmesi için:

1. İnsanların tüketimine sunulacak ürünlerde kullanılan mikroorganizmalar insan orijinli olmalıdır,
2. Sağlığa zarar verici hiçbir yan etkiye sahip olmamalıdır,
3. Kesin tanıları yapılmış olmalıdır,
4. Probiyotiklerin istenilen faydalı etkiyi gösterebilmeleri için bağırsak sistemine ulaştıklarında belli bir sayıda olmaları gerekmektedir bu nedenle mide asitliği ve safra tuzlarına karşı dirençli olmalıdır,

5. Bağırsak epitellerine tutunarak kolonize olmaları gerekmektedir (Çakır 2003; Başyiğit 2004; Wells ve ark. 2008; Collins ve ark. 2009).

Probiyotik içeren ürünler özellikle Uzakdoğu ülkeleri, Japonya ve Avrupa birliğine üye ülkelerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Çakır 2003; Tzortzis ve Vulevic 2009). Probiyotik ürünler mikroorganizmaların enzim, vitamin ve aroma bileşenleri ile beraber doğrudan kapsül veya tablet şekline dönüştürülerek üretilebildiği gibi taşıyıcı bir gıda ortamında da tüketiciye sunulmaktadır (Sanders 1999; Başyiğit 2004; Roberfroid 2008;). Ancak probiyotik mikroorganizma içerikli gıdaların üretilmesini ve geliştirilmesini kısıtlayan bazı engeller bulunmaktadır. Bunlar;

1. Gıdaların işlenmesi sırasında uygulanan yüksek sıcaklık ve basınç, dondurma, kurutma, asidik veya alkali ortam gibi teknolojik işlemlerden kaynaklanan engeller,
2. Tüketiminden sonra sindirim enzimleri, yüksek asidik ortam ve safra tuzları gibi konakçı metabolizmasından kaynaklanan engeller,
3. Oksijen, sıcaklık ve pH değişimleri sonucu oluşan stres, anaerobik gelişme koşulları, zengin besin maddeleri gereksinimi gibi mikroorganizmadan kaynaklanan engellerdir.

Probiyotik gıda üretiminde karşılaşılan bu engellerin kaldırılması ile ilgili kapsamlı araştırmalar yapılması gerekmektedir (Desmond ve ark. 2004; Champagne ve ark. 2005; Champagne 2009; Meiners 2009).

Gıda üretiminde kullanılan probiyotik mikroorganizmalar genellikle dondurulmuş veya dondurularak kurutulmuş toz veya sıvı formda üretilmektedir. Ancak probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin birçoğu, püskürterek

kurutma esnasında sıcaklık ve ozmotik basıncın etkisiyle canlılıklarını büyük oranda kaybetmektedir (Gardiner ve ark. 2000; Silva ve ark. 2002; Crittenden ve ark. 2006).

Probiyotiklerin kullanıldıkları gıdalarda raf ömrü siresince canlılık kayıplarını azaltmak amacıyla, son yıllarda mikroenkapsülasyon tekniği araştırmacıların ve endüstrisinin üzerinde önemle durduğu bir teknik haline gelmiştir. Bu tekniğin amacı, mikroorganizmaların etrafında çeşitli maddelerle koruyucu bir film veya kaplama tabakası oluşturarak çevrenin olumsuz şartlarına karşı mikroorganizmanın canlılığını korumasını sağlamaktır. Mikroenkapsülasyon tekniği birçok farklı yöntemle uygulanabilmektedir. Bu yöntemlerden bazıları ekstrüzyon-emülsiyon, püskürterek dondurma ve püskürterek soğutma, koazervasyon/faz ayrımı, lipozom tutuklama, inklüzyon kompleksi oluşturma (inclusion complexation), ko-kristalizasyon, püskürterek kurutma ve akışkan yataklı kurutma olarak sayılabilir (Kailasapathy 2002; Lian ve ark. 2002; Krasaekoopt ve ark. 2003; Krasaekoopt ve ark. 2004; Crittenden ve ark. 2006; Brückner ve ark. 2007; Meiners 2009).

Bu çalışmada probiyotik özellikleri daha önceki araştırmalarla tespit edilmiş *L. acidophilus* KPb1 yerel suşu ile *L. reuteri* NRRL B-14171 standart suşunun koazervasyon yöntemi kullanılarak aljinat-nişasta ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Üretilen kapsüllerin fiziksel özellikleri, salınım özellikleri, asidifikasyon kinetikleri belirlenmiştir. Araştırmada ayrıca hazırlanan mikrokapsüller model gıda olarak seçilen dondurmaya ilave edilerek depolama stabilitesi belirlenmiş, gıdanın pH, asitlik, viskozite ve duyusal özellikleri incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Probiyotikler

2.1.1. Probiyotik Teriminin Anlamı ve Probiyotiklerin Tarihçesi

‘Yaşam için’ anlamına gelen probiyotik kelimesi Yunanca kökenli bir kelimedir. Probiyotik terimi ilk olarak 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından yapılan bir çalışmada ‘Probiotika’olarak geçmiştir (Sanders 1999; Tonguç 2006). Probiyotik teriminin ilk kullanımı ise 1965 yılında Lilly ve Stillwell adlı araştırmacılar tarafından, diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeleri tanımlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir (Lee ve ark. 1999; Armbrrecht 2002). Probiyotik kelimesi etki mekanizmaları ve insan sağlığı üzerine olumlu etkilerine bağlı olarak 1965 yılından günümüze kadar birçok farklı anlamda kullanılmıştır. Günümüzde kullanılan tanım ise 1989 yılında Fuller tarafından geliştirilmiş ve probiyotik terimi; intestinal sistemin mikrobiyel dengesini geliştirerek konakçı sağlığı üzerine faydalı etkileri olan canlı mikrobiyel diyet destekleyicisi anlamında kullanılmıştır. Daha sonra bu tanıma gıda ve yemlerde kullanılan tekli ve çoklu kültürler de eklenmiş ve kapsamı genişletilmiştir (Havenaar ve Huis In't Veld 1992). Yapılan bazı çalışmalarda probiyotiklerin canlı olmayan formlarının da sağlık üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu ileri sürülmektedir (Murray 1998; Başyigit 2004). Avrupalı bilim insanları bu tanıma son şeklini vererek probiyotikleri vücuda alındığında

konakçının gastrointestinal mikroflorası üzerinde yararlı etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamışlardır (Kneifel ve ark. 1999; Tzortzis ve Vulevic 2009).

Probiyotik kelimesi FAO ve WHO tarafından kesin olarak tanımlanmasına ve “International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics” gibi bu konudaki uzman kuruluşların tanım hakkında açık görüşleri olmasına rağmen, yararlı etkileri henüz kanıtlanmamış birçok farklı ürün probiyotik adı altında piyasada satılmaktadır. Bu nedenle tüketicileri doğru yönlendirmek amacı ile probiyotik kelimesinin yeniden tanımlanması yönünde görüşler belirtilmiştir. Örneğin Amsterdam’da yapılan Uluslararası Probiyotik Çalıştayı’nda (International Probiotic Workshop; IPW) bazı bilim adamları, sağlık açısından tedavi edici etkileri klinik deneylerle kanıtlanmış olan ürünlerin ‘bakteriyel tedavi edici, mikrobiyel tedavi edici veya bakteriyel immün sistem düzenleyici’ şeklinde tanımlanmaları görüşünü sunmuşlardır (IPW 2004; Roberfroid 2008).

‘Probiyotik ürün’ denildiğinde; konakçı sağlığı üzerine olumlu etkileri olan mikroorganizmaları ihtiva eden ve çeşitli enzim, vitamin ve aroma bileşenleri ile zenginleştirilerek kapsül veya tablet haline getirilmiş diyet destekleyiciler anlaşılmaktadır (Çakır 2003; Champagne ve ark. 2005). ‘Probiyotik gıda’ ülkemizde Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları tebliğine göre: raf ömrü boyunca içerisinde yeterli miktarda probiyotik mikroorganizmayı canlı olarak bulunduran ve bunu koruyan ürün şeklinde tanımlanmaktadır (TGK 2002; Çayır 2007). Farmasötikaller olarak da adlandırılan bu ürünler tedavi edici ilaç yerine değil sadece sağlığı destekleyici ürünler olarak satılmaktadır. Kapsül veya tablet haline getirilmiş diyet destekleyiciler çeşitli hastalıklar ve antibiyotik tedavisi sonucu gastrointestinal sistemde ortaya çıkan

diyare gibi düzensizliklerin önlenmesinde kullanılmaktadır (Ouwehand ve ark. 1999; Rolfe 2000; Yücecan 2002; Başyigit 2004; Crittenden ve ark. 2006).

2.1.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Probiyotik olarak kullanılan bakteriler *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Bifidobacterium* türleri olmak üzere sınıflandırmada 6 gruba ayrılmaktadır. Laktik asit bakterileri dışında *Bacillus*, *Saccharomyces* ve *Aspergillus* cinslerinin bazı türleri de probiyotik olarak kullanılmaktadır (Başyigit 2004; Kılıç 2008; Champagne 2009; Yiğit 2009). Probiyotik özellik türe değil suşa özgüdür (Yiğit 2009). Probiyotik üretiminde kullanılan mikroorganizmalardan bazıları Çizelge 1’de verilmiştir (Çakır 2003).

Çizelge 1. Probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar

İnsan Beslenmesinde Kullanılanlar	Hayvan Beslemede Kullanılanlar
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. casei</i> <i>Bacillus mesentericus</i>
<i>L. casei shirota</i>	<i>L. reuteri</i> <i>B. licheniformis</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>B. subtilis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i> <i>B. natto</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>L. brevis</i> <i>B. toyoi</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>L. fermentum</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>B. adolescentis</i>	<i>L. helveticus</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
<i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i> <i>Candida pintolopesii</i>
<i>B. infantis</i>	<i>B. brevis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>B. breve</i>	<i>B. pseudolongum</i> <i>Torulopsis spp.</i>
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>B. thermophilus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>	

Laktobasiller Gram (+), fakültatif anaerob, uzun veya kısa çubuk şeklinde, hareketsiz, sporsuz ve katalaz (-) mikroorganizmalardır (Gomes ve Malcata 1999; Başıyigit 2004; Leroy ve deVuyst 2004; Champagne ve ark. 2005). Klasik sınıflandırmada laktobasiller fermentatif özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Bunlar;

- **Obligat homofermentatif laktobasiller:** Embden-Meyerhof Parnas metabolik yolunu kullanarak heksozları sadece laktik asite fermente ederler. Örneğin; *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*.
- **Fakültatif heterofermentatif laktobasiller:** Embden-Meyerhof-Parnas metabolik yolunu kullanarak heksozları sadece laktik asite fermente ederken bazı türler ise glikoz sınırlamasında laktik asit, asetik asit, formik asit ve CO₂ üretmektedirler. Fosfoketolaz yolunu kullanarak pentozları laktik asit ve asetik asite fermente ederler. Örneğin; *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sake*.
- **Obligat heterofermentatif laktobasiller:** Heksozları laktik asit, asetik asit, etanol ve CO₂'e, pentozları ise laktik asit ve asetik asite fermente ederler. Örneğin; *L. bifementas*, *L. brevis* ve *L. fermentum*.

Enterokoklar, Gram (+), fakültatif anaerob, sporsuz, katalaz (-), 10°C ve 45°C'de pH 9,6' da %6,5 NaCl'de %40 safra tuzunda gelişebilen kok şeklinde ve bağırsak florasında yer alan mikroorganizmalardır (Başıyigit 2004; Tunail 2009).

Bifidobakterler, Gram (+), hareketsiz, çoğunlukla eğri çubuklar halinde V veya Y şeklinde bulunabilen, anaerobik mikroorganizmalardır. Bifidobakterler insan ve hayvan bağırsak sistemlerindeki mikrofloranın önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (Alp 2008; Kılıç 2008).

2.1.3. Probiyotik Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikler

Mikroorganizmaların probiyotik olarak kullanılabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Sağlık açısından yararlı etkileri ölçülebilen ve fonksiyonel özelliklere sahip olan probiyotik suşlar elde etmek için şu özelliklere sahip suşların seçilmesi gerekmektedir. Bunlar:

1. Güvenilir olmalıdır. İnsanlar için kullanılacak ürünlerde insan orijinli suşlar seçilmelidir.
2. Stabil olmalıdır. Canlılığını ve metabolik aktivitesini devam ettirebilme, tutunabilme özelliklerini sürdürebilmesi için asit ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmemelidir.
3. İmmün sistemin güçlendirilmesi, patojenlerle yarışmalı rekabet, patojenlerin tutunmalarının ve kolonizasyonunun engellenmesi için bağırsak yüzeyine tutunabilmeli ve kolonize olabilmelidir.
4. Suşlar doğru olarak tanımlanmalı ve özellikleri belirlenmelidir. İntestinal sistemde mukozal yapıya zarar vermeyen ve invazyon özelliği olmayan suşlar kullanılmalıdır. Gıda ve klinik amaçlı kullanımlarda güvenilir olmalıdır.
5. Her bir farklı suşun minimum etki dozu belirlenmeli, plasebo kontrollü ve çok tekerrürlü canlı denemeleri gerçekleştirilmeli, sağlık üzerine olumlu etkileri klinik olarak kanıtlanmalıdır.
6. Antimikrobiyel maddeler üretmelidir.
7. Konakçıda hastalıklara karşı direnci geliştirme gibi faydalı etkiler gösterebilmelidir.
8. Probiyotikler patojenik olmamalı ve toksin üretmemelidir.

9. Vitamin sentezleme, laktaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu gibi önemli metabolik aktivitelere sahip olmalıdır.
10. Antibiyotiklere karşı dirençli olmalıdır.
11. Teknolojik proseslere dirençli olmalıdır.
12. Probiyotik üretiminde kullanılan suşlar aktarılabılır antibiyotik direnç genleri içermemelidir (Kınık ve Gürsoy 2005; Başığit 2004; Çakır ve ark. 2010).

2.1.4. Probiyotik Etkinin Mekanizması ve Bilimsel Temeli

Deri, ağız boşluğu, gastrointestinal ve ürogenital sistemler başta olmak üzere milyonlarca mikroorganizmanın yaşadığı insan vücudu dinamik bir ekosistemdir. İnsan vücudundaki bu bakteriyel popülasyonun yaklaşık 10^{14} düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir (Yücecan 2002; Tok ve Aslım 2007; Kılıç 2008). Sindirim sisteminde yer alan mikroorganizma çeşitleri Çizelge 2’de verilmiştir. Vücudumuzdaki toplam bakteri sayısı ile karşılaştırıldığında sindirim sistemindeki bakteri sayısının 10 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Gnotobiotic (mikroorganizmalardan arındırılmış) denek hayvanları ile yapılan çalışmalar mikrobiyel kolonizasyonun yaşam için zorunlu bir gereksinim olmadığını göstermiştir. Hatta mikrobiyel kolonizasyon, bazı mikrobiyel metabolitlerin toksik, karsinogenik ve mutajenik potansiyellerinden dolayı olumsuz etkilere bile sebep olabilmektedirler. Bununla birlikte gnotobiyotiklerin, enfeksiyonlara karşı doğal koşullarda yetiştirilen denek hayvanlarına göre daha duyarlı oldukları da bilinen bir gerçektir. Bu nedenle yetersiz bağışıklık sonucu patojen mikroorganizmaların hiçbir direnç olmadan kolayca kolonize olabilecekleri düşünülmektedir. Doğal koşullarda yetiştirilmiş denek hayvanları ve gnotobiyotikler arasındaki farklılıklar, konakçı

sağlığı açısından mikrobiyel kolonizasyonun oldukça önemli olduğu fikrinin temelini oluşturmaktadır (Salminen 1999; Çakır 2003; Uzun 2006; Berman 2009).

Çizelge 2. Sindirim sisteminde yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar

Sindirim Sistemi Bölgesi	Baskın Flora
Ağız boşluğu	<i>Lactobacillus, Bacteroides, Veillonella, Fusobacterium</i>
Yutak	<i>Lactobacillus, Bacteroides, Veillonella, Fusobacterium</i>
Mide	<i>Streptococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Fusobacterium</i>
Duodenum	<i>Streptococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Veillonella, Eubacterium</i>
Jejunum	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Veillonella, Eubacterium</i>
İnce bağırsak	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Veillonella, Eubacterium</i>
Kör bağırsak	<i>Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Bacteroides, E. coli, Eubacterium, Clostridium, Lactobacillus, Fusobacterium</i>
Kalın bağırsak	<i>Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Bacteroides, E. coli, Eubacterium, Clostridium, Lactobacillus, Fusobacterium</i>
Anüs	<i>Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Bacteroides, E. coli, Eubacterium, Clostridium, Lactobacillus, Fusobacterium</i>

İntestinal sistemin fizyolojik dengesi hastalık, yaşlılık, stres, antibiyotik veya ilaç kullanımı, iklim koşullarında meydana gelen değişimler, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi ve toksik maddelerin üretimi gibi faktörlerden doğrudan ya da dolaylı olarak etkilenebilmektedir (Cedgard 2000). İntestinal sistemde meydana gelen bu düzensizlikler ‘disbiosis’ olarak adlandırılmaktadır. İntestinal sistemde bulunan faydalı mikroorganizmaların sistemin fizyolojik dengesini olumlu yönde etkileyerek katkıda bulunmasına ise disbiosisin tersi bir durum olarak ‘probiyos’, bu mikroorganizmalara da ‘probiyotik mikroorganizmalar’ denilmektedir. Konakçının yaşamı sırasında karşılaştığı şartlar ve buna bağlı olarak değişen hormonal sistem, disbiosisi meydana getiren en önemli etmenlerden birisidir. Tedavi amaçlı alınan ilaçların birçoğu faydalı floranın inhibisyonuna neden olmaktadır. Disbiosise neden

olan bir diğerk etmen ise iklim koşullarında meydana gelen değişmelerdir. Bunun en iyi örneği seyahat esnasında meydana gelen ve seyahat diyaresi olarak bilinen düzensizlik durumudur (Çakır ve ark. 2001; Uzun 2006; Rautava ve Walker 2009).

Probiyotik bakterilerin konakçıyı intestinal sistem bozukluklarına karşı nasıl koruduğunu açıklamaya çalışan birçok mekanizma bulunmaktadır. Probiyotiklerin etki mekanizmaları çeşitli araştırıcılar tarafından aşağıdaki gibi özetlenmiştir (Çakır ve ark. 2001; Çakır ve ark. 2002; Çakır 2003; Uzun 2006).

1. İnhibe edici maddeler üreterek: Probiyotik mikroorganizmalar, Gram (-) ve Gram (+) mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkisi olan çeşitli maddeler üretmektedirler. Bunlardan birkaçı organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosinlerdir (Çakır 2003; Uzun 2006; Kavas 2007). Bu maddeler bazen bakteri sayısını azaltmasalar bile bakteriyel metabolizma ve toksin üretimini etkileyebilmektedirler. Sağlıklı bayanlarda vajinanın doğal florasını oluşturan *Lactobacillus* türlerinden bir kısmının H₂O₂ ürettiği ve bakteriyel vajinozise karşı korunmada etkili olduğu bilinmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların birçoğu tarafından üretilen laktik asit ve asetik asit gibi metabolitler ortam pH'sının düşürölmesini sağlamaktadırlar. Laktik asit, *Helicobacter pylori* ve diğerk Gram (-) gastrointestinal sistem patojenlerinin membran geçirgenliğini arttırarak diğerk antimikrobiyel maddeler ile beraber bu patojenlerin inhibisyonunu kolaylaştırmaktadır. Protein yapısında olan bakteriyosinlerin, duyarlı bakterilerin yüzeylerindeki reseptörlere bağlanarak öölümlerine yol açtığı ve bu mikroorganizmalara yakın tür ve suşlara karşı bakterisit etkisi olduğu bilinmektedir (Kavas 2007).

2. Tutunma bölgelerini bloke ederek: Probiyotikler ince bağırsak iç yüzeyindeki tutunma bölgeleri için patojenlerle rekabete girerek, bu bakterilerin bağırsak sisteminde tutunmalarını engellemektedirler (Çakır 2003; Uzun 2006).

3. Besin maddeleri için rekabet: Probiyotikler, patojen mikroorganizmaların gastrointestinal sistemdeki kolonizasyonunu önlemek amacıyla, patojenler için gerekli besin maddelerini tüketmekte ve bu mikroorganizmaların sistemde uzun süre kalmalarını engellemektedirler (Çakır 2003; Uzun 2006; Kavas 2007).

4. Toksin reseptörlerinin yıkımı: *Saccharomyces boulardii* hayvanlarda bağırsak mukozasında bulunan *Clostridium difficile*'nin toksin reseptörlerini parçalayarak konakçıyı koruduğu bilimektedir (Castagliuola ve ark. 1999).

5. Bağışıklık sisteminin güçlendirmesi: Son yıllarda yapılan çalışmalar, probiyotiklerin spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemini güçlendirerek konakçıyı intestinal hastalıklara karşı koruduğunu ortaya koymuştur. Bu mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, bazı hücre duvarı komponentlerinin veya hücre yüzeylerinin adjuvant etki gösterdiği ve humoral immün yanıtı güçlendirdiği düşünülmektedir (Medici ve ark. 2004; Uzun 2006).

