

MİKROENKAPSÜLASYON TEKNİĞİNİN *Lactobacillus acidophilus* KPb4b
ve *Lactobacillus rhamnosus* KPb7 PROBİYOTİK KÜLTÜRLERİNİN
STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

M. FATİH İŞLEYEN

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

AĞUSTOS 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. Doç. Dr. Seyhun Yurdugül

.....

2. Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır

.....

3. Yrd. Doç. Dr. M. Şamil Kök

.....

ÖZET

MİKROENKAPSÜLASYON TEKNİĞİNİN *Lactobacillus acidophilus* KPb4b ve *Lactobacillus rhamnosus* KPb7 PROBİYOTİK KÜLTÜRLERİNİN STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İşleyen, M. Fatih
Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır

Ağustos 2010, 93 sayfa

Bu çalışmada probiyotik özellikleri bilinen ve 16S r RNA dizi analizi yöntemi ile kesin tanısı yapılmış *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 suşları Nisco Var A model, laminar-jet-breakup Mikroenkapsülatör (Nisco Engineering Inc., Zurich, Switzerland) kullanılarak elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi ile kaplanmıştır. Kaplama materyali olarak %1,5 aljinat, % 1,5 manukol ve %1,5 aljinat+%0,5 nişasta kullanılmış; kapsüller ve serbest probiyotik kültürlerinin; mikroenkapsülasyon verimi, salınımı, oksijen toksisitesi, düşük pH direnci, yapay mide ve bağırsak ortamlarındaki dayanımı, sıcaklık toleransı belirlenmiş ve elektron mikroskobu ile morfolojik yapıları incelenmiştir. Araştırmada ayrıca serbest ve kaplanmış kültürlerin +24°C, +5°C ve -18°C'deki depolama stabiliteleri araştırılmış ve kaplanmış ve serbest hücrelerin model gıda ortamında kullanıldığında gıdanın duyuusal özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Araştırma sonuçlarına göre elde edilen kapsüllerin boyutlarının 370 µm - 404 µm arasında olduğu; mikroenkapsülasyon veriminin en yüksek %1,5 aljinat ile yapılan kaplamadan elde edildiği, salınım testinde *L. acidophilus* KPb4b suşunun *L. rhamnosus* KPb7 suşundan daha stabil olduğu, ancak oksijen toksisitesi açısından *L. rhamnosus* KPb7 kültürünün *L. acidophilus* KPb4b'ye göre daha dirençli olduğu; gıda ortamında yapılan oksijen toksisitesi denemesinde mikroorganizmaların en iyi aljinat+nişasta mikrokapsüllerinde korunduğu; sıcaklık direnci açısından 30. dakikadan sonra her iki mikroorganizma kapsüllerinin de canlılığını hızla yitirmeye başladığı belirlenmiştir. Depolama stabilitesi açısından -18°C'de depolamanın mikroküreciklerin yapısına zarar verdiği, +5°C'de depolanan aljinat+nişasta kapsüllerinin bakteri canlılığını korumada en uygun sıcaklık ve kaplama materyali olduğu belirlenmiştir. Kaplama işleminin yapay mide ortamında mikroorganizmanın canlılığını korumada çok fazla etkili olmadığı, ancak aljinat+nişasta kapsüllerinin bakteri canlılığını korumada diğerlerine göre daha başarılı olduğu, ince bağırsak

ortamında ise aljinat ve aljinat +nişasta kapsüllerinin her iki bakteri kültürü için de en iyi korumayı sağladığı tespit edilmiştir. Kaplanmış probiyotik kültür kullanılarak hazırlanan gıdaların duysal analizlerinde her iki bakteri için en yüksek puanı aljinat+nişasta kapsülleri ile hazırlanan örnekler almıştır.

Anahtar Kelimeler: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, mikroenkapsülasyon, depolama stabilitesi

ABSTRACT

THE EFFECT OF MICROENCAPSULATION TECHNIQUE ON THE STABILITY OF PROBIOTIC CULTURES *Lactobacillus acidophilus* KPb4b AND *Lactobacillus rhamnosus* KPb7

İşleyen, M. Fatih
M.Sc., Department of Food Engineering
Supervisor: Asst. Prof. İbrahim Çakır

August 2010, 93 pages

In this study, *L. acidophilus* KPb4b and *L. rhamnosus* KPb7 were selected potential strains after determining their 16S rRNA sequence analysis and molecular diagnosis and this strains were microencapsulated with 1.5% alginate, 1.5% manucol and 1.5% alginate + 0.5% starch by Nisco moduler microencapsulation unit Var A. Morphological structures of produced microcapsules such as microencapsulation yield, mechanical stability, secretion, oxygen toxicity, low pH resistance, and resistance in artificial gastric and intestinal environment, and at the +24°C, +5°C, -18°C storage stability were determined. Also, stability of microcapsules in model food environment were investigated.

According to the results of molecular diagnosis, the strain with the best probiotic characteristics, *L. acidophilus* KPb4b and *L. rhamnosus* KPb7, were selected and microencapsulated with 1.5% alginate, 1.5% manucol and (1.5% alginate + 0.5% starch). Coating process were made using emulsion electrostatic vibration technique with a nozzle of 150 µm. The capsule size of obtained capsules were between 370 µm - 404 µm; the highest microencapsulation yield and mechanical stability were obtained from the coating with 1.5% alginate. In secretion testing, *L. acidophilus* KPb4b strains is more stable than *L. rhamnosus* KPb7 strains, but in terms of oxygen toxicity *L. rhamnosus* KPb7 culture is more resistant than of *L. acidophilus* KPb4b; the oxygen toxicity test in food environment, microorganisms are protected best in alginate+starch microcapsules, in terms of temperature resistance after 30 minutes, both microorganisms were also determined to decrease vitality. In terms of storage stability, storing at -18°C causes damage to the structure of microbeads. It has been determined that storage at +5°C with alginate+starch capsules was the most suitable temperature and coating material for the best protection of the vitality of the bacteria. Coating process in the artificial gastric environment is not effective for preserving microbial viability. However, in small

intestine environment alginate+starch capsules provide the best protection for both bacterial cultures. The highest scores in food samples that were prepared using coated probiotic cultures for both bacteria were obtained in alginate+starch application.

Keywords: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, microencapsulation, storage stability.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı yönlendirerek gerçekleşmesini sağlayan başta değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır'a; proje kapsamında bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK-TOVAG'a; çalışmaların yürütüldüğü AİBÜ Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümüne; taramalı elektron mikrograflarının çekilmesine olanak sağlayan AİBÜ Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümüne ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Akdoğan'a; bu çalışmanın bir bölümünün de içerisinde olduğu TÜBİTAK 106O559 nolu projenin başlangıcında projede yer alan ve her zaman destekleyen Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünden Sayın Arş. Gör. İlker Turan Akoğlu'na; proje çalışmalarına katkıda bulunan bölümümüz yüksek lisans öğrencisi Sayın Buse Yaşlı'ya; istatistik analizlerin yapılmasında büyük emeği geçen Sayın Yrd. Doç. Dr. Yalçın Karagöz'e; çalışmalarım süresince her zaman beni destekleyen çok değerli Aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Probiyotikler	5
2.1.1. Probiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi	5
2.1.2. Probiyotik Etkinin Bilimsel Temeli ve Mekanizması	7
2.1.3. Probiyotik Mikroorganizma Seçim Kriterleri.....	11
2.2. Mikroenkapsülasyonun Tanımı ve Kullanılan Teknikler.....	13
2.3. Gıda Teknolojisinde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları.....	15
2.4. Probiyotik Kültürlerde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları	16
2.5. Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Bazı Kaplama Materyalleri.....	21
2.6. Bazı Kaplama Materyallerinin Teknolojik Özellikleri	24
2.6.1. Aljinatlar	24
2.6.2. Nişasta	25
2.6.3. Karagenan.....	26

3. MATERYAL VE YÖNTEM	28
3.1. Mikroorganizmalar, Besiyerleri ve Kaplama Materyalleri	28
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanısı ve Antimikrobiyel Aktivitesi	28
3.2.2. Kültürlerin Mikroenkapsülasyonu	30
3.2.2.1. Kültürlerin Hazırlanması	30
3.2.2.2. Mikroenkapsülasyon İşlemi ve Kaplama Koşulları	30
3.2.3. Mikro kapsüllerin Stabilitesi ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	32
3.2.3.1. Mikro kapsüllerin Boyutlarının Belirlenmesi	32
3.2.3.2. Mikroenkapsülasyon Verimi ve Mikro kapsülden Hücre Salınımı	32
3.2.3.3. Oksijen Toksisite Testleri	33
3.2.3.4. Mikro kapsüllerin Sıcaklık Direncinin Belirlenmesi	34
3.2.3.5. Mikro kapsüllerin Depolama Stabilitésinin Belirlenmesi	34
3.2.3.6. Mikro kapsüllerin Yapay Mide ve Bağırsak Ortamındaki Stabilitesi	34
3.2.4. Mikro kapsüllerin Yapısının Elektron Mikroskopta İncelenmesi	35
3.2.5. Mikroenkapsüle Probiyotik İçeren Gıda Örneğinin Duyusal Analizi	36
3.2.6. İstatistiksel Analizler	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	38
4.1. İzolasyon ve Tanı Sonuçları	38
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Aktivite Sonuçları	40
4.3. Mikroenkapsülasyon Koşulları ve Kaplama Materyalinin Seçilmesi	41
4.4. Mikro kapsüllerin Boyutlarının Belirlenmesi	48
4.5. Mikroenkapsülasyon ve Mikro kapsülden Hücre Salınımı	49
4.6. Oksijen Toksisitesi Test Sonuçları	52
4.6.1. RSM besiyerinde oksijen toksisitesi sonuçları	52