2.1.5. Probiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri

Probiyotikler sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı bilim insanları tarafından son yılların en popüler konularından biri olarak görülmektedir. Dünyanın değişik bölgelerinde farklı fermente ürünlerin üretiminde kullanılan probiyotikler, insan sağlığı açısından oldukça önemli terapötik ve diyetetik özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Probiyotiklerin sağlık açısından olumlu etkileri aşağıda ayrıntılı olarak ele alınmıştır (Kınık ve Gürsoy 2005; Tonguç 2006; Berman 2009; Cucchiara ve Aloï 2009).

2.1.5.1. Tedavi Edici Etki

Probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri uzun yıllardan beri bilinmektedir. İntestinal floradaki bakterilerin sağlık açısından önemi günümüzde daha iyi anlaşılmış durumdadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar ve araştırmalar sağlıklı bir yaşam sürmek, vücut direncini arttırmak, intestinal düzensizlikler ve hastalıklarla mücadele etmek için probiyotik tüketimini önermektedir (Laurens-Hattingh ve Viljoen 2001; akır 2003; Berman 2009).

2.1.5.2. Patojenlerin Kontrol Edilmesindeki Etkileri

Probiyotikler, patojenlerin toksin üretimini engellemek veya metabolizmasını değiştirmek ya da canlı hücre sayısını azaltmak gibi etkilere sahiptir. *In vivo* ve *in vitro* yapılan alışmalar *L. acidophilus* ve *B. bifidum* 'un tüm türlerinin gıda kaynaklı patojenlere ve gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı inhibitör etki gösterdiğini belirtmektedir.

Birçok patojenin hastalık oluşturabilmesi için bağırsak duvarına tutunması gerekmektedir. Probiyotik mikroorganizmalar bu bölgeler için patojenlerle yarışarak onların tutunmalarını önlemektedirler (Brudnak 2003; Başyığit 2004). *L. acidophilus* ve bifidobakterler *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* ve *Clostridium perfringens* gibi patojen bakterilere karşı antagonistik etkiye sahiptirler. Japonya'da çocuklar yüksek sayıda bifidobakter içeren süt tüketerek diyare gibi hastalıklara karşı korunmaktadırlar. *B. bifidum* ocuklarda rotavirüslerin neden olduğu diyarenin önlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Brudnak 2003). Probiyotik bakterilerin gıda alerjilerinde ve karın

bölgesine uygulanan radyoterapi ve kolon kanseri sonucu ortaya çıkan bağırsak rahatsızlıklarının tedavisinde de kullanılabileceği belirtilmiştir. Probiyotik bakteriler gastrointestinal sistemdeki patojenlere karşı; bağışıklıkla ilgili ve ilgili olmayan savunma mekanizmalarını güçlendirerek, tutunmalarını engelleyerek, laktik asit, asetik asit gibi organik asitler, H_2O_2 , CO_2 , bakteriyosinler, diasetil gibi metabolik ürünlerle inhibisyonunu ve kompetitif baskılanmalarını sağlayarak mücadele etmektedirler (Çakır 2003; Turgut 2006).

2.1.5.3. Kanser Üzerine Etkisi

İnsanlarda görülen kanser hastalıkları %80-90 oranında çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır. Vücut dışında üretilmekte olan karsinojen maddeler, ön karsinojen olarak vücuda alınmakta ve daha sonra kanser etmeni bileşiklere dönüşmektedir. İntestinal sistemde yer alan bakteriler karsinojenlerin inaktivasyonunda, yayılmasında ve özellikle nitrozaminlerin ve safra sterollerinin kanser etmeni bileşiklere dönüşmesinde önemli rol oynarlar (Brudnak 2003; Çakır 2003). Yapılan araştırmalar diyetin içerisinde yer alan maddelerin de kanser oluşumunu arttırdığını veya azalttığını göstermiştir (Sanders 1999;). Probiyotiklerin kanser oluşum riskini azalttığı ise birçok bilim insanı tarafından ortaya konulmuştur (Çakır 2003; Fasano and Shea-Donohue 2009).

Örneğin yapılan bir çalışmada 10^{10} kob/g düzeyinde *L. casei* içeren toz preparattan bir yıl boyunca günde üç defa tüketen insanlarda mesane kanseri tedavi sürecinin hızlandığı tespit edilmiştir (Aso ve Akazan 1992). Başka bir çalışmada ise *L. acidophilus* tüketiminin kalın bağırsak kanserini önlediğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmaya 21 adet sağlıklı gönüllü katılmış ve *L. acidophilus* kültürü süte veya

yoğurda katılarak deneklere sunulmuştur. Bir aylık uygulamanın sonunda dışkıdaki prokarsinojenleri karsinojen maddelere dönüştüren bakteriyel enzim konsantrasyonlarında önemli azalmalar olduğu bildirilmiştir. Benzer çalışmalarda *L. acidophilus* katılmayan sütlerde ise aynı sonuç alınamamıştır (Murray 1998; Gmeiner ve ark. 2000).

Probiyotiklerin karsinojenlere karşı etkili olmasının nedenleri üç ana başlıkta özetlenebilir. Bunlardan birincisi probiyotikler nitrit gibi karsinojen özellik gösteren maddeleri yok ederler. Kürlenmiş et ve diğer gıdalarda bulunan bu karsinojen maddeler, bağırsak sisteminde nitrozaminlere dönüşme potansiyeline sahiptir. Probiyotikler nitrit ve nitratları nitrozamine dönüşmeden önce inaktif hale getirmektedirler. İkincisi, gastrointestinal sistemde bulunan diğer bakteriler tarafından üretilen, prokarsinojenleri karsinojenlere çeviren enzimlerin yapısını bozmaktadırlar. Üçüncüsü ise probiyotiklerin tümör oluşum aktivitesini baskılamalarıdır (Brudnak 2003; Çakır 2003; Tannis 2008).

2.1.5.4. Bağışıklık Üzerine Etkileri

Probiyotik bakterilerin canlı olarak bağırsaklarda bulunmalarının bağışıklık sistemini uyardığı ve kuvvetlendirdiği belirtilmiştir (Başyigit 2004). Yapılan bilimsel çalışmalar, intestinal mikrofloranın bağırsakların savunma mekanizmasının önemli bir parçası olduğunu ortaya koymuştur (Tonguç 2006). Probiyotik laktik asit bakteri suşları ile fermente edilen süt ürünlerinin tüketimi sonucu bağışıklığı kuvvetlendiren peptidlerin üretiminde artış olduğu ve bunlardan bir kısmının anti-tümör özelliğe sahip oldukları tespit edilmiştir. Bağışıklık sisteminin uyarılması ile serumda IgA

(immunoglobulin A) gibi antikorların artması sonucu virus, *Clostridium*, *E.coli* gibi patojenlere karşı vücut direncinin arttığı gözlenmiştir (Başyigit 2004; Tannis 2008).

Yapılan çalışmalar, probiyotik bakterilerin salgısal, hücrel ve spesifik olmayan bağışıklık özellikleri gibi birtakım bağışıklıkla ilgili parametreleri modifiye edebildiklerini ortaya koymuştur. Probiyotiklerin etkilediği düzenleyici mekanizmalar, mukus üretiminin indüksiyonu, laktobasillerin uyardığı makrofaj aktivasyonu, IgA ve nötrofil salgılanması, uyarıcı sitokinlerin salgılanması ve immunoglobulinlerin salgılanmasının stimülasyonu olarak belirtilebilir (Tonguç 2006; Tannis 2008; Fasano and Shea-Donohue 2009).

2.1.5.5. Alerjinin Engellenmesi

Batı toplumlarında özellikle atopik rahatsızlıkların görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. Alerjik hastalıkların, küçük yaşlardan itibaren beslenme, besinsel hijyen ve bağırsak mikroflorasının gelişmesi ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Probiyotiklerin atopik rahatsızlıklar üzerine etkilerinin incelendiği klinik çalışmalarda, çocuklarda görülen atopik egzama rahatsızlıklarının tedavisinde önemli ve belirgin bir ilerleme kaydedildiği tespit edilmiştir (Berman 2009; Rautava ve Walker 2009).

Alerjik hastalıkların önlenmesine yönelik yapılan çalışmalar çift körlü ve plasebo kontrollü olarak gerçekleştirilmiştir ve yüksek risk grubunda olan yenidoğan çocuklara uygulanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda atopik rahatsızlık riskinin plasebo grubuna göre yarı yarıya düştüğü tespit edilmiştir (Tonguç 2006; Tannis 2008).

2.1.5.6. Laktoz İntoleransı

Dünyadaki yetişkinlerin 2/3'ü laktoz intoleransından (laktozun sindirilememesi) dolayı birtakım sıkıntılar yaşamaktadır (Kınık ve Gürsoy 2005). Laktoz intoleransı β -galaktosidaz enziminin üretilmemesi ve buna bağlı olarak laktozun sindirilememesi sonucu ortaya çıkan bir rahatsızlıktır (Tonguç 2006; Tannis 2008). Bu rahatsızlığa sahip kişiler süt ve dondurma ile laktoz aldıklarında laktoz ince bağırsaktan emilmeden kalın bağırsağa geçer; laktoz burada bulunan bakteriler tarafından glikoz ve galaktoza parçalandıktan sonra asit ve gazla dönüştürülür (Murray 1998; Başıyigit 2004). Laktoz bağırsaktaki osmotik dengeyi bozarak sıvı ve elektrolit birikmesine neden olur bu da ishal başta olmak üzere gaz, şişkinlik gibi rahatsızlıklara neden olur (Armbrecht 2002; Kınık ve Gürsoy 2005; Tannis 2008).

2.1.5.7. Kolesterol Düşürücü Etki

Kolesterol, hayvanlar âlemindeki tüm canlıların hücre membranında bulunan ve insan metabolizmasında önemli rol oynayan organik bir maddedir (Tok ve Aslım 2007; Yiğit, 2009). Kanda kolesterol miktarının artması kardiyovasküler hastalıklar açısından risk faktörüdür (Armbrecht 2002; Aloğlu 2005; Çakır 2003). Birçok araştırmacı laktik kültür içeren süt ürünleri ve probiyotiklerin kolesterol düşürücü etkilerinin olduğunu belirtmiştir (Aloğlu 2005; Tannis 2008; Yiğit 2009). Laktik asit bakterilerinin serum kolesterolünü düşürücü etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *Lactobacillus casei*'nin dört suşunun kolesterolü önemli derecede asimile edebildiği tespit edilmiştir (Yiğit 2009). Yapılan başka bir çalışmada da *Lactobacillus*

plantarum'un da kolesterolü asimile edebilme kabiliyetine sahip olduğu ortaya konmuştur (Tannis 2008; Cucchiara ve Aloï 2009).

Probiyotiklerin kolesterolü düşürücü etkisinin çeşitli faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Pereira ve Gibson 2002; Tok ve Aslın 2007; Yiğit 2009). Bunlar;

1. Fermente süt ürünlerinde β -galaktozidaz enziminin bulunması,
2. Bazı bağırsak bakterilerinin gıdalarla alınan kolesterolü metabolize etme özelliğine sahip olması,
3. Bakterilerin bağırsaklarda kolesterol öncül bileşenleri veya kolesterolü azaltması,
4. Bazı laktobasillerin safra tuzlarını parçalamasıyla safra tuzlarını karaciğer tarafından emilmesinin engellenmesi, safra tuzu sentezlemek için fazla miktarda serum kolesterolünün kullanılması ve kolesterol miktarının azalmasıdır.

Bunların yanı sıra probiyotikler, intestinal sistemde yağ emilimi üzerinde düzenleyici etkiler göstererek fitosteroller ile kolesteroler arasında yarışmacı bir ortam oluşturmakta ve kolesterol alımını azaltmaktadır. Probiyotiklerin sağlık üzerine etkileri ile ilgili yapılan diğer bilimsel çalışmalarda, probiyotiklerin, özellikle laktobasillerin, kadınların ürogenital sistemlerinin sağlığı üzerine olumlu etkiler yarattığı ve enfeksiyon risklerini azaltıcı özellikte oldukları ortaya konmuştur. Ayrıca bağırsak ve karaciğer bölgelerinde oluşabilecek çeşitli enfeksiyonlara karşı risk azaltıcı etkileri, ağız ve diş sağlığı üzerindeki olumlu etkileri, *Helicobacter pylori* enfeksiyonları sonucu oluşan mide rahatsızlıkları üzerindeki olumlu etkileri, protein metabolizmasının iyileştirilmesi üzerindeki olumlu etkileri diğer sağlığa yararlı etkileri arasında sayılabilir (Kınık ve Gürsoy 2005; Tonguç 2006; Yiğit 2009).

2.1.6. Probiyotiklerin Güvenilirlik Kriterleri

Günümüzde üretilen ticari probiyotik ürünler hakkındaki mevcut bilgiler bu ürünlerin güvenilir olduklarını göstermektedir (Salminen ve vonWright 1998). Probiyotik ürünlerin güvenilirliğinde, üretilecek gıdanın fenotipik ve genotipik özellikleri ile bu mikroorganizmaların gıdalarda kullanımının geçmişi konusunda elde bulunan veriler temel kriterler olarak değerlendirilmektedir.

Avrupa Birliği ülkelerinde probiyotiklerin güvenilirliği ve teknolojik özellikleri çok geniş kapsamlı iki projede araştırılmıştır. Bunlar 1994-1997 yılları arasında gerçekleştirilen ticari probiyotik suşların in vitro fonksiyonlarını belirlemeyi amaçlayan Nordic projesi ve 1996 yılında başlayan, ticari probiyotiklerin sağlık açısından söz edilen etkilerini kanıtlamayı amaçlayan Probdemo (FAIR CT96-1028) projesidir (Leroy ve deVuyst 2004). Probdemo projesinin sonuçlarına göre geleneksel ve yeni gıdalarda kullanılacak probiyotiklerin güvenilirliği ile ilgili elde edilen sonuçlar ve dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıdaki gibidir (Çakır 2003; Tannis 2008; Berman 2009).

- Üretilen gıdanın güvenilirliğinden birinci derecede üretici firma sorumludur. Probiyotik gıdalar da en az diğer gıdalar kadar güvenilir olmalıdır.
- Yeni bir ürün oluşumunda kullanılacak olan probiyotik mikroorganizmaların yasal olarak onaylanmış olmaları gerekmektedir.
- Bir suş probiyotik olarak uzun zamandır güvenilir bir şekilde kullanılmaktaysa ilk defa kullanılacak yeni suşlar ile aynı işlemlere tabi tutulmaz.
- Gıda güvenliği için en iyi test yöntemi, insan kullanımında güvenilir olarak kullanıldığının belgelenmesidir. Hiçbir suşu patojen olarak belirlenmemiş

olan mikroorganizmalar ile uzun yıllardır probiyotik olarak güvenle kullanılan suşlar probiyotik üretiminde güvenilir olarak kabul edilmekte ve yeni ürün üretiminde kullanımına izin verilmektedir.

- Hiçbir suşu patojen olarak belirlenmeyen ancak güvenilir bir kullanım geçmişi olmayan suşlarda probiyotik üretiminde kullanılabilirler. Fakat bunların yeni ürün oluşumunda ilk defa izole edilen suşlarla aynı işlemlere tabi tutulması gerekmektedir.
- Patojenik suşları da olduğu bilinen bir türe ait ve probiyotik potansiyele sahip bir suş yeni ürün üretiminde kullanılmadan önce klinik olarak çok iyi araştırılmalıdır.
- Antibiyotik direnç genlerini taşıyıp, aktarabilen suşlar probiyotik olarak değerlendirilmemelidir.
- Suşun kesin olarak tanısı yapılmış olmalıdır. Bu amaçla günümüzde DNA-DNA hibridizasyon teknikleri veya 16S rRNA dizi analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Gelişmiş yöntemlerle tanıları doğru olarak yapılmayan suşlar probiyotik olarak kesinlikle satılmamalıdır.

2.2. Mikroenkapsülasyon

2.2.1. Mikroenkapsülasyon Teknikleri

Mikroenkapsülasyon, küçük katı partikülleri, sıvı damlacıkları ve gaz halindeki materyalleri birçok yararlı özellikleriyle beraber bir kaplama materyali içerisine paketleyip kapsüller haline dönüştüren ve uygun koşullarda salınımını sağlayan bir proses olarak tanımlanmaktadır (Gharsallaoui ve ark. 2007; Desai ve

Park 2005; Gouin 2004; Anal ve Singh 2007; Gbassi ve ark. 2009). Bu proseste oluşan mikrokapsüller, yarıgeçirgen, küre şeklinde, hafif ve kaplanan materyali güçlü bir şekilde çevreleyen bir yapıya sahip olup; çapları mikrometre ile birkaç mm arasında değişmektedir (Anal ve Singh 2007; Desai ve Park 2005). Kaplanan materyal; aktif materyal, öz, iç faz veya dolgu materyali olarak, kaplama materyali ise kabuk, tabaka, duvar, taşıyıcı veya enkapsülant şeklinde adlandırılmaktadır (Gharsallaoui ve ark. 2007). Kaplama materyali olarak mumlar ve lipidler (balmumu, kandellila ve karnauba mumları, gliserol distearat, doğal ve modifiye yağlar vb.), proteinler (jelâtin, peyniraltı suyu proteinleri, zein, soya proteinleri, gluten vb.), karbonhidratlar (nişasta, maltodekstrinler, kitosan, sukroz, glukoz, etil selüloz, selüloz asetat, sodyum kazeinat vb.), doğal gamlar (aljinat, karragenan, keçiyoynuzu gamı, akasya gamı, guar gam vb.) kullanılmaktadır (Gouin 2004; Lakkis 2007). Bu yöntemle kaplanan materyaller ise tat ve aroma maddeleri (Madene ve ark. 2006), antimikrobiyel ajanlar, nütrosötikal ve terapötik aktif maddeler, vitaminler (Wilson ve Shah 2007; Loveday ve Singh 2008), mineraller, antioksidantlar, renk maddeleri, asitler (da Silva Bastos ve ark. 2009), alkaliler, tamponlar, tatlandırıcılar, enzimler, kimyasal kabartıcı ajanlar, mayalar (Lakkis 2007), probiyotikler, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) (Schrooyen ve ark. 2001), lipidler ve oleoresinler ve karotenoidler dir (Champagne ve Fustier 2007; Gharsallaoui ve ark. 2007; Mortazavian ve ark. 2007; Liserre ve ark. 2008; Robert ve ark. 2003).

Mikroenkapsülasyon tekniğinde birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar, püskürterek kurutma, püskürterek soğutma, püskürterek dondurma, akışkan yatak kaplama, ekstrüzyon, santrifugal ekstrüzyon, koazervasyon (Desai ve Park 2005; Anal ve Singh 2007; Gouin 2004), liyofilizasyon, kokristalizasyon, santrifugal

süspansiyon ayırma (Desai ve Park 2005), dönen disk (Gouin 2004), lipozom tutuklama ve inklüzyon kompleksi oluşturmaktır (Gouin 2004; Desai ve Park 2005).

Tekniğin uygulanmasındaki amaç, kaplanan materyali stabilize etmek, oksidatif reaksiyonları kontrol etmek, kaplanan materyalin dış ortama transferini düşürmek, başından sonuna kadar materyalin kontrollü salınımını sağlamak, istenmeyen koku, renk ve aromaları maskelemek, raf ömrünü uzatmak ve materyali besinsel kayıplara karşı korumaktır (Gharsallaoui ve ark. 2007; Anal ve Sing 2007; Lacroix ve Yidirim 2007).

Bu mikroenkapsülasyon tekniklerinden biri olan koazervasyon faz ayrımı sonucu makromoleküllerin kümelenmesi olarak tanımlanmaktadır. Yöntemde hidrofobik materyal sıvı hidrokolloid faz içerisinde emülsifiye edilmekte ve kolloid faz küçük koaservat damlacıkları şeklinde ayrılmaktadır (Boh 2009). Yağ su emülsiyonu içerisinde hidrokolloid koaservat damlacıkları çekirdek materyalinin etrafını sarmaktadır (Koç ve ark. 2010). Damlacıklar etrafında oluşan duvar tabakası katılaştırıcı bir ajan yardımı ile çapraz bağlama ile katılaştırılmaktadır (Boh 2009). Kullanılan çekirdek materyali polimer ile uyumlu olmalı koazervasyon ortamında çözünmemelidir. Koazervasyon basit ve kompleks koazervasyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Basit koazervasyonda tek bir tip polimer kullanılırken kompleks koazervasyonda iki tip polimer kullanılmaktadır (Koç ve ark. 2010). Basit koazervasyonda duvar materyali olarak genellikle polisakkaritler (agar, selüloz türevleri, pollulan, pollulan esterleri) ve proteinler (albumin, kazein, gelatin, kollajen, geltain türevleri) kullanılmaktadır. Kompleks koazervasyonda duvar materyali olarak gelatin, albumin kazein, kollajen hemoglobin, akasya gum, karboksimetil selüloz, karragenan, aljinat vd. kullanılmaktadır (Boh 2009; Meiners 2009).

Koazervasyon 1931’de kolloid kimya araştırmacısı Bungenburg de Jong ve Kaas tarafından bulunmuştur. 1940-1942’de Green’in basınca duyarlı karbonsuz kopya kâğıdı üretim çalışmalarında kullanılmıştır. 1950’lerin sonlarında mikroenkapsülasyon teknolojisi ilaç endüstrisinde kullanılmaya başlanmıştır.