4.6.2. Gıda ortamında oksijen toksisitesi sonuçları	54
4.7. Mikrokapsüllerin Sıcaklık Direncinin Belirlenmesi	56
4.8. Mikrokapsüllerin Depolama Stabilesinin Belirlenmesi	60
4.9. Mikrokapsüllerin Yapay Mide ve Bağırsak Ortamındaki Stabilesi.....	62
4.10. Mikrokapsüllerin Morfolojik Yapılarının Elektron Mikroskop Görüntüleri	68
4.11. Mikroenkapsüle Probiyotik İçeren Gıda Örneğinin Duyusal Analizi.....	72
4.12. Sonuçların İstatistiksel Analizi	75
5. SONUÇ	80
6. KAYNAKLAR	82
7. EKLER	92
EK 1. <i>L. acidophilus</i> KPb4b Suşunun Moleküler Tanı Sonuç Dendogramı.....	92
EK 2. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 Suşunun Moleküler Tanı Sonuç Dendogramı.....	93

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar.....	8
Çizelge 2.2. Sindirim sisteminde yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar	8
Çizelge 2.3. Probiyotik mikroorganizma seçim kriterleri.....	12
Çizelge 2.4. Gıda bileşenlerinin kaplanmasıda kullanılan bazı kaplama materyalleri	22
Çizelge 3.1. Mikroenkapsülasyon işleminde uygulanan çalışma parametreleri	31
Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan suşların biyokimyasal ve moleküler tanı sonuçları	38
Çizelge 4.2. Araştırmada kullanılan LAB'nin antimikrobiyel aktiviteleri	41
Çizelge 4.3. Kaplama işleminde kullanılan maddeler ve bazı özellikleri.....	42
Çizelge 4.4. Çalışma koşullarının belirlenmesinde kullanılan parametreler ve sınırlar	43
Çizelge 4.5. <i>L. acidophilus</i> KPb4b ve <i>L. rhamnosus</i> KPb7 mikrokapsüllerinin boyutları (µm).....	48
Çizelge 4.6. Duyusal analizi yapılan puding örneklerinin pH değerleri.....	72
Çizelge 4.7. Puding numunelerinin depolama öncesi duyusal analiz sonuçları.....	73
Çizelge 4.8. Puding numunelerinin depolama sonrası duyusal analiz sonuçları.....	74
Çizelge 4.9. Normallik testi sonuçları	75
Çizelge 4.10. Yapay mide ortamında <i>L. acidophilus</i> KPb4b ve <i>L. rhamnosus</i> KPb7 grupları arasındaki farklılık testleri	76

Çizelge 4.11. Yapay ince bağırsak ortamı varyans analiz sonuçları	77
Çizelge 4.12. Yapay ince bağırsak ortamı <i>L. acidophilus</i> KPb4b gruplar arası farklılıklar.....	77
Çizelge 4.13. Yapay ince bağırsak ortamı <i>L. rhamnosus</i> KPb7 gruplar arası farklılıklar.....	78
Çizelge 4.14. Depolama stabilitesi varyans analizleri	78
Çizelge 4.15. Depolama stabilitesi <i>L. acidophilus</i> KPb4b gruplar arası farklılıklar..	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan Nisco Var A model mikroenkapsülasyon cihazı ..	31
Şekil 4.1. <i>L. acidophilus</i> KPb4b aljinat kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüleri ...	44
Şekil 4.2. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 aljinat kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüleri	45
Şekil 4.3. <i>L. acidophilus</i> KPb4b aljinat+nişasta kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüsü.....	45
Şekil 4.4. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 aljinat+nişasta kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüleri	45
Şekil 4.5. <i>L. acidophilus</i> KPb4b manukol kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüleri .	46
Şekil 4.6. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 manukol kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüsü	46
Şekil 4.7. <i>L. acidophilus</i> KPb4b suşunun salınım testi sonuçları.....	51
Şekil 4.8. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 suşunun salınım testi sonuçları.....	52
Şekil 4.9. <i>L. acidophilus</i> KPb4b kapsüllerinin RSM ortamında oksijen toksisitesi...	53
Şekil 4.10. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 kapsüllerinin RSM ortamında oksijen toksisitesi....	53
Şekil 4.11. <i>L. acidophilus</i> KPb4b kapsüllerinin şeftali nektarı ortamında oksijen toksisitesi.....	55
Şekil 4.12. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 kapsüllerinin şeftali nektarı ortamında oksijen toksisitesi.....	55
Şekil 4.13. <i>L. acidophilus</i> KPb4b kapsüllerinin 55°C sıcaklık direncinin belirlenmesi	57
Şekil 4.14. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 kapsüllerinin 55°C sıcaklık direncinin belirlenmesi	58

Şekil 4.15. Depolama süresince <i>L. acidophilus</i> KPb4b kültürünün canlılık durumu.	60
Şekil 4.16. Depolama süresince <i>L. rhamnosus</i> KPb7 kültürünün canlılık durumu....	61
Şekil 4.17. <i>L. acidophilus</i> KPb4b kültür ve kapsüllerinin yapay mide ortamında canlılığı.....	63
Şekil 4.18. <i>L. acidophilus</i> KPb4b kültür ve kapsüllerinin yapay incebağırsak ortamında canlılığı	64
Şekil 4.19. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 kültür ve kapsüllerinin yapay mide ortamında canlılığı.....	65
Şekil 4.20. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 kültür ve kapsüllerinin yapay ince bağırsak ortamında canlılığı	66
Şekil 4.21. <i>L. acidophilus</i> KPb4b aljinat kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü.....	69
Şekil 4.22. <i>L. acidophilus</i> KPb4b aljinat+nişasta kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü	69
Şekil 4.23. <i>L. acidophilus</i> KPb4b manukol kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü	70
Şekil 4.24. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 aljinat kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü.....	70
Şekil 4.25. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 aljinat+nişasta kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü	70
Şekil 4.26. <i>L. rhamnosus</i> KPb7 manukol kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü.....	71

1. GİRİŞ

Probiyotik mikroorganizmaların beklenen faydalı etkiyi sağlayabilmeleri için, içinde bulundukları gıdaların işlenmesi, olgunlaştırılması, depolanması ve raf ömrü süresince canlı kalabilmeleri ve belirli sayının üzerinde (günde 10^6 - 10^8 kob/mL veya daha fazla) vücuda alınmaları gerekmektedir. Uluslararası Sütçülük Federasyonu (International Dairy Federation, IDF) probiyotiklerden beklenen faydanın sağlanabilmesi için ürünün son kullanım tarihinde en az 10^7 kob/mL canlı bakteri içermesini önermektedir (Sultana ve ark. 2000).

Probiyotikler, yeterli sayıda alındıklarında konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösteren canlı mikroorganizmalardır. Probiyotikler yaygın olarak fermente süt ürünleri başta olmak üzere diğer fermente gıdalara katılarak, o gıdaya fonksiyonel özellik kazandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Günümüzde probiyotikler tablet, kapsül, sıvı veya toz formunda da üretilmekte ve diyet destekleyici nutrasötikallerin bileşimine katılmaktadır. Probiyotik gıda üretiminde yaygın olarak kullanılan bakteriler *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. başta olmak üzere, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii*'dir (Çakır 2003; Leroy ve deVuyst 2004). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda probiyotiklerin sağlık üzerine olumlu etkileri kapsamlı çalışmalarla kanıtlanmıştır (Lee ve ark. 1999).

Probiyotiklerin bilinen faydalı etkileri; bağırsak mukozasına tutunarak veya epitel yüzeylerinde agregasyon oluşturarak patojenlerin yerleşmesini engellemek,

kandaki kolesterol oranını düşürücü etki göstermek, bağışıklık sistemini güçlendirerek hastalıklara direnç kazandırmak, karsinogenleri parçalayarak kanser yapıcı etkilerini gidermek ve belki de en önemlisi laktoz intoleransı olan insanların laktoz sindirimine katkıda bulunarak, süt tüketmelerine olanak sağlamak olarak sıralanabilir (Klaenhammer 1998; Sanders 1999; Kaur ve ark. 2002; Çakır ve Çakmakçı 2004).

Diyet destekleyici olarak kullanılan probiyotik bakterilerin sindirim sisteminin kötü koşullarına dayanıklı olması gerekmektedir. Bununla birlikte birçok probiyotik bakterinin yüksek asitlik (düşük pH) ve safra tuzlarına karşı hayatta kalma kabiliyeti azdır (Holzapfel ve Schillinger 2002; Çakır 2003).

Gıda teknolojisinde probiyotik mikroorganizma içeren fonksiyonel gıda geliştirilmesini kısıtlayıcı bazı engeller vardır. Bunlar; gıdanın işlenmesi esnasında kullanılan teknolojiye bağlı olarak oluşan engeller (yüksek sıcaklık, kurutma, dondurma, yüksek basınç, asidik veya alkali ortam), tüketiminden sonra konakçı metabolizmasından kaynaklanan engeller (sindirim sistemi enzimleri, yüksek asidik ortam ve safra tuzları) ve mikroorganizmanın kendisinden kaynaklanan engellerdir (anaerobik gelişme koşulları, zengin besin maddeleri gereksinimi, oksijen, sıcaklık ve pH değişimleri sonucu oluşan stres). Probiyotik gıda üretiminde bu engellerin ortadan kaldırılması konusunda kapsamlı araştırmalar gerekmektedir (Desmond ve ark. 2004). Fonksiyonel gıdaların bileşiminde kullanılacak probiyotik mikroorganizmalarda bulunması gereken özellikler; oksijen, asit, basınç, safra tuzları ve sıcaklık toleransı, sütte gelişebilme yeteneği, fajlara karşı dirençlilik ve gastrointestinal sistemde prebiyotikleri (oligosakkaritler ve lifli gıda bileşenleri) metabolize edebilme yetenekleridir (Ross ve ark. 2005).

Gıda üretiminde kullanılacak probiyotik mikroorganizmalar genellikle dondurulmuş veya dondurularak kurutulmuş olarak toz veya sıvı formda üretilip dağıtılmaktadır. Ancak probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin birçoğunun püskürterek kurutma işleminde, sıcaklık ve ozmotik basıncın etkisiyle canlılığını önemli oranda kaybettiği bilinmektedir (Gardiner ve ark. 2000; Silva ve ark. 2002).