Koazervasyon mikrokapsüllerinin bazı uygulama alanları: Gıda bileşenleri, kozmetik bileşenleri, ilaçlar, pestisidler, antimikrobiyel ajanlar, aroma maddeleri, pigmentler ve boyalar, yapıştırıcılar, sıvı kristaller, elektronik mürekkeptir (Boh 2009; Meiners 2009).

2.2.2. Probiyotiklerde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları

Probiyotikler, yeterli miktarda alındıklarında konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Tannis 2008; Oliveira ve ark. 2009; Rautava ve Walker 2009). Probiyotikler bağırsak mikroflorasını etkilemekte, zararlı bakterilerin gelişimini inhibe etmekte, sindirimi kolaylaştırmakta, bağışıklık sistemini güçlendirmekte, atopik ve alerjik hastalıkları önlemekte ve tedavi etmekte, kolon kanseri, akut gastroenteritis, romatoit ve artrit gibi hastalıkları önlemekte, laktozun kullanımını sağlayarak laktoz intoleransını önlemekte, diyare ve kabızlığı engellemekte, kalsiyumun absorpsiyonunu ve vitaminlerin sentezini sağlamakta, proteinlerin ön sindirimini gerçekleştirmektedir (Liserre ve ark. 2007; Anal ve Singh 2007; Li ve ark. 2008). İnsan sindirim sisteminde yer alan en önemli probiotik bakteriler laktik asit bakterilerdir (Anal ve Singh 2007; Li ve ark. 2008). *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis* ve *Saccharomyces boulardii* gıdalarda probiyotik olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Tannis 2008; Oliveira ve ark. 2009; Rautava ve Walker 2009).

Probiyotiklerin sağlık üzerindeki bu olumlu etkileri sağlayabilmeleri için canlılıklarını katıldıkları gıdanın işlenmesi ve raf ömrü boyunca korumaları; ayrıca tüketimi sırasında midenin asidik ortamına, enzimlere ve ince bağırsaktaki safra tuzlarına direnç göstererek 10^6 - 10^7 cfu/g düzeyinde bağırsakta tutunmaları ve gelişmeleri gerekmektedir (Liserre ve ark. 2007; Jia ve ark. 2008; Li ve ark. 2008; Oliveira ve ark. 2009). Ancak probiyotikler özellikle asidik pH, oksijen (Augustin ve Sanguansri 2001; Oliveira ve ark. 2009), sıcaklık (Augustin ve Sanguansri 2001) ve safra tuzlarına karşı oldukça hassastırlar (Oliveira ve ark. 2009).

Probiyotik bakterileri fizyolojik (asidik pH ve safra tuzları) ve çevresel (oksijen) degradasyonlardan korumak amacıyla birçok yeni özüm̈ler geliştirilmiştir (Oliveira ve ark. 2009; Saccaro ve ark. 2009). Bunlardan en gelecek vaat edeni ise mikroenkapsülasyon tekniğidir. Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda püskürterek kurutma, dondurarak kurutma, akışkan yatak kaplama (Liserre ve ark. 2007), koazervasyon (Oliveira ve ark. 2009), ekstrüzyon, emülsiyon ve gel partikül teknolojisi (Champagne ve Fustier 2007) gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Ancak probiyotik bakteriler püskürterek kurutma, dondurarak kurutma, akışkan yatak kaplama gibi yöntemlerle enkapsüle edildiğinde ürün içerisindeyken tamamen salınabilmekte bu nedenle de ürünün çevre şartlarından, mide ve bağırsak sisteminden geçişinde probiyotiklerin korunması sağlanamamaktadır (Liserre ve ark. 2007; Poncelet 2009). Mikroenkapsülasyon tekniğıyle probiyotik kùltürlerin korunmasında hidrokolloid boncuklar oldukça başarılı olmuştur. Çünkü bakteri hücreleri boncuklar içerisine hapsedilmekte böylece elverişsiz çevre şartlarından korunmakta ve sindirim sistemindeki canlı kalma oranı artmaktadır (Picot ve Lacroix 2004). Ekstrüzyon, hidrokolloid kapsüllerin (boncuk) elde edilmesinde kullanılan en eski ve oldukça yaygın bir yöntemdir. Bu yöntem basit, yapılışı kolay ve ucuz bir

yöntemdir. Bakterilerin canlılığının korunmasında da oldukça etkilidir. Kaplama materyali olarak genellikle aljinat, kitosan, karboksi metil selüloz, karragenan, jelâtin ve pektin kullanılmaktadır (Liserre ve ark. 2007; Anal ve Singh 2007). Kürecikler mide suyuna ve safra tuzlarına karşı bakterilerin direncini geliştirmekte, gıdaya eklendiğinde bakteriler gıda ortamında salınmamakta, mide şartları içerisinde kapsüller parçalanmamakta, bakterilerin salınımı gastrointestinal sistemde gerçekleşmektedir. Böylece sadece bakterilerin canlılığını gıdanın işlenmesi ve depolanması boyunca korumakla kalmayıp aynı zamanda kontrollü salınımını da gerçekleştirmektedir (Champagne ve Fustier 2007; Koç ve ark. 2010). Yapılan çalışmalarda nişasta ile kaplanan probiyotik bakterilerin canlılıklarını en az 6 ay süreyle, dondurulduklarında ise en az 18 ay süreyle korudukları görülmüştür. Shue ve Marshall (1993), kalsiyum-aljinat küreciklerinin içine enkapsüle ettikleri laktobasilleri, dondurulmuş süte ilave etmişler ve serbest hücrelere oranla %40 daha fazla hayatta kaldıklarını gözlemlemişlerdir.

Khalil ve Mansour (1998), *B. bifidum* ve *B. infantis*’i hem enkapsüle edilmiş hem de serbest halde mayoneze ilave ederek probiyotik mayonez üretmişlerdir. Depolamadan 2 hafta sonra serbest hücreler canlılıklarını kaybederken, *B. bifidum* 12 hafta boyunca ve *B. infantis* 8 hafta boyunca canlılıklarını korumuşlardır. Mayonezin pH’sı 4 hafta boyunca 4,42 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma mikroenkapsülasyon tekniğinin düşük asitlik şartlarına karşı koruyucu etkisini ispatlamaktadır.

Khalida ve ark. (2000), kalsiyum- aljinat- nişasta karışımını kullanarak *Lb. acidophilus* ve *Bifidobacterium* spp.’i enkapsüle etmişler ve set yoğurtlara ilave etmişlerdir. Yoğurtları 4°C de 8 hafta depolamışlar ve enkapsüle edilmiş *Lb. acidophilus* ve *Bifidobacterium* spp.’lerin serbest hücrelere göre canlılıklarını daha fazla koruduklarını tespit etmişlerdir.

Enkapsüle edilmiş probiyotik bakteriler genellikle, yoğurt, peynir krema gibi fermente süt ürünlerinde (Lopez-Rubio ve ark. 2006; Saccaro ve ark 2009) dondurulmuş sütü tatlılarda, dondurmada, mayonezde ve biyokütle üretiminde kullanılmaktadır (Anal ve Singh 2007).

Mikroenkapsülasyon ve enzime dirençli nişastanın probiyotik canlılığı ve dondurmanın duyuşal özellikleri üzerine etkisinin incelendiğı bir çalışmada, serbest ve enkapsüle edilmiş *L. casei*, *B. lactis* ve %1 dirençli nişasta içeren 2 tip dondurma üretilmiş ve *L. casei* ve *B. lactis*'in canlılıkları ürünün depolanması boyunca (-20°C de 180 gün) belirlenmiştir. Serbest formdaki *L. casei* ve *B. lactis*'in canlı hücre sayısı başlangıçta dondurmada $5,1 \times 10^9$ ve $4,1 \times 10^9$ kob/mL iken -20°C'de 180 gün depolama sonunda $4,2 \times 10^6$ ve $1,1 \times 10^7$ kob/mL'ye düşmüştür. Kalsiyum aljinat ile enkapsüle edilmiş bakterilerde ise canlılık oranı, aynı depolama sıcaklığı ve süresinde %30 artış göstermiştir. Bu sonuçlar enkapsülasyonun probiyotiklerin canlılığını dondurmanın raf ömrü boyunca arttırdığını ve duyuşal özelliklerini önemli oranda etkilemediğini göstermiştir (Homayouni ve ark. 2008).

Mikroenkapsülasyonun, kaşar peynirinin olgunlaşması süresince *L. acidophilus* ve *B. bifidum*'un canlılığına etkisinin incelendiğı bir çalışmada; ekstrüzyon ve emülsiyon teknikleri ile enkapsüle edilen *L. acidophilus* ve *B. bifidum* kaşar peynirine ilave edilmiş ve 90 gün boyunca kaşar peynirinin mikrobiyolojik, biyokimyasal ve organoleptik özellikleri incelenmiştir. Mikroenkapsülasyon sayesinde 90 gün boyunca probiyotik hücrelerin canlılığının büyük oranda korunduğı gözlenmiştir. Kullanılan enkapsülasyon yöntemleri arasında son üründe bakteriyel sayı, proteoliz ve organoleptik özellikler bakımından bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca haşlama işleminin tüm peynirlerde probiyotik bakteri sayısında keskin bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Haşlama

işlemi sonunda kontrol grubu peynirdeki enkapsüle edilmemiş probiyotik bakteri sayısı sürekli bir şekilde azalırken, enkapsüle edilmiş probiyotik bakteri sayısının minimum probiyotik etkinin görüldüğü eşik değerin üzerinde kaldığı belirlenmiştir (Özer ve ark. 2008).

Başka bir çalışmada *L. acidophilus* ve *B. bifidum* kalsiyum aljinat - nişasta ile kaplanmış ve bu bakterilerin yapay gastrointestinal sistemdeki ve yoğurttaki canlılık düzeyleri incelenmiştir. Enzime dirençli nişasta kullanımının enkapsüle edilen bakterilerin canlılığını nişasta kullanılmadan enkapsüle edilen bakterilere göre arttırdığını gözlemlemişlerdir. Enkapsüle edilen bakterilerin asidifikasyon kinetikleri incelendiğinde asit üretimlerinin serbest kültüre oranla daha yavaş olduğu görülmüştür. Bununla birlikte enkapsüle edilmiş bakteriler yüksek asit ve safra tuzu ortamında canlılıklarını önemli oranda arttıramamıştır. Enkapsüle edilmiş bu bakterilerin 8 hafta boyunca yoğurttaki canlılıklarına bakıldığında, *L. acidophilus* ve *B. bifidum*'un canlı hücre sayısı 0,5 log kob birim azalırken; serbest hücrelerin sayısının 1 log kob birim azaldığı tespit edilmiştir (Khalida ve ark. 2000).

Üç farklı prebiyotik (enzime dirençli mısır nişastası, raftilin, raftiloz) ile kaplanmış *L. acidophilus*'un, *in vitro* ortamda asitlik ve safra tuzları varlığında canlılığının araştırıldığı bir çalışmada; enzime dirençli mısır nişastası içeren kapsüllerin pH 2'de 3 saat sonunda raftilin ve raftiloz içeren kapsüllere göre daha iyi bir koruma sağladığı gözlenmiştir. Çalışmada ayrıca enzime dirençli mısır nişastası konsantrasyonunun %1'e kadar *Lactobacillus* türlerinin canlılığını önemli derecede arttırdığı, ancak daha yüksek nişasta konsantrasyonlarının etkili bir koruma sağlamadığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada 3 farklı polimerle (kitosan, poly-L-lisin ve aljinat) kaplanmış bakterinin pH 2'deki korunma etkinliği de test edilmiş ve bu bakterinin enzime dirençli mısır nişastası ile birlikte kitosan ile kaplanmasının *in*

vitro asidik ve safra tuzu ortamında ve yoğurtta aljinata göre bakteri canlılığını önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir (Iyer ve Kailasapathy 2005).

L. plantarum 299v, *L. plantarum* 800 ve *L. plantarum* CIP A159 kültürleri ile yapılan bir çalışmada, kaplama etkinliğini geliştirmek amacıyla, kaplama materyali olarak aljinat ile birlikte peyniraltı suyu proteinleri kullanılmıştır. Yapay mide ve bağırsak sıvısı ortamında yapılan inaktivasyon denemelerinde, dondurularak kurutulan küreciklerdeki çapraz bağların açılarak bakterilerin aljinat matriksinden salınımı incelenmiştir. Kaplanmış *L. plantarum* 299v ($10,04 \log_{10}$ kob/g), *L. plantarum* 800 ($10,03 \log_{10}$ kob/g) ve *L. plantarum* CIP A159 ($10,12 \log_{10}$ kob/g) yapay mide sıvısı içerisinde 37°C 'de 60 dk. inkübasyona bırakılmış ve bakterilerin en iyi canlı kalma oranının peyniraltı suyu proteinleri ve aljinat kullanılan küreciklerde olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde mikrokapsülleri yapay bağırsak sıvısında 37°C 'de 180 dk. inkübasyona bırakılmış ve sadece bir bakteri küreciğinde (Lp299v) $2,74 \log_{10}$ kob/g canlı bakteri kaldığı bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar peyniraltı suyu proteinlerinin bakteri içeren aljinat küreciklerinin kaplanması için uygun, ucuz ve verimli bir kaplama materyali olduğunu göstermişlerdir (Gbassi ve ark. 2009).

Chandramouli ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada *L. acidophilus* CSCC 2400 suşunu kalsiyum aljinat ile kaplamış ve bu suşun canlılığını yapay mide koşullarında test etmişlerdir. Çalışmada değişik kapsül büyüklükleri (200 μm , 450 μm , 1000 μm), değişik sodyum aljinat konsantrasyonları (%0,75, %1, %1,5, %1,8 ve %2,0 (w/v)) ve değişik kalsiyum klorür konsantrasyonlarının kaplanmış bakterinin canlılığına etkileri araştırılmıştır. Buna göre mikrokapsüllerdeki bakterilerin canlılıklarının kapsül büyüklükleri ve jel konsantrasyonun artmasıyla arttığı; buna karşın kalsiyum klorür konsantrasyonunun artmasında ise kayda değer bir değişiklik olmadığı

görülmüştür. Aynı araştırmada değişik fosfat tampon konsantrasyonlarında kaplanmış hücrelerin salınımları da çalışılmıştır. Enkapsüle edilmiş *L. acidophilus* CSCC 2400 ve *L. acidophilus* CSCC 2409 suşlarının, düşük pH (pH 2)'da ve yüksek safra konsantrasyonunda (%1,0) en uygun kaplama şartlarında hazırlanmış (%1,8 (w/v) aljinat, 10^9 kob/mL, 30 dk. 0,1 M CaCl_2 'de sertleştirilmiş ve oluşan kapsül büyüklüğü 450 μm) yapay mide koşullarına maruz bırakıldığında kaplanmış hücrelerinin kaplanmamış hücrelere oranla canlılıklarını kayda değer bir ölçüde korudukları tespit edilmiştir. Böylece bu çalışmada kullanılan kaplama yönteminin laktobasil suşlarını mide koşullarının istenmeyen etkilerine karşı etkili bir şekilde koruduğu açıklanmaktadır.

Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu üzerine yapılan başka bir çalışmada ise Ding ve Shah (2007) 8 probiyotik bakteri kültürünün asit ve safra tuzlarına dirençlerini ve sıcaklık toleranslarını araştırmışlardır. Araştırmada serbest (kaplanmamış) probiyotik kültürler kontrol olarak kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre mikroenkapsüle edilmiş probiyotik bakterilerin HCl katılmış MRS Broth içerisinde canlı kalma süreleri serbest probiyotik bakterilere göre daha uzun olduğu, safra tuzu ortamında ise serbest hücrelerin sayısı 6,51 log kob/mL azalırken kaplanmış kültürlerin sayısının 3,36 log kob/mL azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Sıcaklık denemelerinde de benzer sonuçlar elde edilmiş, buna göre; kaplanmış kültürlerde 30 dk. sıcaklık uygulaması sonucunda canlılık kaybı 4,17 log kob/mL olurken, serbest kültürlerde ise bu oran 6,74 log kob/mL olmuştur. Ancak 1 saatlik sıcaklık uygulamasında hem kaplanmış hem de kaplanmamış probiyotik kültürlerin canlılık kayıplarında benzer sonuçlar alınmıştır.

2.3. Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Bazı Materyaller ve Özellikleri

2.3.1. Kaplama Materyalinde Bulunması Gereken Özellikler

Mikroenkapsülasyon tekniğinde yapılması gereken ilk işlem uygun kaplama maddesinin seçilmesidir. Kaplama materyali kapsül, duvar materyali, membran, taşıyıcı veya kabuk olarak adlandırılır. Kaplama materyalleri genel olarak film oluşturabilen gıdalar, şekerler, proteinler, doğal ve modifiye polisakkaritler, yağlar veya sentetik polimerlerdir. Gıda sanayiinde kaplama materyali olarak genelde yağlar, nişastalar, dekstrinler, aljinatlar, protein ve lipid materyalleri kullanılmaktadır. Gıda bileşenlerinin kaplanması için kullanılan bazı kaplama materyalleri Çizelge 3’te verilmiştir. Kaplama materyalinin yapısı mikrokapsüllerin fonksiyonel özelliklerini belirleyen ana faktördür (Gibbs ve ark. 1999; Adhikari 2000; Ersus 2006; Poncelet 2009).

Çizelge 3. Gıda bileşenlerinin kaplanmasında kullanılan bazı kaplama materyalleri

Grup Adı	Kaplama Materyali
Karbonhidratlar	Nişasta (dirençli, modifiye), mısır şurubu, maltodekstrin, siklodekstrin, sukroz, dekstran, kitosan, glukoz
Proteinler	Gluten, kazein, jelatin, albumin, peptitler, peyniraltı suyu proteinleri, zein, soya proteinleri, gluten
Yağlar	Vaks, parafin, balmumu, mono ve di gliseritler, katı ve sıvı yağlar
Gamlar	Aljinat, akasya gamı, guar gamı, sodyum ve kalsiyum aljinat, karragenan
Selülozlar	Karboksimetilselüloz, metilselüloz, etilselüloz, nitroselüloz, asetilselüloz, selüloz asetat fitalat, selüloz asetat bütirat fitalat

İdeal bir kaplama materyalinin özellikleri şunlardır:

1. Toksik olmamalı,
2. Yüksek konsantrasyonlarda iyi akışkanlık özelliği göstermeli,
3. Stabil bir emülsiyon oluşturmalı ve aktif materyalin dağılmasını engellemeli,
4. Aktif materyali çevre koşullarına karşı (ışık, nem, ısı vb.) korumalı,
5. Kaplanacak madde ile proses sırasında ve depolamada reaksiyona girmemeli,
6. Gıda endüstrisi için kabul edilebilir çözücülerde (su, etanol vb.) çözünebilmeli,
7. Kimyasal olarak geri dönüşümsüz reaksiyonlara neden olmamalı,
8. Enkapsülasyon işleminde çözücünün ayrılmasına olanak tanımalı,
9. Aktif materyalin istenilen oranda ortama salınmasına izin vermeli,
10. Ekonomik olmalıdır (Shahidi ve Han 1993; Ersus 2006; Weissbrodt 2009).

Enkapsülasyonda en sık kullanılan kaplama materyali grubu su içinde çözünebilen, dağılabilen, kıvam ve viskozitenin artmasını sağlayan uzun zincirli polimerlerden oluşan hidrokolloit ve gamlardır. Gamlar enkapsülasyonda, emülsiyonların stabilizasyonunda, partiküllerin homojen dağılımında, krsitalizasyonun kontrolünde ve sinerezisin önlenmesinde kullanılmaktadır (Çakır ve ark. 2010).

2.3.2. Kaplama Materyallerinin Bazı Teknolojik Özellikleri

2.3.2.1. Aljinatlar

Aljinatlar kahverengi deniz yosununun hücre duvarından elde edilen, L-glukuronik asit ve D-mannuronik asit olmak üzere iki yapısal ünite içeren bir heteropolisakkarit olup, bitkilere sağlamlık ve esneklik sağlayan polimerlerdir. Aljinik asit aljinatların serbest formu olan ve ticari olarak üretilen aljinatların ara ürünüdür. Aljinik asit su tutma kapasitesi yüksek, suda çözünme yeteneği olan ve ticari olarak satılan Na, K, Ca, NH₄ ve Mg tuzlarına dönüşebilir.

Aljinatlar mikrobiyel hücrelerin enkapsülasyonunda başarıyla kullanılmaktadır. Örneğin, aljinat/nişasta karışımıyla kaplanan probiyotik bakterilerin canlılıklarını gastrointestinal şartlarda ve yoğurtta önemli ölçüde korudukları bilinmektedir (Lee ve ark. 2000; Homayouni ve ark. 2008). Aljinatın nişasta ile beraber kullanımı oldukça yaygın olup, özellikle laktik asit bakterilerinin enkapsülasyon verimini arttırdığı tespit edilmiştir (Gbassi ve ark. 2009). Aljinatların enkapsülasyon uygulamalarında yaygın olarak kullanılmasının avantajları ve dezavantajları şu başlıklar altında toplanabilir (Mortazavian ve ark. 2007).

Avantajları:

1. Bakteri hücrelerinin etrafında kolayca jel matriksi oluşturması,
2. Toksik olmaması,
3. Gıda için güvenilir ve biyoyumlu olması,
4. Kolay hazırlanabilir ve uygulanabilir olması,
5. Bağırsaklarda kolay çözünebilir ve hücre salınımına izin verebilir olması,
6. Ucuz olması,

Dezavantajları:

1. Asidik çevre koşullarına karşı hassas olması,
2. Laktik asit içeren ortamlarda mekanik stabilitelerinin zayıf olması,
3. Kalsiyum iyonları varlığında oluşan aljinat jel matriksinin fosfatlar, laktatlar ve sitratlar gibi kelat oluşturan ajanların varlığında yapısının bozulması,
4. Endüstriyel uygulamalarda maliyetin kısmen de olsa yüksek oluşu,
5. Hızlı nem difüzyonuna ve diğer sıvıların kapsüllere penetrasyonuna direncinin zayıf oluşu.

2.3.2.2. Nişasta

Mikroenkapsülasyonda kullanılan nişasta beslenme fizyolojisi ve fonksiyonları açısından önemli bir bileşiktir. Özellikle dirençli nişasta ince bağırsakta pankreatik amiloz tarafından parçalanamaz ve kalın bağırsağa ulaşır ve burada yerleşik bulunan gastrointestinal sistem mikroflorası tarafından fermente edilebilmektedir. Karbonhidratların anaerobik bakteriler tarafından fermente edilmesi sonucu kısa zincirli yağ asitleri oluşmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle dirençli nişasta gıdalardaki probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistemdeki canlılıklarını korumak amacıyla kullanılmaktadır. Dirençli nişasta kullanımının bir diğer sebebi, uygun granül yüzeyleri sayesinde, probiyotiklerin işlenmesi, depolanması ve sindirim sisteminde taşınmalarına yardım etmesi, aynı zamanda çevresel strese karşı esneklik ve sağlamlık kazandırmasıdır (Anal ve Singh 2007; Calleros ve ark. 2007; Li ve ark. 2009).

Talwalkar ve Kailasapathy (2003) yaptıkları araştırmada aljinat-nişasta-bakteri karışımının CaCl_2 çözeltisine eklenmesiyle aljinat-nişasta boncuk jelleri

oluşturarak *L. acidophilus* ve *B. lactis* probiyotik bakterilerini kaplamışlardır. Araştırma sonunda aljinat jel boncuklarının oksijenin jele difüzyonunu kısıtladığını, boncukların merkezinde anaerobik bölgeler oluşturduklarını ve böylece kaplanmış hücrelerin oksijen toksisitesine karşı korunduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma *Lactobacillus acidophilus* KPb1 yerel suşu ve *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 standart suşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yerel suş Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laktik asit bakteri koleksiyonundan, standart suş ise ABD Tarım Bakanlığı (U.S. Department of Agriculture), ARS Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Bakteri kültürlerinin üretilmesinde MRS (de Man-Rogosa-Sharpe, Merck, Almanya) sıvı besiyeri, bakteri kültürlerinin sayılmasında MRS (Merck, Almanya) katı besiyeri kullanılmıştır.

Enkapsülasyon işleminde kaplama materyali olarak % 2 sodyum aljinat (A 7128-Sigma), % 2 enzime yüksek dirençli nişasta (National Starch & Chemical, Manchester, UK), kanola yağı (Gıda saflığında, Yudum Gıda, İstanbul, Türkiye) ve % 0,2 lesitin (Gıda saflığında, Ülker Grup, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Katılaştırıcı çözelti olarak 1M CaCl_2 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck, Almanya) kullanılmıştır. Yıkama çözeltisi olarak % 0,9 NaCl (Merck, Almanya), % 5 gliserol (Merck, Almanya) ile hazırlanan çözelti kullanılmıştır. Kapsüllerin açılmasında 0,1M KPO_4 (pH 7,4, Merck, Almanya) tampon çözeltisi kullanılmıştır.

Dondurma yapımında ticari olarak satılan hazır (Dr. Oetker) toz dondurma karışımı kullanılmıştır. Dondurmalar piyasadan temin edilen 250 mL lik plastik

kaplarda depolanmıştır. Dondurmaların pH ölçümleri pH metre (Selecta pH Meter pH-2005 Model, İtalya) ile gerçekleştirilmiştir. Titrasyon asitliği ölçümleri için 0,1 N NaOH kullanılmıştır. Asidifikasyon kinetiği analizinde RSM Broth (% 9,5 yağsız süttozu, % 2 glukoz, % 0,5 maya ekstraktı) ve MRS Broth (Merck, Almanya), mikrobiyolojik sayımlarda ise MRS Agar (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteri Kültürlerinin Geliştirilmesi ve Peletin Hazırlanması

Katı besiyeri ortamında bulunan *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kolonileri öze yardımı ile 5'er mL'lik MRS sıvı besiyerine aktarılmış ve 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında ölçek büyütmek amacıyla 1'er µL aktif kültürden alınarak 200'er mL'lik MRS Broth besiyerlerine aktarılmış ve 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılarak geliştirilmiştir.

L. acidophilus KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürleri MRS Broth besiyerlerinde iki kez aktifleştirilerek 8-9 log kob/mL düzeyinde geliştirildikten sonra 30 mL'lik santrifüj tüplerine (Nalgene) aktararak 14000 g'de 6 dk. oda sıcaklığında santrifüj (Sigma 2-16 KC) edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak pelet hazırlanmıştır. Hazırlanan peletler iki defa % 0,85'lik NaCl çözeltisi ile yıkanmış ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edildikten sonra, yaş pelet ağırlığı belirlenerek, kaplama işleminde kullanılıncaya kadar buzdolabında bekletilmiştir.

3.2.2. Kaplama Materyalinin Hazırlanması

Kullanılan tüm cam malzemeler ve çözeltiler 121°C de 15 dk. otoklavda sterilize edilmiştir. Aljinat küreciklerinin hazırlanmasında Sheu ve ark. (1993), Sultana ve ark. (2000) ve Homayouni ve ark. (2008) tarafından uygulanan yöntemler kısmen modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre 150 mL aljinat çözeltisi hazırlamak için % 2 aljinat (3 g) ve % 2 enzime dirençli nişastadan (Hi-maize resistant starch) (3 g) tartılmış ve her iki bileşen kuru toz halinde iyice karıştırılmıştır. Bu karışım 150 mL steril distile su ilave edildikten sonra tam çözünme ve homojenizasyonu gerçekleştirmek amacıyla 5 dk. homojenizatör (Bio-Homogenizer, İsviçre) kullanılarak karıştırılmıştır.

3.2.3. Yağ-Lesitin Çözeltisinin Hazırlanması

Yağ/su emülsiyonu oluşturmak amacıyla 300 mL kanola yağının (Yudum Gıda San. Tic. A.Ş., İstanbul) içerisine % 0,2 lesitin (0,6 mL) ilave edilmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanılıncaya kadar kahverengi cam şişede oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Kalsiyum Klorür Çözeltisinin Hazırlanması

Hazırlanacak mikroküreciklerin katılaştırılmasında 1M CaCl_2 çözeltisi kullanılmıştır. Çözelti yağ-lesitin çözeltisi ile 1:1 oranında (300 mL) olacak şekilde hazırlanmış, bunun için 44,103 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp belli bir miktar steril distile su içerisinde çözüldükten sonra, hacim 300 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.5. Kapsül Yıkama Çözeltisinin Hazırlanması

Yıkama çözeltisi, toplam hacim 1 L olacak şekilde; % 0,9 (9 g) NaCl, 500 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra içerisine % 5 (50 mL) gliserol çözeltisi ilave edilmiş ve son hacim steril saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

3.2.6. Koazervasyon Yöntemi ile Bakteri Kültürlerinin Enkapsülasyonu

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 suşlarının peletlerinden % 1 oranında (1,5 g) tartılıp, 10 mL yağ-lesitin çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözülen peletler hazırlanan aljinat çözeltisine ilave edilerek homojen bir karışım elde edilinceye kadar manyetik karıştırıcıda (Velp, Scientifica, EU) karıştırılmış ve bu karışıma 300 mL kanola yağı-lesitin çözeltisi ilave edilmiştir. Su içinde yağ emülsiyonu oluşturabilmek için karışım manyetik karıştırıcı ile 400 rpm de 20 dk. tam bir emülsiyon oluşuncaya kadar tekrar karıştırılmıştır. Karışım homojen bir emülsiyon haline geldikten sonra, manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırma işlemi devam ederken, 300 mL 1M CaCl₂ çözeltisi beherin iç cidarından hızlı bir şekilde dökülerek emülsiyona ilave edilmiştir. Daha sonra emülsiyon oda sıcaklığında 45-60 dk. bekletilerek kalsiyum-aljinat küreciklerinin beherin dibinde toplanması sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda yağ tabakası üstte kalsiyum- aljinat kürecikleri ise alta toplanmıştır. Beherin üst kısmında toplanan yağ tabakası dökülerek ve/veya pipetle ile olabildiğince uzaklaştırıldıktan sonra, kalan kürecikler yıkama çözeltisi (% 0,9 NaCl + % 5 gliserol) ile en az iki defa yıkanmıştır. Sonuç olarak yaklaşık 130- 150 g, beyaz renkli, yarı sert, küre şeklinde, mikrokapsüller elde edilmiştir. Kapsüller gıda uygulamalarında

kullanılınca kadar +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir (Sheu ve ark. 1993; Sheu ve Marshall 1993; Sultana ve ark. 2000; Homayouni ve ark. 2008).

3.2.7. Kapsüldeki Mikroorganizma Sayısının Belirlenmesi

Elde edilen kapsüllerin içerdiği mikroorganizma yükünü belirlemek amacıyla kapsüllerden 5'er g tartılıp üzerine 45 mL 0,1 M KH₂PO₄ çözeltisi ilave edilmiştir. Kapsüllerin 0,1 M KH₂PO₄ tamponu içerisinde tam olarak açılmalarını sağlamak amacıyla homojenizatörde (Stomacher) 10 dk. karıştırılmıştır. Homojenizasyon işleminin ardından 10⁻⁵'e kadar seri seyreltme yapılmış ve uygun dilüsyonlardan MRS Agar besiyerine yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda oluşan koloniler sayılarak, kapsüllerdeki mikroorganizma sayısı Log kob/g olarak verilmiştir.

3.2.8. Kapsüllerin Boyutlarının Belirlenmesi

Kapsüllerin boyutları mikroskopta, oküler mikrometre kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre kapsüllerden hazırlanan yaş preparatlar aydınlık saha mikroskobunda 10X objektifte incelenmiş, her preparatta en az 10 kürecikte, 2 farklı eksen üzerinde yapılan ölçümlerin ortalamaları alınarak kapsüllerin boyutları belirlenmiş, aynı zamanda şekilleri de incelenmiştir (Sultana ve ark. 2000; Talwalkar 2003).

3.2.9. Kapsüllerden Hücre Salınımı

Salınım testinde kapsüllerin parçalanarak mikroorganizma salınımına karşı gösterdikleri direnç özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle 5 g kapsül alınarak içerisinde 45 mL 0,1 M fosfat tamponu (pH 7) bulunan stomacher torbasına konulmuş ve 30 dk. homojenize edilmiştir. Her 10 dk.'da bir alınan örneklerden hazırlanan uygun dilüsyonlardan ekim yapılarak kapsüllerin mikroorganizma salınımına karşı gösterdikleri direnç ve homojenizasyonun öncesinde ve sonrasında mikroorganizma sayıları karşılaştırılarak ne kadar mikroorganizmanın serbest hale geçtiği tespit edilmiştir (Adhikari 2000; Talwalkar 2003).

3.2.10. Enkapsüle Edilen Bakterilerin Asidifikasyon Kinetiklerinin Belirlenmesi

Enkapsüle edilen bakterilerin asidifikasyon kinetiklerinin belirlendiği bu denemede 50'şer mL MRS Broth besiyerine ve RSM' ye 2,5 g *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 suşlarının mikrokapsülleri ile; 50 µL serbest formdaki *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürleri ilave edilmiş ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince kültürlerden başlangıçta ve her 2 saatte bir alınan örneklerde mikroorganizma sayımı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca örneklerdeki asitlik gelişimini kontrol amacıyla her saat başı pH ölçümü de (Selecta pH Meter pH-2005 Model, İtalya) yapılmıştır (Sultana ve ark. 2000; Homayouni ve ark. 2008).

3.2.11. Dondurmaların Hazırlanması ve Kaplanmış Probiyotik İlavesi

Kaplanmış probiyotik mikroorganizmaların gıda ortamındaki canlılık düzeylerini incelemek amacıyla dondurma model gıda olarak seçilmiştir. Bu amaç için hazırlanan probiyotik mikroorganizma kapsülleri ve aynı mikroorganizmaların kaplanmamış (serbest) kültürleri, laboratuvar koşullarında hazırlanan dondurma örneklerine ayrı ayrı ilave edilmiştir. Denemede standart bir üretim amacıyla hazır ticari toz dondurma karışımları kullanılmış ve dondurmalar üretici talimatlarına uygun olarak hazırlanmıştır. Kısaca, hazır toz dondurma karışımı 200 mL süte ilave edilerek mikser yardımı ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Doksan gün boyunca -18°C 'de depolanan dondurmalarda başlangıç, 20., 40., 60. ve 90. günlerinde alınan örneklerin mikrobiyolojik, fiziksel, kimyasal ve duyuşal özellikleri incelenmiştir. Dondurmalar hazırlandıktan sonra 10^7 - 10^8 kob/g düzeyinde canlı kültür içeren kapsüller ve serbest mikroorganizma kültürleri 1/10 oranında dondurmalara ilave edilmiş ve homojen bir karışım sağlandıktan sonra, 5 eşit porsiyona bölünerek kapaklı saklama kaplarına aktarılmış ve -18°C 'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Dondurma numunelerinde mikroorganizma sayımı, pH, asitlik tayini (% laktik asit), viskozite değeri ve duyuşal analizleri aşağıda açıklandığı gibi yapılmıştır (Homayouni ve ark. 2008; Metin 2008).

3.2.11.1. Depolama Boyunca Dondurmaların pH'larının Ölçülmesi

Derin dondurucuda -18°C'de depolanan *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürlerinin kapsül ve serbest formlarını içeren dondurmaların 0., 20., 40., 60. ve 90. günlerde pH ölçümleri (Selecta pH Meter pH-2005 Model, İtalya) pH metre ile yapılmıştır (Homayouni ve ark. 2008; Metin 2008).

3.2.11.2. Depolama Süresince Dondurmalarda Asitlik Tayini

Derin dondurucuda -18°C'de depolanan *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171'nin kapsül ve serbest formlarını içeren dondurmaların asitlik tayini Metin (2008)'e göre yapılmış olup, sonuçlar % Laktik asit cinsinden hesaplanmıştır. Bu analiz 0., 20., 40., 60. ve 90. günlerde tekrarlanmıştır.

3.2.11.3. Depolama Süresince Dondurmalarda Probiyotik Bakteri Sayımı

L. acidophilus KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171'nin kapsül ve serbest formlarını içeren dondurmaların mikrobiyolojik sayımları için dondurmalarından 10'ar g tartılıp stomacher poşetlerine koyulmuş ve üzerlerine kapsüllerin açılmasını sağlamak amacıyla 90 mL 0,1 M fosfat tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Homojenizatörde 5 dk. homojenize edilerek uygun seyreltilerden yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmış ve petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan koloniler sayılarak sonuç log kob/g olarak verilmiştir. Bu analiz 0., 20., 40., 60. ve 90. günlerde tekrarlanmıştır (Homayouni ve ark. 2008).

3.2.11.4. Depolama Süresince Dondurmalarda Viskozite Ölçümü

Derin dondurucuda -18°C’ de depolanan *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürlerinin kapsül ve serbest formlarını içeren dondurmaların viskoziteleri viskozimetri cihazı (AND Vibro Viscometer SU-10 Model) kullanılarak ölçülmüş ve analizler aynı periyotlarda tekrarlanmıştır.

3.2.11.5. Dondurmaların Depolama Öncesi ve Sonrası Duyusal Analiz Sonuçları

Koazervasyon yöntemi ile kaplanan probiyotik bakteri kültürlerinin ve kaplanmamış serbest kültürlerin, dondurmanın duyusal özellikleri üzerine etkisini incelemek amacıyla depolama öncesi ve sonrasında dondurmaların duyusal analizleri yapılmıştır. Duyusal değerlendirme öncesinde 10 panelist tadım yapacakları ürünler hakkında bilgilendirildikten sonra, rastgele seçilen üç basamaklı rakamlarla kodlanan ürünleri değerlendirmeleri istenmiştir. Değerlendirmede panelistlerin ürünleri, koku-aroma, tat (küf tadı, ransit tat, tuzlu, ekşi, aşırı tatlı), renk, yapı (kıvam, kumsu, yapışkan), ağızda bıraktığı his ve genel kabul edilebilirlik açısından değerlendirerek 0 ile 9 arasında puan vermeleri istenmiştir (Homayouni ve ark. 2008; Metin 2008).

3.2.12. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada gerçekleştirilen tüm mikrobiyolojik sayımlar 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Depolama süresince dondurmaların probiyotik bakteri sayısında meydana gelen değişim ve dondurmaların duyusal analizleri Oneway Anova testi

uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmadan elde edilen veriler SPSS 18.00 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kapsüldeki Probiyotik Mikroorganizma Sayıları

Lactobacillus acidophilus KPb1 ve *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 kültürleri yaklaşık 8-9 log kob/mL düzeyinde geliştirildikten sonra koazervasyon yöntemi ile kaplama işlemi uygulanmıştır. Kaplama işleminden sonra kapsüller bir gece buzdolabında bekletilmiş ve ardından kapsüller tekrar açılarak içerdikleri canlı mikroorganizma sayıları belirlenmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. Kapsüllerin içerdikleri probiyotik mikroorganizma sayıları

Mikroorganizma Adı	Canlı Bakteri Sayısı (log kob/g)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KPb1	8,60±0,276
<i>Lactobacillus reuteri</i> NRRL B-14171	7,23±0,162

Mikrobiyolojik sayım sonuçlarına göre *L. acidophilus* KPb1 kapsülleri içerisindeki mikroorganizma sayısı *L. reuteri* NRRL B-14171 kapsüllerinin içerdği mikroorganizma sayısından 1.37 log kob/g daha fazla bulunmuştur. Kaplama işleminden sonra, kapsüllerden alınan mikroorganizma sayım sonuçlarının birbirinden farklı olmasının nedeni; kapsüllerin farklı hızda açılmış olmaları veya kaplama esnasında iki farklı mikroorganizmanın farklı oranda canlılık kaybına uğramış olabileceği şeklinde düşünülmektedir.

4.2. Kapsül Boyutlarının Belirlenmesi

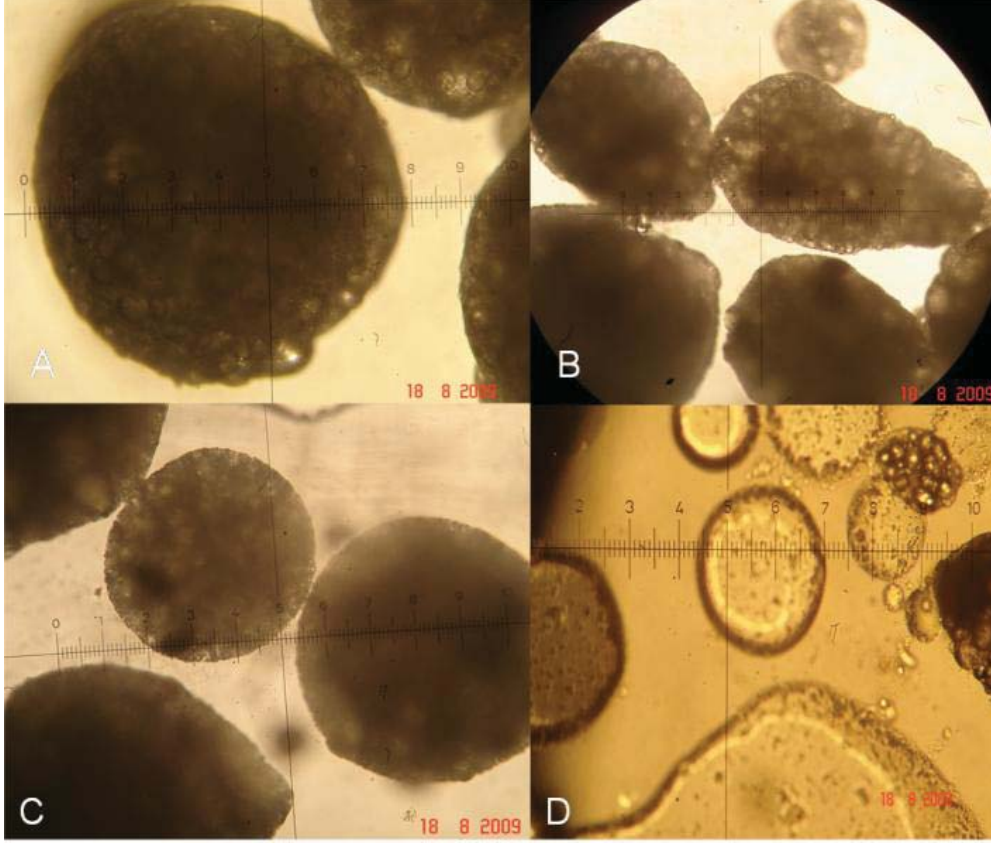
L. acidophilus KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürlerinin %2 aljinat+ %2 enzime dirençli mısır nişastası kullanılarak koazervasyon yöntemi ile hazırlanan kapsüllerinin boyutları aydınlık saha mikroskobunda ölçülmüş ve sonuçları Çizelge 5'te verilmiştir. Her bir mikroorganizma için seçilen 10 kapsülde, her bir kapsül için ise 2 ayrı eksenle ölçüm yapılarak sonuçların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

Çizelge 5. *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kapsüllerinin boyutları

Ölçüm Yapılan Kapsül	<i>L. acidophilus</i> KPb1 Kapsül Boyutu (µm)	<i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 Kapsül Boyutu (µm)
1. Kapsül	980	500
2. Kapsül	650	500
3. Kapsül	390	850
4. Kapsül	750	750
5. Kapsül	560	550
6. Kapsül	1000	500
7. Kapsül	850	300
8. Kapsül	800	950
9. Kapsül	900	400
10. Kapsül	500	650
Ortalama ± SD	738±207,407	595±203,374

Çizelge 5'te görüldüğü gibi *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürlerinin %2 aljinat+%2 enzime dirençli mısır nişastası ile kaplanması sonucu elde edilen kapsüllerin boyutları sırasıyla ortalama 738 µm ve 595 µm olduğu, kapsül boyutlarının 0,5- 1,0 mm arasında olduğu görülmüştür (Şekil 1). Sultana ve ark. (2000)'nin yaptıkları bir çalışmada *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium* spp. %2 aljinat+ %2 enzime dirençli mısır nişastası ile koazervasyon yöntemi ile kaplamışlar ve elde edilen kapsüllerin boyutlarının 0,5-1,0 mm arasında olduğunu

tespit etmişlerdir. Bu sonuç bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla uyum göstermektedir.