Probiyotik üretiminde karşılaşılan bu güçlüklerin aşılmasında mikroenkapsülasyon tekniği son yıllarda gıda endüstrisinin üzerinde önemle durduğu bir tekniktir. Mikroenkapsülasyon tekniğinin amacı, probiyotik mikroorganizmaların çevresinde fiziksel bir bariyer oluşturarak olumsuz çevre koşullarına karşı mikroorganizmanın canlılığını korumasını sağlamaktır. Bu yöntemde aktif mikroorganizma çevresinde çeşitli maddelerle koruyucu bir film veya kaplama tabakası oluşturulmaktadır (Sultana ve ark. 2000; Poncelet 2009).

Endüstriyel boyutta kolay uygulanabilirliği ve hammadde temini açısından günümüzde en çok araştırılan mikroenkapsülasyon tekniği kalsiyum-aljinat jel kapsülü oluşumu esasına dayalı tekniklerdir. Gerek araştırma ölçeğinde gerekse endüstriyel boyutta bu yöntem ile mikrokapsül üretimi yapabilen cihazlar geliştirilmiştir. Aljinatın yanısıra jelatin, pektin, nişasta, kappa-karagenan, jelan gum, peyniraltı suyu gibi toksik olmayan, inert ve gıdaların bileşiminde güvenle kullanılabilen maddeler de kaplama materyali olarak kullanılabilir (Chandramoulia ve ark. 2004). Probiyotik mikroorganizmalar, mikroenkapsülasyon tekniği ile oluşturulan 200 μm – 2000 μm çaplı mikrokürecikler içerisinde canlılıklarını koruyabilmektedir.

Probiyotik ürünlerdeki canlılık kayıplarının en önemli nedenlerinden birisi de depolama sırasındaki sıcaklık dalgalanmalarının tolere edilememesidir. Özellikle

dondurarak muhafaza işleminde bakteri hücrelerinin etrafında oluşan buz kristalleri hücrelerin mekanik olarak zarar görmesine ve canlılıklarını yitirmesine neden olmaktadır (Davidson ve ark. 2002). Dondurulmuş yoğurt ve fermente sütlü tatlılardaki canlı probiyotik kayıplarının bir diğer nedeni ise, oksijen toksisitesi, asit gelişimi ve yüksek şeker konsantrasyonudur. Bu tür ürünlerde mikrobiyolojik stabilitenin korunabilmesi için mikroenkapsülasyon tekniği önerilmektedir (Shah 2000; Poncelet 2009).

Bu çalışmada probiyotik özellikleri bilinen ve moleküler tekniklerle kesin tanısı yapılmış potansiyel *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 suşları Nisco Var A model, laminar-jet-breakup mikroenkapsülatör (Nisco Engineering Inc., Zurich, Switzerland) kullanılarak elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi ile kaplanmıştır. Kaplama materyali olarak %1,5 aljinat, % 1,5 manukol ve %1,5 aljinat+%0,5 nişasta kullanılmış; kapsüller ve serbest probiyotik kültürlerinin; mikroenkapsülasyon verimi, salınımı, oksijen toksisitesi, düşük pH direnci, yapay mide ve bağırsak ortamlarındaki dayanımı, sıcaklık toleransı belirlenmiş ve elektron mikroskobu ile morfolojik yapıları incelenmiştir. Araştırmada ayrıca serbest ve kaplanmış kültürlerin +24°C, +5°C ve -18°C'deki depolama stabiliteleri araştırılmış ve kaplanmış ve serbest hücrelerin model gıda ortamında kullanıldığında gıdanın duyuşal özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Probiyotikler

2.1.1. Probiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi

Probiyotik kelimesi Yunanca kökenli olup “yaşam için” anlamına gelmektedir. Probiyotik terimi ilk defa 1965 yılında, Lilly ve Stillwell adlı araştırmacılar tarafından, diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır (Lee ve ark. 1999; Armbricht 2002; Çakır 2003). Bu tarihten günümüze kadar probiyotik kelimesi, etki mekanizmalarına ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerine bağlı olarak çok değişik anlamlarda kullanılmıştır. Başlangıçta, protozoonlar tarafından üretilen ve diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeler için kullanılmış olan probiyotik teriminin anlamı, 1970’li yılların başlarında genişletilerek mikrobiyel gelişmeyi destekleyen doku ekstraktları için de kullanılmaya başlamıştır. 1974 yılında Parker probiyotik kelimesinin tanımını; intestinal sistemin mikrobiyel dengesine katkıda bulunan madde ve organizmalar olarak, bugünkü kullanımına en yakın anlamda geliştirmiştir. Bugün kullandığımız tanım Fuller (1989) tarafından geliştirilmiş olup probiyotik terimi; intestinal sistemin mikrobiyel dengesini geliştirerek konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan canlı mikrobiyel diyet destekleyicisi anlamında kullanılmıştır. Daha sonra bu tanım gıda ve yemlerde kullanılan tekli ve çoklu kültürleri kapsayacak