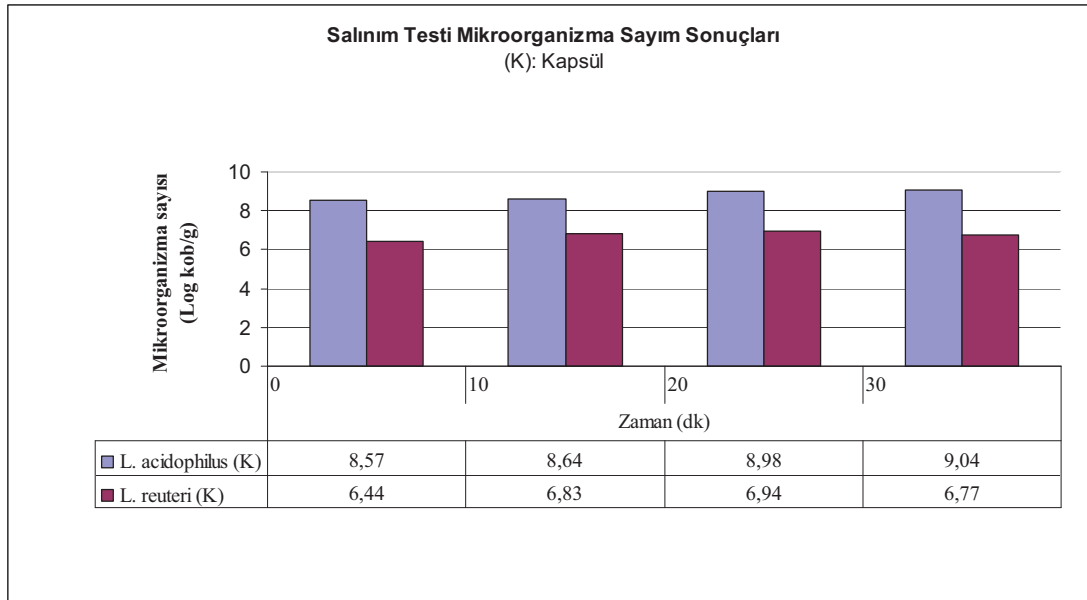


Şekil 1. *L. acidophilus* KPb1 (A, B) ve *L. reuteri* NRRL B-14171 (C, D) kapsüllerinin mikroskobik görüntüleri

4.3. Kapsüllerden Hücre Salınımı

L. acidophilus KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kapsüllerinin sindirim sisteminde ve/veya gıda ortamında kullanılması durumunda kapsüllerin fiziksel direncinin ve dolayısıyla kapsülden mikroorganizma salınım özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu denemenin sonuçları Şekil 2’de verilmiştir. Şekil 2 incelendiğinde *L. acidophilus* KPb1 kapsülünden salınımı ve

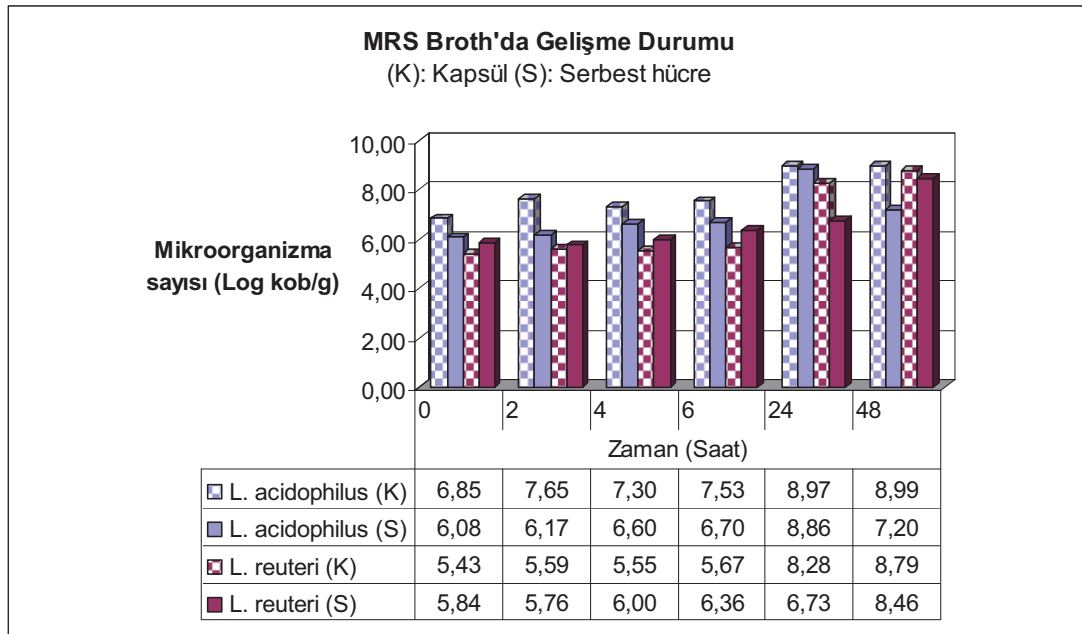
mikroorganizma sayısı 30 dk. boyunca giderek artarken, *L. reuteri* NRRL B-14171 kapsülünde ilk 20 dk.'da hücre salınımı ve mikroorganizma sayısı artış göstermiş, 20. dk.'dan sonra mikroorganizma sayısında 0,17 log kob/g düzeyinde çok az bir azalma gözlenmiştir. Ancak genel olarak bakıldığında kapsüllerin 30 dakika homojenizasyon işleminden sonra başlangıç mikroorganizma yüküne yakın bir sayıya sahip oldukları görülmektedir. Bu nedenle homojenizasyon işleminin kapsüldeki canlı mikroorganizma sayısı üzerinde olumsuz bir etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 2. *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kapsüllerinden bakteri salınım testi sonuçları

4.4. Kaplanmış ve Serbest Kùltürlerin Asidifikasyon Kinetiği Sonuçları

Kaplanmış ve serbest kùltürlerin asidifikasyon kinetiklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu denemede, kapsùl ve serbest formdaki *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171'in MRS Broth ve RSM ortamındaki gelişme durumları ve gelişme sonucu oluşan pH değışimleri incelenmiştir. Ayrıca serbest ve kapsùl formundaki bakterilerin bu özellikleri arasındaki farklar karşılaştırılmıştır. Kapsùl ve serbest formdaki *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171'in MRS Broth besiyerindeki gelişimleri ve pH değışimleri sırasıyla Şekil 3 ve Şekil 4'te verilmiştir.

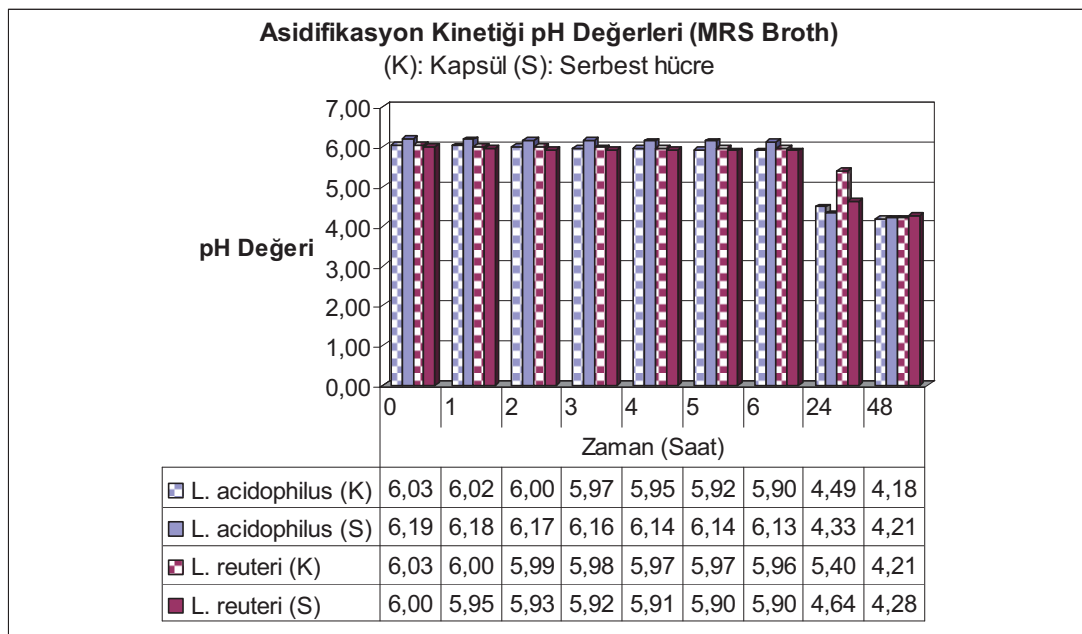


Şekil 3. Kaplanmış ve serbest kùltürlerin MRS Broth'da gelişme durumu

Şekil 3. incelendiğinde *L. acidophilus* KPb1'in kapsùl formunun MRS broth ortamında serbest formuna göre daha iyi geliştiği, 48 saat süresince *L. acidophilus* KPb1'in kapsùl formunun mikroorganizma sayısı artarken (2,14 log birimi), serbest formunda 24. saatten sonra mikroorganizma sayısında azalma (-1,66 log birimi)

olduğu görülmektedir. Mikroorganizmaların gelişme ortamlarında logaritmik gelişme evresinin sonlarına doğru ortamda biriken organik asit vb. metabolitler nedeniyle gelişmelerinde yavaşlama ve daha sonraki aşamalarda aktivitelerini yitirmektedirler. Bu denemede olduğu gibi, mikroorganizmalar kaplandıkları zaman çevrenin olumsuz etkilerinden korunmakta ve bulundukları ortamlarda canlılıklarını daha uzun süre devam ettirebilmektedir.

L. reuteri NRRL B-14171'in kapsül ve serbest formunun MRS ortamındaki gelişimlerine bakıldığında 48 saat boyunca serbest formdaki hücrelerin sayısında bir azalma gözlenmemiştir. Ancak gelişim hızlarına bakıldığında *L. reuteri* NRRL B-14171'in kapsül formunun mikroorganizma sayısında 24. saatin sonunda başlangıç sayısına göre 2.85 log birimi artış gözlenirken, serbest hücrelerin sayısının başlangıç sayısına göre 0.89 log birimi artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kaplama materyali bakteriyi iyi bir şekilde muhafaza ettiği için gelişimi daha hızlı, serbest hücreler çevre şartlarından olumsuz etkilendikleri için gelişimleri kapsül formuna göre daha yavaş gerçekleşmiştir.



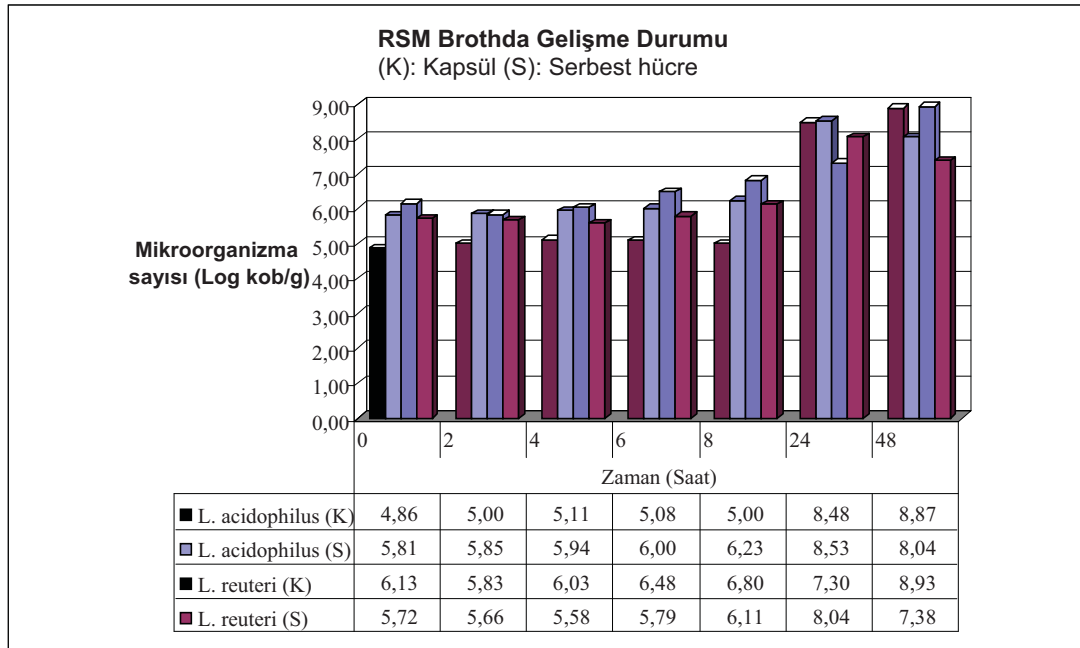
Şekil 4. MRS Brothda asidifikasyon kinetiği pH analiz sonuçları

Şekil 4 incelendiğinde *L. acidophilus* KPb1'in kapsül ve serbest formunun pH değişimleri ilk 6 saat birbiri ile paralel değişim göstermiş, ancak 6. ve 24. saatler arasında pH düşüşü serbest formdaki hücrelerde (1,8 birim) kapsül formundaki hücrelere göre (1,41 birim) daha hızlı olmuştur. Buna göre kapsül formundaki hücrelerde pH değişiminin serbest formdaki hücrelere göre daha istikrarlı olduğu görülmektedir. Araştırmada 48. saat sonunda serbest ve kaplanmış kültürlerin birbirlerine oldukça yakın bir pH değerine ulaştıkları görülmüştür.

L. reuteri NRRL B-14171'in kapsül ve serbest formundaki pH değişimleri incelendiğinde de yine ilk 6 saat birbirine paralel bir değişim gözlenmiş ancak 6. ve 24. saatler arasında serbest formdaki pH düşüşünün (1,24 birim) kapsül formuna oranla (0,56 birim) daha hızlı gerçekleştiği gözlenmiştir.

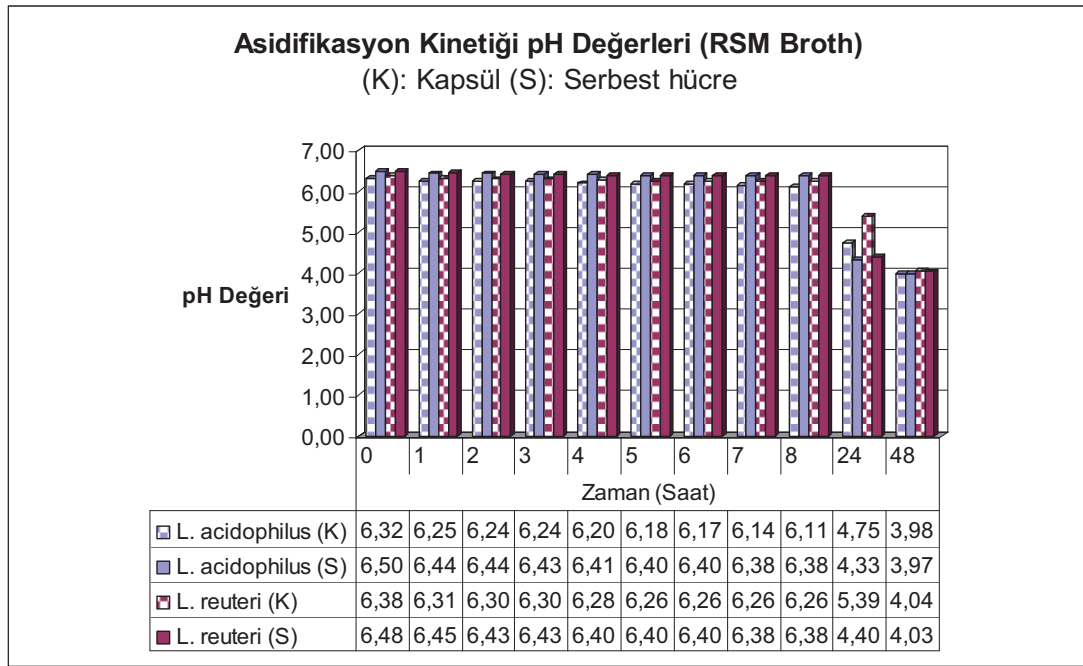
Mikroorganizmaların asidifikasyon kinetiği sonuçları birlikte incelendiğinde bakterilerin bir kaplama materyali ile kaplanması sonucu pH üzerindeki etkilerinin kontrol edilebileceği düşünülmektedir. Homayouni ve ark. (2008) tarafından yapılan benzer bir çalışmada kapsül ve serbest formlardaki *Lactobacillus casei* ve *Bifidobacterium lactis*'in MRS broth ortamındaki asidifikasyon kinetikleri incelenmiş ve bakterilerin her iki formlarının da pH'yı değiştirdiğini ancak aynı pH değerine kapsül formlarının serbest hücrelere göre daha uzun sürede ulaştıklarını tespit etmişlerdir. Bunun ise besin maddelerinin yavaş alınmasından ve metabolitlerin yavaş salınımından kaynaklandığını düşünmektedirler.

Kapsül ve serbest formdaki *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B14171'in RSM sıvı ortamındaki gelişimleri ve pH değişimleri Şekil 5 ve Şekil 6' da verilmiştir.



Şekil 5. RSM Brothda yapılan asidifikasyon kinetiği analizinde sayım sonuçları

Şekil 5 incelendiğinde *L. acidophilus* KPb1'in kapsül formunun RSM sıvı ortamında *L. acidophilus* KPb1'in serbest formuna göre daha iyi geliştiği görülmüştür. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda *L. acidophilus* KPb1'in kapsül formunun mikroorganizma sayısındaki artış (4,01 log birimi), serbest formundaki artışa (2,23 log birimi) göre daha fazla olmuştur. *L. acidophilus* KPb1'in serbest formunun mikroorganizma sayısı 24. saatten sonra azalmaya başlamıştır. Kapsül formunda ise artış devam etmiştir. *L. reuteri* NRRL B14171'in gelişme durumuna bakıldığında kapsül formunun mikroorganizma sayısındaki artışın (2,8 log birimi), serbest hücre formundaki artışa (1,66 log) göre daha fazla olduğu görülmüştür. *L. reuteri* NRRL B14171'de de *L. acidophilus* KPb1'de olduğu gibi serbest hücre formundaki mikroorganizma sayısı 24. saatin sonunda azalmaya başlamıştır. Kapsül formunda ise artış devam etmiştir.



Şekil 6. RSM brothda yapılan asidifikasyon kinetiği analizinde ölçülen pH değerleri

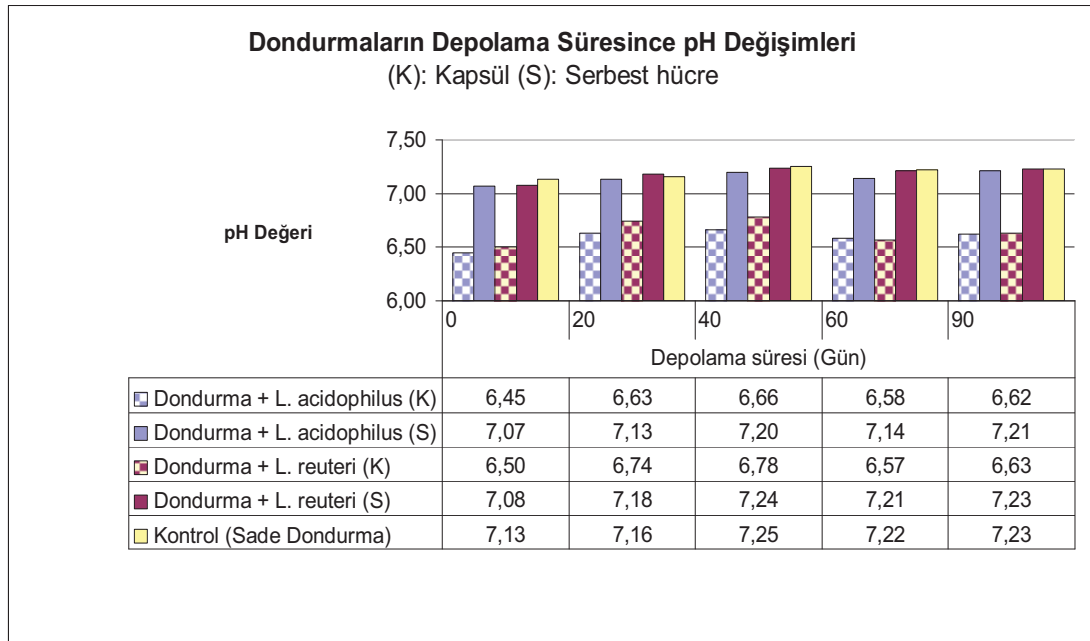
Şekil 6 incelendiğinde *L. acidophilus* KPb1'in kapsül ve serbest formlarının pH'yı düşürme hızları ve ulaştıkları son pH değerleri arasında önemli bir fark gözlenmemiştir.

L. reuteri NRRL B-14171'in kapsül ve serbest formları incelendiğinde ise pH değişimleri ilk 8 saat birbiri ile paralellik göstermiş ancak 8. ve 24. saatler arasında serbest formdaki pH düşüşü (1,98 birim) kapsül formundakine göre (0,87 birim) daha hızlı gerçekleşmiştir. *L. reuteri* NRRL B-14171'in kapsül ve serbest formları 48. saat sonunda birbirlerine oldukça yakın bir pH değerine ulaşmışlardır. Benzer bir çalışmada Sultana ve ark. (2000) *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium* spp.'nin RSM sıvı ortamındaki asidifikasyon kinetiklerini incelemiş kapsül formundaki hücrelerin aynı pH değerine serbest hücrelere göre daha uzun sürede ulaştığını tespit etmişlerdir.

4.5. Kaplanmış Probiyotik Kültür İçeren Dondurmaların Bazı Özellikleri

4.5.1. Depolama Süresince Dondurmalarındaki pH Değişimi

L. acidophilus KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171'in serbest ve kapsül formlarını içeren dondurmaların depolama süresince pH değişimlerinin incelendiği bu denemede, 0, 20, 40, 60 ve 90. günlerde dondurmaların pH değerleri ölçülmüş ve meydana gelen değişimler Şekil 7'de verilmiştir.



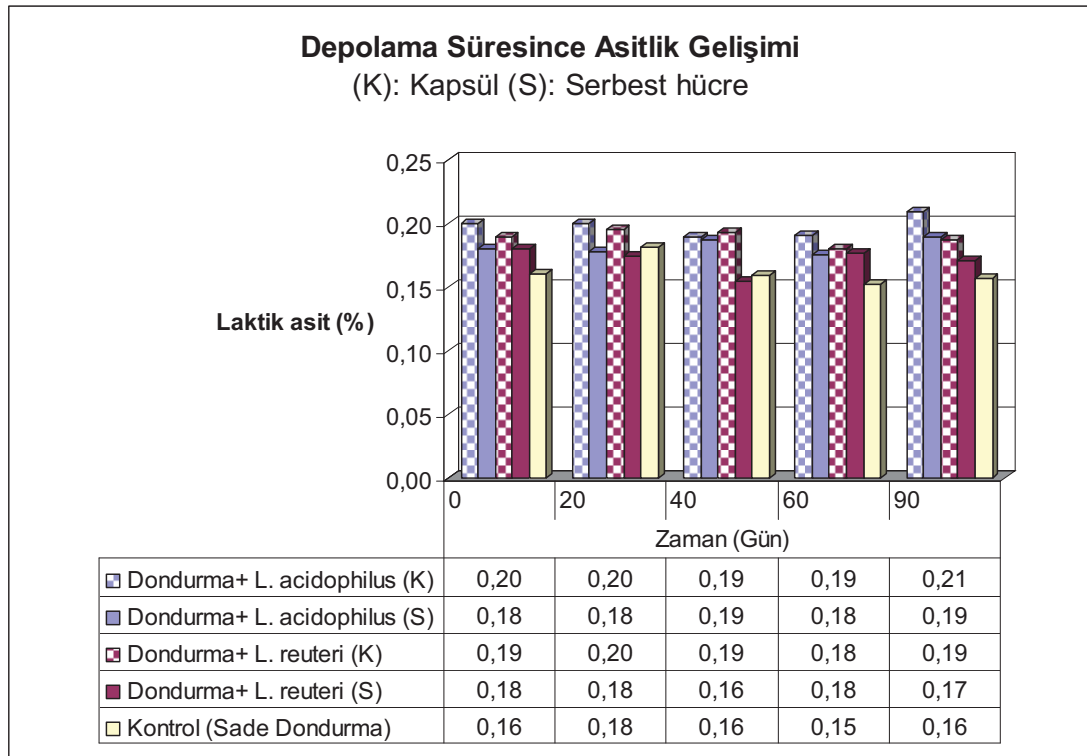
Şekil 7. Depolama süresince dondurmaların pH değişimleri

Şekil 7 incelendiğinde *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kapsüllerini içeren dondurmaların başlangıç pH'ları serbest hücre içerenlere ve kontrole göre biraz daha düşüktür. Bunun nedeninin koazervasyon ile kaplama işleminde kullanılan materyallerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Depolama süresince meydana gelen pH değişimlerine bakıldığında başlangıç pH'larına göre 0,5

pH biriminden daha az bir değişim gözlenmiştir ki bu beklenen bir sonuçtur. Probiyotik bakterilerin gıda ortamlarında kullanılmaları durumunda canlılıklarını korumaları istenirken sayılarının artması ise istenmemektedir. Raf ömrü süresince gıdada mikroorganizma gelişmesi gıdanın fiziksel, kimyasal ve duyuşsal özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır ki bu arzu edilmeyen bir durumdur. Bu denemede kullanılan mikroorganizmaların gerek serbest gerekse kaplanmış formlarının dondurulmuş bir gıda ortamında kullanılmasının pH'da dolayısıyla gıdada olumsuz bir değişime neden olmayacağı belirlenmiştir.

4.5.2. Depolama Süresince Dondurmalarındaki Asitlik Gelişimi

Kaplanmış ve serbest probiyotik kültür kullanımının dondurmalarındaki asitlik gelişimi üzerine etkisinin araştırıldığı bu denemenin sonuçları Şekil 8'de verilmiştir.

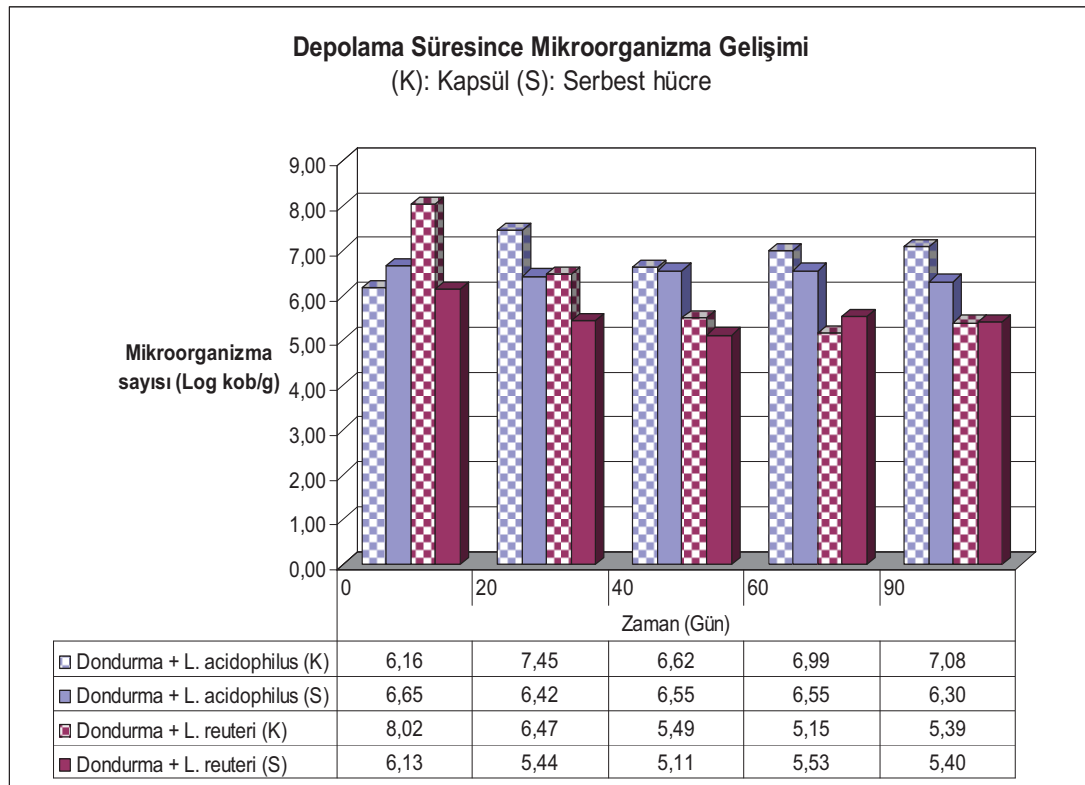


Şekil 8. Depolama süresince dondurmalarındaki asitlik gelişimi

Şekil 8 incelendiğinde depolama süresince dondurmalarda başlangıç miktarına göre önemli bir asitlik gelişiminin olmadığı gözlenmiştir. Kapsül ve serbest hücre içeren dondurmaların başlangıçtaki asitlik oranları kontrol grubuna göre biraz daha yüksektir. Bu da dondurmaya katılan serbest ve kaplanmış probiyotik kültürlerden kaynaklanmaktadır. Başlangıç ve sonuç % asitlik değerleri arasındaki farka bakıldığında % 0,01-0,02 birimlik bir değişim olduğu görülmektedir. Bu kadar düşük düzeyde bir değişimin de gıdanın duyuşsal niteliklerinde önemli bir fark oluşturmayacağı düşünülmektedir.

4.5.3. Depolama Süresince Dondurmalarda Probiyotik Bakteri Sayımı

Depolama süresince dondurmalarda 0., 20., 40., 60. ve 90. günlerde yapılan probiyotik bakteri sayımlarının sonuçları Şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 9. Depolama süresince dondurmaların mikrobiyolojik sayım sonuçları

Şekil 9 incelendiğinde depolama süresince başlangıç ve 90. günler arasında kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 içeren dondurmalarındaki probiyotik bakteri sayısında +0,92 log birimi artış; serbest *L. acidophilus* KPb1 içeren dondurmalarındaki probiyotik bakteri sayısında -0,35 log birimi azalma; kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 içeren dondurmalarındaki probiyotik bakteri sayısında -2,63 log birimi azalma ve serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 içeren dondurmalarındaki probiyotik bakteri sayısında -0,73 log birimi azalma meydana geldiği görülmektedir. Bu sonuçlara göre en yüksek azalma kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 sayısında meydana gelmiştir. Bunun dışında diğer deneme gruplarında meydana gelen değişiklik 1 log biriminden daha az düzeyde kalmıştır. Homayouni ve ark. (2008)'nin yaptıkları benzer bir çalışmada *L. casei* ve *B. lactis*'in serbest ve kapsül formları dondurmaya ilave edilmiş ve 180 gün -20°C'de depolanmıştır. Bu çalışma sonunda *L. casei*'nin serbest hücre formunun sayısında yaklaşık 3,4 log birimi azalma görülürken kapsül formundaki azalma 1,4 log birimi; *B. lactis*'in serbest formundaki azalma 2,9 log birimi, kapsül formundaki azalma ise 0,7 log birimi olarak tespit edilmiştir.

Depolama süresince dondurmalara ilave edilen kaplanmış ve serbest probiyotik bakteri sayısında meydana gelen değişimlerin istatistik değerlendirmesi Çizelge 6'da verilmiştir. Çizelge 6 incelendiğinde başlangıçta dondurmaya ilave edilen canlı probiyotik bakteri sayısının tüm deneme gruplarında aynı olmadığı görülmektedir. Buna göre 0. günde ürüne katılan bakteri sayılarından kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 ile serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 katılan ürünlerdeki bakteri sayıları arasında fark olmadığı ($P>0,05$); 90. gün sonunda bu farkın önemli hale geldiği buna karşın serbest ve kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 içeren ürünlerdeki bakteri sayısının birbiri ile aynı düzeye geldiği ($P>0,05$) tespit edilmiştir.

Buna karşın *L. acidophilus* KPb1 suşunun kaplanmış formu ilave edilen deneme grubundaki canlı bakteri sayısının serbest kültür ilave edilen dondurma örneklerinden farklı ($P \leq 0,05$) ve daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 6. Depolama süresince dondurmalarda probiyotik bakteri sayısında meydana gelen değişimler

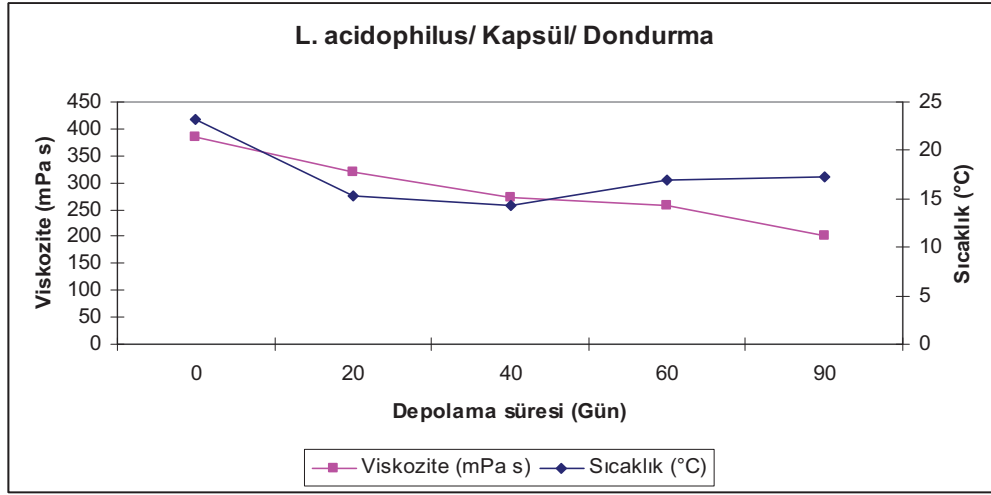
Deneme Grubu	Depolama Süresince Probiyotik Bakteri Sayısı (Ortalama $\pm$ SD)				
	0. Gün	20. Gün	40. Gün	60. Gün	90. Gün
Dondurma + <i>L. acidophilus</i> (K)	6,16 $\pm$ 0,060 ^a	7,45 $\pm$ 0,100 ^a	6,62 $\pm$ 0,080 ^a	6,99 $\pm$ 0,000 ^a	7,08 $\pm$ 0,000 ^a
Dondurma + <i>L. acidophilus</i> (S)	6,65 $\pm$ 0,060 ^b	6,42 $\pm$ 0,060 ^b	6,55 $\pm$ 0,070 ^a	6,55 $\pm$ 0,010 ^b	6,31 $\pm$ 0,040 ^b
Dondurma + <i>L. reuteri</i> (K)	8,02 $\pm$ 0,080 ^c	6,47 $\pm$ 0,010 ^b	5,49 $\pm$ 0,100 ^b	5,15 $\pm$ 0,000 ^c	5,39 $\pm$ 0,100 ^c
Dondurma + <i>L. reuteri</i> (S)	6,13 $\pm$ 0,060 ^a	5,44 $\pm$ 0,060 ^c	5,11 $\pm$ 0,010 ^c	5,53 $\pm$ 0,020 ^d	5,40 $\pm$ 0,050 ^c

Aynı sütundaki farklı harfler deneme gruplarına göre mikroorganizma sayısı ortalamaları (n=2) arasındaki farkın önemli ($P \leq 0,05$) olduğunu göstermektedir.
(K): Kapsül, (S): Serbest hücre

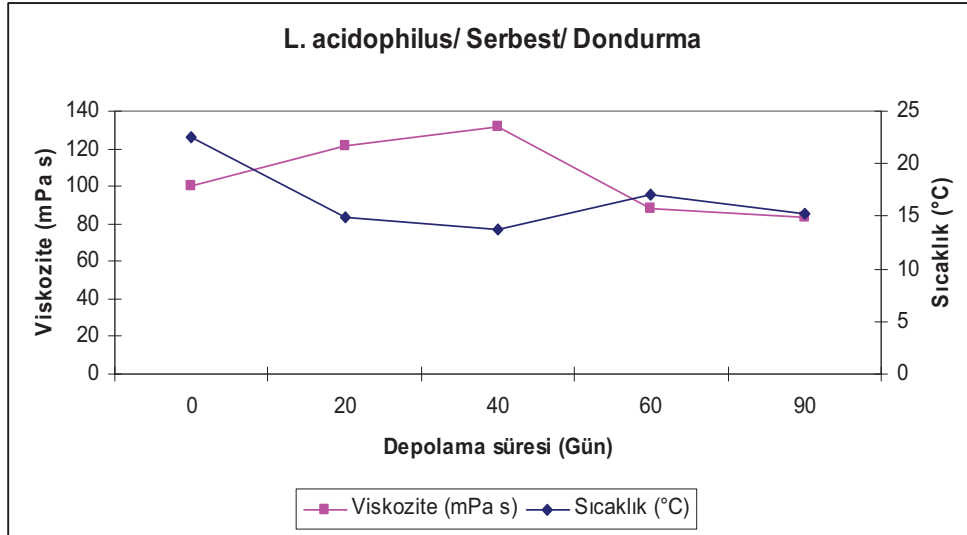
4.5.4. Depolama Süresince Dondurmaların Viskozitelerindeki Değişim

L. acidophilus KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 probiyotik kültürlerinin kapsül ve serbest formlarını içeren dondurmaların -18°C’de depolama süresince 0., 20., 40., 60. ve 90. günlerde yapılan viskozite ölçümlerinin sonuçları sırasıyla Şekil 10, 11, 12, 13 ve 14’de verilmiştir.

Şekil 10’ da görüldüğü gibi kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 içeren dondurmanın depolama boyunca viskozitesindeki değişim incelenmiş ve depolama sonunda 184 mPa s’ lik bir viskozite kaybının olduğu görülmüştür.

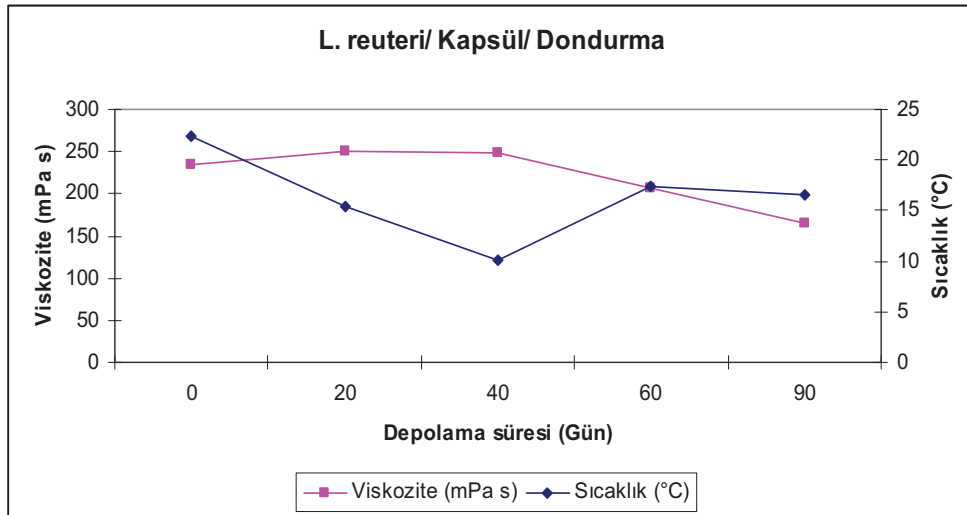


Şekil 10. Kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 içeren dondurmanın viskozite sonuçları



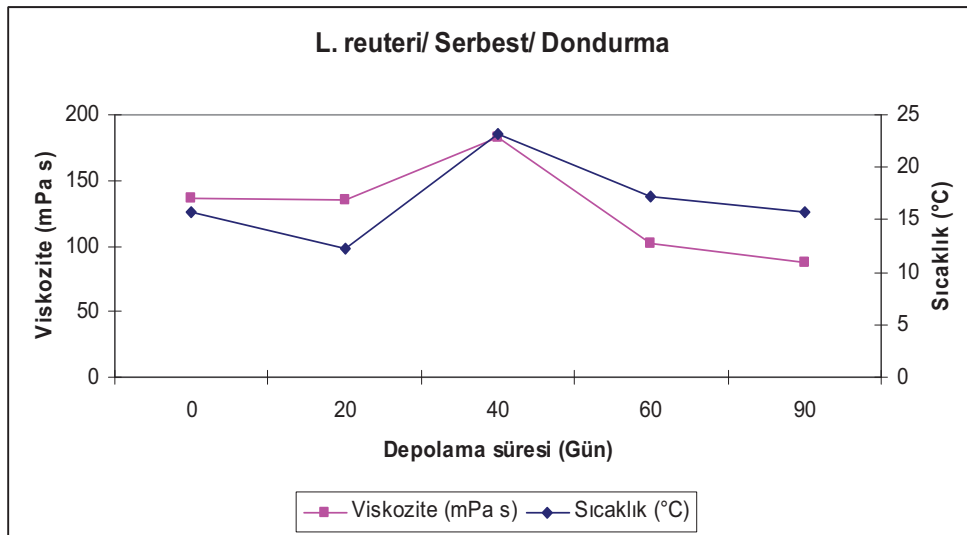
Şekil 11. Serbest *L. acidophilus* KPb1 içeren dondurmanın viskozite sonuçları

Şekil 11 incelendiğinde serbest *L. acidophilus* KPb1 içeren dondurmanın depolama sonundaki viskozite kaybının 17,26 mPa s olduğu tespit edilmiştir.