şekilde genişletilmiştir (Havenaar ve Huis In't Veld 1992). Probiyotik kelimesinin tanımına Avrupalı bilim insanları son şeklini vermiş olup, insan ve hayvan beslemede kullanılan probiyotikleri; vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikroflorasına olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamışlardır (Kneifel ve ark. 1999). FAO ve WHO'nun probiyotik kelimesini kesin olarak tanımlamasına, International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics gibi uzman kuruluşların tanım konusunda açık görüşleri olmasına rağmen, piyasada birbirinden çok farklı işlevde ve yararlı etkileri henüz kanıtlanmamış çok sayıda ürün probiyotik adı ile satılmaktadır. Tüketicilerin yanlış yönlendirilmelerini de önlemek amacıyla probiyotik kavramının yeniden tanımlanması gerektiği konusunda görüşler bildirilmiştir. Örneğin Nisan 2004'te Amsterdam'da yapılan Uluslararası Probiyotik Çalıştay'ında (International Probiotic Workshop; IPW) bazı bilim adamları, sağlık yönünden belirli hastalıkları tedavi edici etkileri klinik deneylerle kanıtlanmış ürünlerin “bakteriyel tedavi edici, mikrobiyel tedavi edici veya bakteriyel immun sistem düzenleyici” ürünler olarak tanımlanmalarını önermişlerdir (IPW 2004; Çakır 2005).

“Probiyotik ürün” denildiğinde ise; içerisinde konakçı sağlığı üzerine olumlu etkileri olan mikroorganizmaları içeren, çeşitli enzim, vitamin ve aroma bileşenleri ile desteklenerek direkt kapsül veya tablet haline getirilmiş diyet destekleyiciler anlaşılmaktadır. Bu tablet veya kapsüller “farmasötikaller” olarak da bilinmekte olup, hastalıkların tedavisinde ilaç yerine kesinlikle kullanılamamakta, sadece sağlık destekleyici ürünler olarak satılmaktadır. Bu preparatlar dondurarak kurutulmuş bakteri kültürlerinin kapsül veya tablet haline getirilmesi ile hazırlanmış olup; bazı hepatik hastalıklar, kabızlık ve antibiyotik tedavisi sonucu ortaya çıkan diyare gibi

gastrointestinal düzensizliklerin önlenmesinde kullanılmaktadır (Ouweland ve ark. 1999; Rolfe 2000; Yücecan 2002; Başyiğit 2004).

Ticari bir ürün olarak probiyotiklerin çiftlik hayvanlarının yemlerinde kullanımı, gıdaların bileşiminde veya diyet destekleyici preparatlar olarak kullanımından daha öncelere dayanmaktadır. 1968 yılında domuz yemlerinde büyümeyi teşvik etmek amacıyla *L. acidophilus* kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu tarihten bir yıl sonra, hayvan yetiştirme ve veteriner hekimlikte antibiyotik kullanımı konularında önemli bir otorite olan Swann Komitesi, antibiyotiklerin tedavi amacıyla kullanımının sınırlandırılmasını tavsiye etmiştir (Fuller 1999). Antibiyotik kullanımına karşı olan tepkiler, diyare gibi antibiyotik kullanımının yan etkilerinden kaynaklanmaktadır (Mitsuoka 1996, Fuller 1999, Gomes ve Malcata 1999). Antibiyotiklere karşı en büyük tepkiler özellikle gıda katkı maddeleri karşıtlarından gelmiştir. Bu tepkilerin temel nedeni, antibiyotiklerin dolaylı yollardan da olsa gıda zincirine yabancı madde olarak katılıyor olmasıdır. Antibiyotiklerin bu dezavantajlarına karşın probiyotikler, uzun yıllardır ve hiçbir yan etkisi olmaksızın gıdaların bileşiminde ve sağlıklı bireylerin intestinal sisteminde bulunuyor olması nedeniyle de kabul görmektedir (Tannock 1997; Fuller 1999; Çakır 2003; Leroy ve deVuyst 2004). Gerek insan beslenmesinde gerekse hayvan yemi üretiminde kullanılan probiyotik mikroorganizmalar Çizelge 2.1’de verilmiştir.

2.1.2. Probiyotik Etkinin Bilimsel Temeli ve Mekanizması

İnsan vücudu deri, ağız boşluğu, gastrointestinal ve ürogenital sistemler başta olmak üzere yüzlerce mikroorganizmanın yaşadığı dinamik bir ekosistemdir. İnsan vücudundaki toplam bakteriyel popülasyonun yaklaşık 10^{14} düzeyinde olduğu tahmin

edilmektedir (Yücecan 2002). Sindirim sisteminde bulunan mikroorganizma çeşitleri

Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar

İnsanlar İçin Kullanılanlar	Hayvan Beslemede Kullanılanlar
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. casei</i> Shirota	<i>L. casei</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp.	<i>L. delbrueckii</i> subsp.
<i>bulgaricus</i>	<i>bulgaricus</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>L. brevis</i>
<i>adolescentis</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>B. breve</i>	<i>B. brevis</i>
<i>B. longum</i>	<i>B. pseudolongum</i>
<i>B. infantis</i>	<i>B. thermophilus</i>
<i>S. salivarius</i> subsp.	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>thermophilus</i>	
<i>Saccharomyces boulardii</i>	