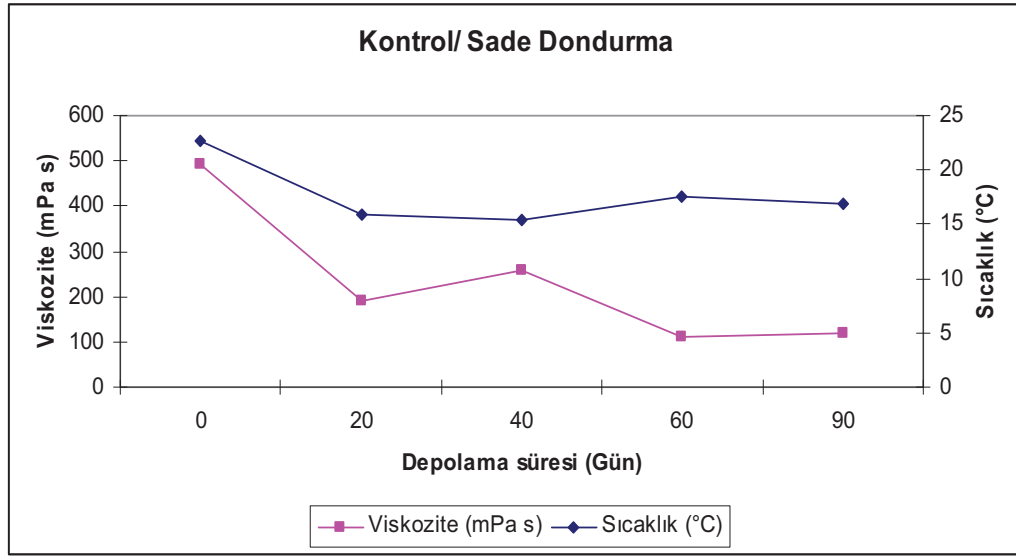
Şekil 12. Kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 içeren dondurmanın viskozite sonuçları

Şekil 12’ de görüldüğü gibi kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 içeren dondurmada depolama sonunda 70,28 mPa s’lik bir viskozite kaybı tespit edilmiştir.



Şekil 13. Serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 içeren dondurmanın viskozite sonuçları

Şekil 13 incelendiğinde serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 içeren dondurmanın depolama sonunda viskozitesinde 49,52 mPa s’lik bir kayıp meydana geldiği görülmektedir.



Şekil 14. Kontrol/ sade dondurmanın viskozite sonuçları

Şekil 14 incelendiğinde kontrol/ sade dondurmanın depolama sonundaki viskozite kaybının 372,75 mPa s olduğu görülmüştür.

L. acidophilus KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171'in serbest ve kapsül formlarını içeren ve sade dondurmada (kontrol) meydana gelen viskozite kayıpları karşılaştırıldığında kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 içeren dondurmada %47,69, serbest *L. acidophilus* KPb1 içeren dondurmada %17,20, kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 içeren dondurmada %29,93, serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 içeren dondurmada %36,20, sade dondurmada (kontrol) %75,55 viskozite kaybı meydana gelmiştir. Kaplanmış ve serbest probiyotik kültür kullanımının viskoziteye etkisi açısından değerlendirildiğinde *L. acidophilus* KPb1 kültüründe kaplanmış kültür katılan numunelerde viskozite kaybı daha yüksek çıkarken; *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü katılan dondurmalarda, serbest probiyotik kültür katılan numunelerde viskozite kaybı daha yüksek oranda meydana gelmiştir. Diğer yandan kontrol olarak hazırlanan sade dondurmada meydana gelen viskozite kaybının, serbest veya

kaplanmış probiyotik kültür katılan dondurmalarındaki viskozite kaybından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.5.5. Dondurmaların Depolama Öncesi ve Sonrası Duyusal Analiz Sonuçları

Kaplanmış ve serbest formdaki *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 probiyotik kültürlerinin dondurmanın duyusal özellikleri üzerine etkisini incelemek amacıyla depolama öncesi ve sonrasında duyusal analizler gerçekleştirilmiştir. Depolama öncesi ve sonrasında yapılan duyusal analizlerde panelistler tarafından her dondurma örneği için, belirlenen özelliklere verilen puanların ortalamaları ve standart sapmaları Çizelge 7 ve Çizelge 8’de verilmiştir. Bu çizelgelerde ayrıca deneme ve kontrol gruplarının her bir özellik açısından ayrı ayrı karşılaştırılması da görülmektedir. Her bir deneme grubu ile kontrol gruplarının genel beğeni açısından almış oldukları puanlar ise Şekil 15 ve Şekil 16’da verilmiştir.

Çizelge 7 incelendiğinde depolama öncesi yapılan duyusal analizlerde *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 probiyotik kültürlerinin serbest ve kaplanmış formlarını içeren dondurmalarla, kontrol grubu arasında koku ve aroma özellikleri bakımından önemli bir fark görülmemiştir ($P>0,05$). Tat özellikleri incelendiğinde küf tadı, ransit tat ve tuzluluk bakımından da önemli bir fark görülmemiştir ($P>0,05$).

Çizelge 7. Dondurmaların depolama öncesi duyu analiz sonuçları (Ortalama±SD)

	Koku - aroma	Tat			Renk	Yapı		Ağızda braktığı his	Genel beğeni
		Kiif tadı	Ransit tat	Tuzlu		Ekşi	Aşırı tatlı		
						Kıvam	Kumsu yapı	Yapışkan	
<i>L. acidophilus</i> (K)	5,70±2,497 ^a	6,50±2,550 ^a	5,80±2,300 ^a	6,10±2,079 ^a	6,00±1,943 ^a	3,20±1,690 ^a	2,40±2,171 ^a	5,90±2,380 ^a	2,20±1,700 ^a
<i>L. acidophilus</i> (S)	5,10±2,558 ^a	6,70±2,214 ^a	6,20±2,394 ^a	7,10±1,600 ^a	6,40±2,171 ^{ab}	5,30±2,163 ^{bc}	5,40±2,720 ^{bc}	6,60±1,840 ^a	4,20±2,660 ^{ab}
<i>L. reuteri</i> (K)	4,80±2,486 ^a	6,40±2,875 ^a	5,80±2,573 ^a	6,10±2,470 ^a	6,40±2,070 ^{ab}	3,90±1,600 ^{ab}	3,70±2,870 ^{ab}	6,40±2,413 ^a	3,00±2,055 ^a
<i>L. reuteri</i> (S)	5,10±2,514 ^a	7,80±1,317 ^a	7,20±1,932 ^a	7,50±2,013 ^a	8,20±1,230 ^b	6,20±2,150 ^c	6,60±1,960 ^c	6,30±1,890 ^a	5,40±1,960 ^b
Kontrol (Sade Dondurma)	5,90±2,132 ^a	8,10±1,912 ^a	7,80±2,251 ^a	7,60±2,320 ^a	7,40±2,271 ^{ab}	6,00±2,790 ^c	6,30±2,910 ^c	6,20±2,534 ^a	5,80±2,251 ^b

Aynı sütündeki farklı harfler panelistlerden (n=10) alınan puanların ortalamaları arasındaki farkın önemli ($P \leq 0,05$) olduğunu göstermektedir.

(K): Kapsül (S): Serbest hücre

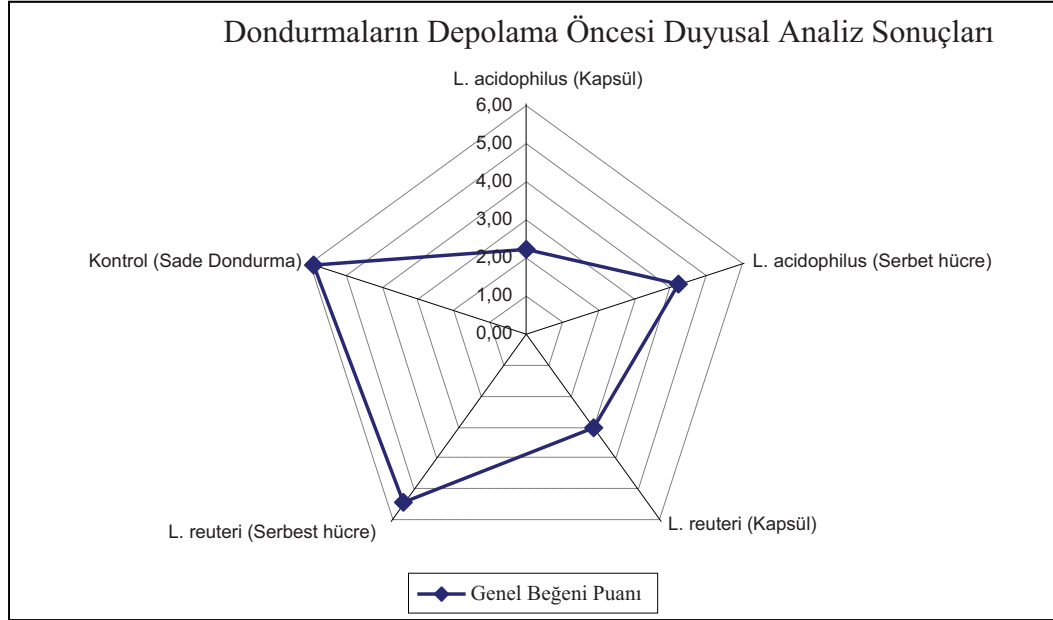
Buna karşın ekşi tat özellikleri bakımından kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma ($6,00 \pm 1,943$) ve kontrol grubu ($7,40 \pm 2,27$) arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Serbest *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma numunelerinin ($6,40 \pm 2,171$) ve kontrol grubu ($7,40 \pm 2,271$) arasındaki fark istatistikî açıdan önemli bulunmamıştır ($P > 0,05$). Ekşi tat kriteri açısından serbest ve kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurmalar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($6,40 \pm 2,070$) ile kontrol grubu ($7,40 \pm 2,271$) arasında önemli bir fark görülmemiştir ($P > 0,05$). Serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($8,20 \pm 1,230$) ile kontrol grubu ($7,40 \pm 2,271$) arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Serbest ve kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurmalar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Aşırı tatlılık bakımından incelendiğinde serbest *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma numuneleri ($5,30 \pm 2,163$) ve kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma numuneleri ($3,20 \pm 1,690$) ile kontrol grubu ($6,00 \pm 2,790$) karşılaştırıldığında aralarındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir. ($P \leq 0,05$). Serbest ve kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurmalar kontrol grubuna göre daha az tatlı bulunmuştur. Buna karşın serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma numuneleri ($6,20 \pm 2,150$) ile kontrol grubu ($6,00 \pm 2,790$) arasında önemli bir fark görülmemiştir ($P > 0,05$). Kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($3,90 \pm 1,600$) ile kontrol grubu ($6,00 \pm 2,790$) arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$).

Renk özelliklerine bakıldığında gruplar arasında önemli bir fark görülmemiştir ($P > 0,05$). Yapı özellikleri incelendiğinde kıvam ve yapışkanlık özellikleri bakımından gruplar arasında önemli bir fark görülmemiştir ($P > 0,05$).

Kumsu yapı özellikleri bakımından ise kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma numuneleri ($2,40 \pm 2,171$) ile kontrol grubu ($6,30 \pm 2,910$) arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Kumsu yapı kriteri açısından serbest *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma numuneleri ($5,40 \pm 2,720$) ile kontrol grubu sade dondurma ($6,30 \pm 2,910$) karşılaştırıldığında aralarındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($P \leq 0,05$). Kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($3,70 \pm 2,870$) ile kontrol grubu ($6,30 \pm 2,910$) arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($6,60 \pm 1,960$) ile kontrol grubu arasında önemli bir fark görülmemiştir ($P > 0,05$).

Kumsu yapı açısından kontrol grubuna göre en düşük puan kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurmalarda görülmüştür. Dondurmaların ağızda bıraktığı his değerlendirmelerinde kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma ($2,00 \pm 1,700$) ve serbest hücre içeren dondurma ($4,10 \pm 2,600$) ile kontrol grubu ($5,60 \pm 2,271$) arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Kaplanmış *L. reuteri*'nin kapsül formunu içeren dondurma ($2,80 \pm 2,251$) ile kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($5,40 \pm 2,011$) ile kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunmamıştır ($P > 0,05$). Ağızda bıraktığı his bakımından en iyi puanı kontrol grubu almış, bunu sırasıyla serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ve *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma almıştır. Genel beğeni açısından bakıldığında kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma ($2,20 \pm 1,550$) ve serbest hücre formunu içeren dondurma ($4,20 \pm 2,660$) ile kontrol grubu ($5,80 \pm 2,251$) arasındaki fark önemli görülmüştür ($P \leq 0,05$). Kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($3,00 \pm 2,055$) ile kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Buna karşın serbest *L. reuteri* NRRL B-14171

kültürü içeren dondurma ($5,40 \pm 1,960$) ile kontrol grubu arasında önemli bir fark görülmemiştir ($P > 0,05$).



Şekil 15. Dondurma numunelerinin depolama öncesi duyusal değerlendirme – genel beğeni sonuçları

Şekil 15’te görüldüğü gibi dondurmaların duyusal değerlendirme genel beğeni sonuçları incelendiğinde en yüksek puanı kontrol grubu alırken ($5,80 \pm 2,251$) bunu sırasıyla serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 ($5,40 \pm 1,960$) ve serbest *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma numuneleri ($4,20 \pm 2,660$) izlemektedir. Genel beğeni açısından en düşük puanı ise kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma numuneleri ($2,20 \pm 1,550$) almıştır.

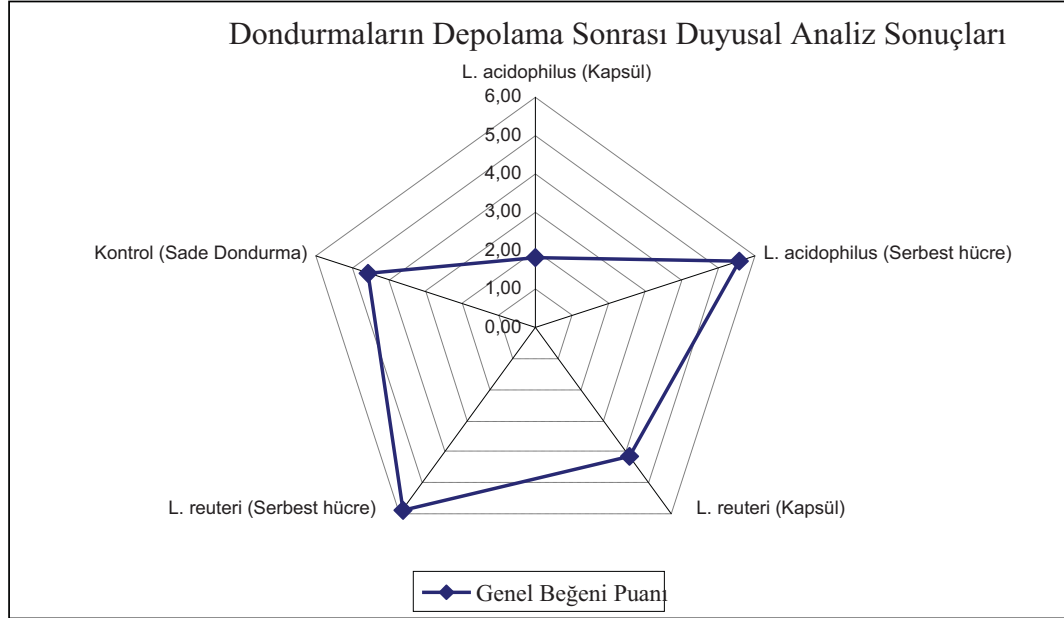
Çizelge 8. Dondurmaların depolama sonrası duyu analizi sonuçları (Ortalama±SD)

Koku - aroma	Tat			Renk	Yapı		Ağızda bıraktığı his	Genel beğeni				
	Küf tadı	Ransit tat	Tuzlu		Ekşi	Aşırı tatlı			Kıvam	Kumsu yapı	Yapışkan	
<i>L. acidophilus</i> (K)	5,40±2,320 ^a	6,70±1,770 ^a	5,50±2,070 ^a	6,50±2,680 ^a	6,10±2,331 ^a	4,00±3,130 ^a	6,00±1,830 ^a	3,70±2,111 ^a	2,10±2,024 ^a	5,40±2,011 ^a	2,30±2,003 ^a	1,80±1,480 ^a
<i>L. acidophilus</i> (S)	4,40±1,350 ^a	7,60±1,580 ^a	6,70±2,111 ^a	7,80±1,033 ^a	7,40±1,430 ^a	5,40±2,413 ^a	5,40±2,591 ^a	5,70±2,065 ^a	5,10±2,644 ^c	6,60±1,780 ^a	5,30±2,060 ^b	5,60±2,120 ^b
<i>L. reuteri</i> (K)	5,40±1,841 ^a	7,10±2,380 ^a	6,70±2,065 ^a	7,00±1,700 ^a	6,70±2,003 ^a	4,90±2,478 ^a	6,40±2,503 ^a	5,40±2,633 ^a	2,70±1,899 ^{ab}	5,80±2,300 ^a	4,10±2,514 ^{ab}	4,20±2,900 ^b
<i>L. reuteri</i> (S)	5,10±2,514 ^a	7,40±1,840 ^a	7,10±2,331 ^a	8,10±1,010 ^a	6,10±3,350 ^a	6,20±2,620 ^a	6,60±2,550 ^a	5,60±2,127 ^a	4,90±2,961 ^{bc}	5,60±2,675 ^a	6,00±2,404 ^b	5,90±2,183 ^b
Kontrol (Sade Dondurma)	4,80±2,490 ^a	7,60±2,320 ^a	6,30±2,983 ^a	8,10±0,990 ^a	6,50±2,720 ^a	6,20±2,440 ^a	6,20±1,751 ^a	5,50±2,516 ^a	5,60±2,760 ^c	5,90±2,601 ^a	4,70±2,584 ^b	4,60±2,591 ^b

Aynı sütündeki farklı harfler panelistlerden (n=10) alınan puanların ortalamaları arasındaki farkın önemli ($P \leq 0,05$) olduğunu göstermektedir.
(K): Kapsül (S): Serbest hücre

Çizelge 8 incelendiğinde dondurmaların depolama sonrası yapılan duyusal analiz sonuçlarına göre serbest *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren numunelerle, serbest ve kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurmalar ve kontrol grubu sade dondurma arasında koku ve aroma, tat, renk, kıvam ve yapışkanlık özellikleri bakımından önemli bir fark tespit edilmemiştir ($P>0,05$). Kumsu yapı kriteri açısından duyusal analiz sonuçlarına bakıldığında kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma ($2,10\pm 2,024$), serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($4,90\pm 2,961$) ve kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($2,70\pm 1,899$), kontrol grubu sade dondurma ($5,60\pm 2,760$) ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli bulunmuştur ($P\leq 0,05$). Serbest *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma ($5,10\pm 2,644$) ile kontrol grubu arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Dondurmaların ağızda bıraktığı his değerlendirmesinde kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma ($2,30\pm 2,003$) ile kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($4,10\pm 2,514$) ve kontrol grubu sade dondurma ($4,70\pm 2,584$) arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P\leq 0,05$). Serbest kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma ($5,30\pm 2,060$) ile serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ($6,00\pm 2,404$) ve kontrol grubu arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Dondurmalarından ağızda bıraktığı his bakımından en yüksek puanı serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma numuneleri alırken bunu sırasıyla serbest kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma numuneleri ve kontrol grubu sade dondurma izlemektedir. Dondurmalar genel beğeni açısından değerlendirildiğinde serbest *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma, kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma, serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma ve kontrol grubu sade dondurma arasında

önemli bir fark bulunmazken ($P>0,05$); kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma ($1,80\pm1,480$) ile kontrol grubu ($4,60\pm2,591$) arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($P\leq0,05$).