Çizelge 2.2. 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>

Vücudumuzdaki toplam hücre sayısı ile kıyaslandığında, bakteri sayısının 10 kat daha fazla olduğu görülmektedir (Salminen 1999). Mikroorganizmalardan arındırılmış (gnotobiotic) denek hayvanları ile yapılan çalışmalar mikrobiyel kolonizasyonun yaşam için zorunlu bir gereksinim olmadığını göstermiştir. Hatta mikrobiyel kolonizasyon, bazı mikrobiyel metabolitlerin toksik, karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri nedeni ile olumsuz etkilere bile neden olabilmektedir. Bununla birlikte gnotobiyotiklerin, doğal koşullarda yetiştirilen denek hayvanlarına göre infeksiyonlara karşı daha duyarlı oldukları da bilinen bir gerçektir. Buradan hareketle yetersiz bağışıklık sonucu zararlı mikroorganizmaların intestinal sistemde hiçbir direnç olmaksızın kolayca kolonize olabilecekleri düşünülmektedir. Doğal koşullarda yetiştirilmiş denek hayvanları ile gnotobiyotikler arasındaki farklılıklar, mikrobiyel kolonizasyonun konakçı sağlığı açısından çok önemli olduğu fikrinin temelini oluşturmaktadır (Mattila-Sandholm ve ark. 1999; Salminen 1999).

İntestinal ekosistemin fizyolojik dengesi hastalık, yaşlılık, stres, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörlerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenebilmektedir (Cedgård 2000; Rolfe 2000).

İntestinal sistemin dengesinde meydana gelen bu düzensizlikler “disbiosis” olarak adlandırılmaktadır. Disbiosisin tersi bir durum olarak, intestinal sistemde bulunan faydalı mikroorganizmaların sistemin fizyolojik dengesine olumlu yönde katkıda bulunmasına “probiyosiz”, bu mikroorganizmalara da “probiyotik mikroorganizmalar” denilmektedir. Konakçının yaşantısı esnasında karşılaştığı şartlar ve buna bağlı olarak hormonal sisteminde meydana gelen değişiklikler de disbiosisi meydana getiren önemli etmenlerden birisidir. Tedavi amacıyla alınan ilaçların birçoğu faydalı floranın inhibisyonuna neden olmaktadır. Disbiosise neden

olan etmenlerden bir diğeri de iklim koşullarında meydana gelen değişimlerdir. Seyahat esnasında meydana gelen ve seyahat diyaresi olarak bilinen düzensizlik bunun en iyi bilinen örneğidir. Sağlıklı bir yaşam için faydalı etki gösteren mikroorganizmaların intestinal sistemdeki sayısı yeterli değilse mutlaka dışarıdan takviye edilmesi gerekmektedir (Çakır ve ark. 2001; Çakır 2003; Başyigit 2004).

Probiyotiklerin konakçısı intestinal sistem bozukluklara karşı nasıl koruduğunu açıklamaya çalışan birçok mekanizma bulunmaktadır. Ancak yine de hangi patojenlere karşı hangi probiyotiklerin etkili olduğunun tam olarak belirlenmesi için daha çok çalışmaya gereksinim vardır. Probiyotiklerin muhtemel etki mekanizmaları aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir (Goldin ve Gorbach 1984; Salminen ve ark. 1998; Salminen 1999; Rolfe 2000; Forestier ve ark. 2001; Çakır ve ark. 2002; Başyigit 2004). Bunlar:

1. İnhibe edici maddeler üretirler: Probiyotikler, Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar üzerinde etkili birçok madde üretmektedir. Bunlardan bazıları organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerdir.
2. Tutunma bölgelerini bloke ederler: Probiyotikler tutunma bölgeleri için patojenlerle rekabete girerek, intestinal sistemde yerleşmelerini engellemektedirler.
3. Besin maddeleri için rekabet ederler: Probiyotikler patojenler için de gerekli olan besin maddelerini tüketerek, onların sistemde uzun süre kalmasını engellemektedirler. Ancak bu mekanizmanın kanıtlanabilmesi için *In vivo* verilere gereksinim duyulmaktadır.
4. Toksin reseptörlerini yıkıma uğratırlar: Bu mekanizma hayvanlarda *S. boulardii*' nin intestinal mukozada bulunan *Clostridium difficile*' nin toksin

reseptörlerini parçalayarak konakçıyı koruması nedeniyle ortaya atılmıştır (Castagliuola ve ark. 1999).

5. Bağışıklık sistemini güçlendirirler: Son yıllarda yapılan çalışmalar probiyotiklerin spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemini güçlendirerek intestinal hastalıklara karşı konakçıyı koruduğunu ortaya koymuştur (Fukushima ve ark. 1998). Bu mekanizma tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen spesifik hücre duvarı komponentlerinin veya hücre yüzeylerinin adjuvant etki gösterdiği ve humoral immun yanıtı güçlendirdiği düşünülmektedir (Medici ve ark. 2004).