Şekil 16. Dondurma numunelerinin depolama sonrası duyusal değerlendirme – genel beğeni sonuçları

Şekil 16 incelendiğinde dondurma numunelerinin depolama sonrası genel beğeni sonuçlarına göre en yüksek puanı serbest *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma alırken bunu sırasıyla; serbest *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma, kontrol grubu sade dondurma ve kaplanmış *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürü içeren dondurma numuneleri izlemektedir. Genel beğeni açısından en düşük puanı ise kaplanmış *L. acidophilus* KPb1 kültürü içeren dondurma numunesi aldığı belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu araştırmada probiyotik özellikleri bilinen biri yerel diğeri standart suş olmak üzere 2 adet laktik asit bakterisinin koazervasyon yöntemi kullanılarak aljinat ve enzime dirençli mısır nişastası ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Üretilen kapsüllerin salınım özellikleri ve asidifikasyon kinetiği, belirlenmiştir. Ayrıca araştırmada kapsüller model bir gıda ortamına ilave edilerek depolama stabilitesi, gıdanın pH, asitlik, viskozite ve duyuşal özellikleri incelenmiştir.

Koazervasyon yöntemi ile kapladığımız *L. acidophilus* KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürlerinin kapsül içindeki sayıları tespit edilmiş, kaplama işleminin başarıyla gerçekleştiği görülmüştür.

L. acidophilu KPb1 ve *L. reuteri* NRRL B-14171 kültürlerinin % 2 aljinat+ % 2 enzime dirençli mısır nişastası ile kaplanması sonucu elde edilen kapsüllerin aydınlık saha mikroskobunda boyut ölçümleri yapılmış ve ortalama boyutları sırasıyla 595 µm ile 738 µm arasında bulunmuştur. Buna göre koazervasyon yöntemiyle elde edilen kapsüllerin boyutlarının bazı gıda ortamında kullanılmalarına engel teşkil etmeyeceği düşünülmektedir.

Elde edilen kapsüllerin mikroorganizma salınım özellikleri incelendiğinde kaplama işleminin hücreleri dış ortamdan koruduğu ve salınımın kontrollü bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür.

Kaplanmış ve serbest formdaki bakterilerin MRS sıvı ortamındaki gelişimleri incelendiğinde, *L. acidophilus* KPb1'in serbest formunun

mikroorganizma sayısının ilk 24 saat artış gösterdiği ancak 24. saatten sonra mikroorganizma sayısında azalma meydana geldiği; kapsül formunda ise mikroorganizma sayısının 48 saat süresince artış gösterdiği tespit edilmiştir. Serbest hücrelerin açığa çıkan çeşitli metabolitler ve çevrenin olumsuz şartlarından (oksijen, ışık vs.) etkilenmiş olabileceği, kaplama materyalinin bu olumsuz etkileri azalttığı düşünülmektedir.

L. reuteri NRLL B-14171'in kapsül ve serbest formunun MRS sıvı ortamındaki gelişimlerine bakıldığında 48 saat boyunca serbest formdaki hücrelerin sayısında bir azalma gözlenmemiştir. Ancak gelişim hızlarına bakıldığında kapsül formunun başlangıç sayısına göre daha fazla artış gösterdiği, serbest formundaki artışın ise kapsül formuna kıyasla oldukça az olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun kaplama materyalinin hücreleri çevrenin olumsuz etkilerinden koruduğunu gösterdiği düşünülmektedir.

MRS sıvı ortamında pH değişimleri incelendiğinde; pH'yı her iki bakterininde kapsül formlarının serbest formlarına göre daha yavaş düşürdüğü görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak probiyotik kültürlerle mikroenkapsülasyon uygulamasının raf ömrü süresince pH'da meydana gelecek değişiklikleri sınırlandırdığı, dolayısıyla gıdanın başlangıçtaki yapısının daha iyi korunabildiği belirlenmiştir.

RSM sıvı ortamındaki pH değişimlerine bakıldığında; *L. acidophilus* KPb1'in kapsül ve serbest formlarının pH'yı düşürme hızları ve ulaştıkları son pH değerleri arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. *L. reuteri* NRRL B-14171'in ise serbest formunun kapsül formuna göre pH'yı daha hızlı düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Koazervasyon yöntemiyle elde edilen kapsüller ve serbest hücreler model gıda ortamı olarak seçilen dondurmada -18°C'de 90 gün süresince depolanmıştır.

Başlangıçta elde edilen verilere göre deneme gruplarının genel beğeni açısından aldıkları puanlar kontrol grubundan düşük olmasına rağmen 90. gün sonunda serbest probiyotik kültür içeren deneme gruplarının kontrole ve kaplama işlemi uygulanan gruplara göre daha yüksek puan aldıkları belirlenmiştir.

İki farklı yöntemle probiyotik kültür katılan dondurmalarda depolama süresince pH değişiminin kontrol altında tutulabileceği tespit edilmiştir. Depolama işleminde uygulanan sıcaklık derecesinin de bu değişimde etkili olabileceği belirlenmiştir.

L. acidophilus KPb1 ve *L. reuteri* NRLL B-14171'in serbest ve kapsül formunu içeren dondurmalarda depolama boyunca belli aralıklarla yapılan mikrobiyolojik sayımların sonuçlarında kaplanmış ve serbest probiyotik kültürler arasında bir fark gözlenememiştir. Ancak depolama süresinin arttırılması ve/veya farklı depolama sıcaklıklarında gerçekleştirilecek ayrıntılı çalışmalarla mikroorganizmaya özgü depolama sürelerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Dondurmaların depolanma süresince viskozitelerinde meydana gelen değişime bakıldığında kontrol olarak hazırlanan sade dondurmada meydana gelen viskozite kaybının, serbest veya kaplanmış probiyotik kültür katılan dondurmalaradaki kayıptan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışma sonucunda koazervasyon yöntemi ile elde edilen kapsüllerin gıda ortamına katılabilir boyutlarda olduğu, mikroorganizma salınımının kontrollü bir şekilde gerçekleştiği buna bağlı olarak pH değişimlerinin daha stabil olduğu görülmüştür. Yapılan duyusal analiz sonuçları incelendiğinde koazervasyon yöntemi ile % 2 aljinat+ % 2 enzime dirençli mısır nişastası ile kaplanan *L. acidophilus* ve *L. reuteri*'nin katıldıkları gıda ortamında duyusal açıdan önemli bir

olumsuzluk meydana getirmeyeceği düşünölmektedir. Yapılan birçok çalışmada da kaplama işleminin gıdanın duyuşal özelliklerini etkilemediği görölmüşür.

Yapılan literatür çalışmasında koazervayon yöntemi ile probiyotiklerin kaplanmasına yönelik çok fazla çalışmaya rastlanılmamışür. Bu nedenle bu yöntemin diğer kaplama yöntemlerine göre daha kolay ve uygulanabilir olması, kısa sürede sonuç elde edilebilmesi ve herhangi bir cihaza gereksinim duyuşmaması gibi özelliklerinden dolayı alternatif bir yöntem olabileceği düşünölmektedir. Koazervasyon yönteminin probiyotik kültürlerin kaplanmasında ve bu bakterilerin gıda ortamlarında kullanılabilirlik potansiyelinin araştırılmasında kaplama maliyet, kaplanan kültürlerin birim fiyatı vb. kriterler açısından da değeriendirildiği daha fazla çalışmanın yapılması ve böylece gıda sanayiinde verimli bir şekilde kullanılabilme potansiyelinin saptanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. U. and Fernando, L. 2000. Viability of Microencapsulated *Bifidobacteria* in Set Yogurt During Refrigerated Storage. *Journal of Dairy Science*, 83: 1946–1951.

Aloğlu, H. 2005. Bazı Laktik Asit bakterilerinin Kullanımı ile Kolesterolün Azaltılması. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta, s. 66.

Alp, G. 2008. *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, s.102.

Anal, A. K. and Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18: 240-251.

Armbrecht, J. 2002. Probiotics and possible health benefits. <http://www.bact.wisc.edu/ScienceEd/probioticsandpossibl.html>.

Aso, Y. and Akazan, H. 1992. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urologia Internationalis*, 49: 125-129.

Augustin, M. A., Sanguansri, L., Margetts, C. and Young, B. 2001. Microencapsulation of food ingredients. *Food Australia*, 53: 220-223.

Başığit, G. 2004. Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılma özellikleri. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta, s. 96.

Berman, S. H. 2009. The Quality Control of Probiotics in Food and Dietary Supplements. In: Michail, S. and Sherman, P. M. (eds.) *Probiotics in Pediatric Medicine*, Humana Pres. NJ, USA. pp: 333-344.

Boh, B. 2009. Chemical Methods of Microencapsulation. (Course Notes), COST865 Summer School on Bioencapsulation, Anzere, Switzerland, p. 194.

Brudnak, M. A. 2003. *The Probiotic Solution*. Dragon Door Publication Inc., USA. p. 164.

Brückner, M., Bade, M. and Kunz, B. 2007. Investigations into the stabilization of a volatile aroma compound using a combined emulsification and spray drying process. *European Food Research and Technology*, 226: 137-146.

Calleros, C. L., Hernández, M. C., Zambrano, C. C., Castilla, O. S., Romero, S. M., Orozco, Y. H. and Carter, E. J. V. 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* 81 LYO using sodium alginate blended with amidated low-methoxyl pectin or modified starch as wall materials: viability in yogurt. *Acta Microscopica*, 16: 1-2.

Castagliuola, L., Riegler, M. F., Valenick, L., LaMont, J. T. and Pathoulakis, C. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *C. difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infection and Immunity*, 67: 302-307.

Cedgard, L. 2001. Probiotics: The link between health and disease. <http://www.positivehealth.com/permit/Articles/Environment/probiot.htm>.

Champagne, C. P., Gardner, N. J. and Roy, D. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:61–84.

Champagne, C. P. and Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 184-190.

Champagne, C. P. 2009. Some Technological Challenges in the Addition of Probiotic Bacteria to Foods. In: Charalampopoulos, D. and Rastall, R. A. (eds.). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer Science+Business Media, LLC. NY, USA. pp: 761- 804.

Chandramoulia, V., Kailasapathya, K., Peirisb, P. and Jonesb, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiol Methods*, 56: 27- 35.

Collins, J. W., La Ragione, R. M., Woodward, M. J. and Searle, L. E. J. 2009. Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. In: Charalampopoulos, D. and Rastall, R. A. (eds.). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer Science+Business Media, LLC. NY, USA. pp: 1123-1192.

Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L. and Augustin, M. 2006. Symbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2280-2282.

Cucchiara, S. and Aloï, M. 2009. Role of Microflora in Disease. In: Michail, S. and Sherman, P. M. (eds.) *Probiotics in Pediatric Medicine*, Humana Pres. NJ, USA. pp: 29-39.

Çakır, İ., İşleyen, M. F. ve Erge, H. S. 2010. Probiyotiklerde mikroenkapsülasyon tekniğinin mikrobiyolojik stabilite, oksijen toksisitesi, *in vitro* protein sindirilebilirliği ve duysal özellikler üzerine etkilerinin araştırılması. Tübitak Projesi Kesin Raporu (Yayınlanmamış) (Proje no: 1060559).

Çakır, İ. 2005. Fonksiyonel gıdalar ve probiyotikler. Kongre Kitabı. pp. 57-69. 4. Gıda Mühendisliği Kongresi, 29 Eylül-1 Ekim 2005, Ankara.

Çakır, İ., Karahan, A. G. ve Çakmakçı, M. L. 2001. Probiotic and functional properties of some traditional Turkish foods, 1st Euroasian Congress on Molecular Biotechnology, Trabzon. pp: 89-93.

Çakır, İ., Karahan, A. G. ve Çakmakçı, M. L. 2002. Probiyotikler ve etki mekanizmaları. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 6 (12): 15-19.

Çakır, İ. 2003. Laktobasillus ve bifidobakterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, s. 84.

Çayır, M. S. 2007. Probiyotik kullanılarak üretilen kayısı katkılı yoğurtların bazı özellikleri. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, s. 57.

da Silva Bastos, D., de Lima Araújo, K. G. and da Rocha Leão, M. H. M. 2009. Ascorbic acid retaining using a new calcium alginate-capsul based edible film, *Journal of Microencapsulation*, 26 (2): 97-103.

Desai, K. G. H. and Park, H. J. 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23: 1361–1394.

Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. and Ross, R. P. 2004. Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei*, NFBC338. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5929-5936.

Ding, W. K. and Shah, N. P. 2007. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science* Vol. 72 (9): M446-M450.

Ersus, S. 2006. Kara havuç (*Daucus carota* L.) antosiyanin ekstraktının püskürtmeli kurutucu kullanılarak mikroenkapsülasyonu. Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi. 2002/MUH/013. İzmir.

Fasano, A. and Shea-Donohue, T. 2009. Basics of GI Physiology and Mucosal Immunology. In: Michail, S. and Sherman, P. M. (eds.) *Probiotics in Pediatric Medicine*, Humana Pres. NJ, USA. pp: 3-16.

Gardiner, G. E., O’Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A., Fitzgerald, G. F., Collins, J. F., Ross, R. P. and 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: 2605-2612.

Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S. and Marchioni, E. 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp. in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 103-105.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. and Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40: 1107–1121.

Gibbs, B. F., Kermasha, S., Mulligan, C. N. and Alli, I. 1999. Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50: 213-224.

Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe, K. D., Wouters, R., De Boever, P., Nollet, L., Gomes, A. M. P. and Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological, and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 139-157.

Gouin, S. 2004. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 330-347.

Havenaar, R. and Huis, In't Veld, J. H. J. 1992. Probiotics: A general view, *The Lactic Acid Bacteria*, Wood, B.J.B. (ed.). Elsevier. Vol. 1, pp: 151-170.

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S. and Razavi, S. H. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111: 50-55.

IPW. 2004. International Probiotic Workshop, Workshop Summary, www.probiotics-amsterdam.org/workshop/index.php.

Iyer, C. and 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: 18-23.

Jia, W., Li, H., Zhao, L. and Nicholson, J. K. 2008. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7: 123-129.

Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3: 39-48.

Kavas, S. T. 2007. Probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistem uyumluluğu ve enterik patojenlere etkisi. Uzmanlık Tezi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, s. 66.

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

Khalil, A. H. and Mansour, E. H. 1998. Alginate encapsulated *Bifidobacteria* survival in mayonnaise. *Journal of Food Science*, 63 (4): 702-705.

Kılıç, S. 2008. *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri*. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No: 542, İzmir, s. 451.

Kınık, Ö. ve Gürsoy, O. 2005. Bazı probiyotik bakterilerin destek kültür olarak beyaz peynir üretiminde kullanılması. Tübitak Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu Proje no: TOVAG- 1020185.

Kneifel, W., Mattila-Sandholm, T. and Wright, A. 1999. Probiotic Bacteria-Detection and estimation in fermented and non-fermented dairy products. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D.(eds.). Academic Pres. Vol. 3, pp: 1783-1789.

Koç, M., Sakin, M. ve Kaymak-Ertekin, F. 2010. Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16 (1): 77-86.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. *International Dairy Journal*, 13: 3-13.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14: 737- 743.

Lacroix, C. and Yidirim, S. 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 176–183.

Lakkis, J. M. 2007. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. *Controlled Release Technologies in Food Systems*, pp: 83-100.

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

Lee, Y. K. and Salminen, S. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 6; 241-245.

Lee, Y. K., Nomoto, K., Salminen, S. and Gorbach, S. L. 1999. *Handbook of Probiotics*. A Wiley-Interscience Publication, Canada. p. 211.

Leroy, F. and de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 67-78.

Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., Zang, Y., et al. 2008. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105: 2117–2122.

Lian, W. C., Hsiao, H. C. and Chou, C. C. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 79-86.

Liserre, M. A., Re, I. M. and Franco, B. D. G. M. 2007. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in Modified Alginate-chitosan Beads and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Food Biotechnology*, 21 (1): 1-16.

Lopez-Rubio, A., Gavara, R. and Lagaron, J. M. 2006. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials, *Trends in Food Science & Technology* 17: 567–575.

Loveday, S. M. and Singh, H. 2008. Technologies for vitamin A protection in foods and pharmaceuticals. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 657-668.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. and Desobry, S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 1–21.

Medici, M., Vinderola, C. G. and Perdigón, G. 2004. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *International Dairy Journal*, 14: 611-618.

Meiners, J. A. 2009. Micro-Encapsulation of Probiotics. In: Charalampopoulos, D. and Rastall, R. A. (eds.). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer Science+Business Media, LLC. NY, USA. pp: 805-823.

Metin, M. 2008. *Süt ve Mamülleri Analiz Yöntemleri*. Ege Üniversitesi Basımevi, Yayın No: 24, İzmir. s. 439.

Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R. and Sohrabvandi, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5 (1): 3-8.

Murray, F. 1998. *Acidophilus and Your Health: The beneficial microorganisms that aid digestion and fight disease*. Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut. p. 46.

Oliveira, R. P. S., Florence, A. C. R., Silva, R. C., Perego, P., Converti, A., Gioielli, L. A. and Oliveira, M. N. 2009. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 467-472.

Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C. and Salminen, S. 1999. Probiotics: Mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9: 43-52.

Özer, B., Uzun, Y. S. and Kırmaç, H. A. 2008. Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during kasar cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 61 (3): 237- 244.

Pereira, D. I. A. and Gibson, G. R. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9): 4689-4693.

Picot, A. and Lacroix, C. 2004. Encapsulation of *bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14: 505-515.

Poncelet, D. 2009. Microencapsulation Methods and Technologies, (Course Notes), COST865 Summer School on Bioencapsulation, Anzere, Switzerland, p. 194.

Rautava, S. and Walker, A. W. 2009. Probiotic 101. In: Michail, S. and Sherman, P. M. (eds.) *Probiotics in Pediatric Medicine*, Humana Pres. NJ, USA. pp: 41-52.

Roberfroid, M. B. 2008. General Introduction: Prebiotics in Nutrition. In: Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (eds.). *Handbook of Probiotics*, CRC Press Taylor & Francis Group, FL, USA. pp: 1-11.

Robert, P., Carlsson, R. M., Romero, N. and Masson, L. 2003. Stability of Spray-Dried Encapsulated Carotenoid Pigments from Rosa Mosqueta (*Rosa rubiginosa*) Oleoresin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80: 1115- 1120.

Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition (Supplement)*, 130: 396-402.

Saccaro, D. M., Tamime, A. Y., Pilleggi, A. L. O. P. S. and Oliveira, M. N. 2009. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C. *International Journal of Dairy Technology*, 62 (3): 397-404.

Salminen, S. 1999. Probiotics: Scientific support for use. *Food Technology*, 53: 66.

Salminen, S. and vonWright, A. 1998. Current probiotics-safety assured. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 10: 68-77.

Sanders, M. E. 1999. Probiotics. *Food Technology*, 53: 67-77.

Schrooyen, P. M. M., Meer, R. V. D. and Kruif, C. G. D. 2001. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60: 475-479.

Shahidi, F. and Han, X.Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 33: 501-547.

Sheu, T.Y. and Marshall, R. T. 1993. Microencapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54: 557-561.

Sheu, T. Y., Marshall, R. T. and Heymann, H. 1993. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76: 1902-1907.

Silva, C., Carvahlo, A. S., Teixeira, P. and Gibbs, P. A. 2002. Bacteriocin production by spray dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 77-81.

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

Tannis, A. 2008. *Probiotic Rescue*. John Wiley & Sons Canada, Ltd. Canada. p. 269.

TGK. 2002. Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Resmi Gazete 25.08.2002-24857.

Tok, E. ve Aslım B. 2007. Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 37 (1) : 62-68

Tonguç, E. 2006. Probiyotik ayran üretimi üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, s. 133.

Tunail, N. 2009. *Mikrobiyoloji*. Pelin Ofset. Ankara, s. 448.

Turgut, T. 2006. Bazı probiyotik bakterilerin dondurma üretiminde kullanım imkânı. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, s. 168.

Tzortzis, G. and Vulevic, J. 2009. Galacto-Oligosaccharide Prebiotics. In: Charalampopoulos, D. and Rastall, R. A. (eds.). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer Science+Business Media, LLC. NY, USA. pp: 207- 244.

Uzun, Y. S. 2006. Probiyotik karakterli *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ve *Bifidobacterium bifidum* BB-12'nin kaşar peynirinde haşlama ve kuru tuzlama işlemlerine karşı dirençlerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, s. 72.

Verstraete, W. 2000. Influence of a synbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 219-223.

Weissbrodt, J. 2009. Food & feed applications, spray drying, (Course Notes), COST865 Summer School on Bioencapsulation, Anzere, Switzerland, p. 194.

Wells, A. L., Saulnier, D. M. A. and Gibson, G. R. 2008. Gastrointestinal Microflora and Interactions with Gut Mucosa. In: Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (eds.). *Handbook of Probiotics*, CRC Press Taylor & Francis Group, FL, USA. pp: 13-38.

Wilson, N. and Shah, N. P. 2007. Microencapsulation of Vitamins. *Asia Food Journal*, 14 (1): 1-14.

Yiğit, T. 2009. Süt ve süt ürünlerinde probiyotik bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, s.150.

Yücecan, S. 2002. Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri. *Türkiye Diyetisyenler Derneği Bülteni*, 2: 1-13.