2.1.3. Probiyotik Mikroorganizma Seçim Kriterleri

Probiyotik mikroorganizma suşlarının sınıflandırılması ve seçimi için üzerinde anlaşma sağlanmış standart kriterler yoktur. Herhangi bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için sahip olması gereken kriterler Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Günümüzde satılan probiyotiklerin birçoğu yukarıda belirtilen kriterler kullanılarak seçilmiştir. Sağlık açısından faydalı etkileri ölçülebilen ve fonksiyonel özellikleri olan probiyotik suşlar elde etmek için bu kriterlere sahip suşların seçilmesi gerekmektedir. Probiyotik özellik bakımından en iyi suşlar bu kriterlerin tamamına sahip olan suşlardır (Pennacchia ve ark. 2004).

Potansiyel probiyotik değeri olan mikroorganizmaların taranmasındaki en önemli parametrelerden birisi kullanılan mikroorganizmanın gastrointestinal bölgelerden geçerken metabolik aktivitesini ve tanımlanmış hedef mikroorganizmaya karşı biyolojik aktivitesini kaybetmemesidir. Buna ilaveten son üründe ve ticari

üretim esnasında suşun canlılığını ve istenen özelliklerini koruyabilmesi de çok önemlidir (Salminen ve ark. 1998; Gomes ve Malcata 1999; Ouwehand ve ark. 1999; Zhou ve ark. 2000).

Çizelge 2.3. Probiyotik mikroorganizma seçim kriterleri

Probiyotik Türün Özelliği	Açıklama
İnsanlar için kullanılacak ürünlerde insan veya gıda kaynaklı suşların kullanımı	İnsan beslenmesinde kullanılacak suşların türe bağlı olumsuz sağlık etkileri dikkate alınarak insan veya gıda orijinli olması önerilmektedir.
Asit ve safra tuzlarına direnç	Diğer kullanımlar için olmasa bile ağızdan yapılan uygulamalarda mikroorganizmanın canlı kalma, metabolik aktivitesini devam ettirebilme ve tutunabilme özelliklerini sürdürebilmesi önemlidir.
Mukozal yüzeylere tutunma	İmmün sistemin güçlendirilmesi, patojenlerle yarışmalı rekabet, tutunmanın engellenmesi ve kolonizasyonun engellenmesi açısından önemlidir.
Gıda ve klinik amaçlı kullanımlarda güvenilirlik	Suşların moleküler genetik esaslı kesin tanı yöntemleri kullanılarak doğru olarak tanımlanmaları ve özelliklerinin belirlenmesi. İntestinal sistemde mukozal yapıya zarar vermeyen ve invazyon özelliği olan suşların kullanılmaması.
Klinik olarak kanıtlanmış ve sağlık üzerine olumlu etki	Her bir farklı suşun veya ürünün minimum etki dozunun belirlenmesi plasebo kontrollü ve çok tekerrürlü canlı denemelerinin gerçekleştirilmesi.
Teknolojik açıdan üstün özellikler	Suşun stabilitesi, faj dirençliliği, üründe canlı kalabilme kabiliyeti (canlı mikroorganizma gereksinimi varsa), büyük ölçekte üretime uygunluk, ürün tadına olumsuz etkisinin olmaması, oksijen direnç kabiliyeti.

İstenen probiyotik özelliklere sahip ve klinik olarak etkisi kanıtlanmış suşlar genellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait türlerdir. Bunlardan özellikle *L. acidophilus* (NCFB1478), *L. casei* Shirota, *Lactobacillus* GG (ATCC 53103), *B. lactis* Bb12, *L. johnsonii* LJ1 ve *L. reuteri* türleri üzerinde birçok çalışma yapılmış, sağlık üzerindeki yararlı etkileri klinik deneylerle kanıtlanmış olup ticari

preparatlarda yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardır. Ayrıca bu türler üzerinde daha ayrıntılı araştırmalar yapılarak, çeşitli intestinal düzensizliklerin önlenmesinde ve intestinal bozuklukların diyet ile tedavi edilmesinde alternatif yöntemlerin önerilebileceği düşünülmektedir (Ouwehand ve ark. 1999; Laurens-Hattingh ve Viljoen 2001).

Kısaca probiyotik üretiminde kullanılacak mikroorganizmaların metabolik ve teknolojik özellikleri ürün işleme tekniğine uygun olmalı ve son ürünlerdeki canlı probiyotik mikroorganizma sayısı istenen düzeyde kalabilmelidir (Ouwehand ve ark. 1999; Reid 2000). Probiyotik bakterilerin fizyolojik etkileri üzerinde yapılan araştırmalar diyare, laktoz intoleransı ve kolon kanserini önleyici etki için gerekli dozun 10^9 - 10^{10} adet organizma/gün olduğunu göstermiştir. Bu değer günde 1 litre asidofiluslu süt tüketimine eşdeğerdir (Murray 1998; Lee ve ark. 1999; Sanders 1999).

2.2. Mikroenkapsülasyonun Tanımı ve Kullanılan Teknikler

Katı, sıvı veya gaz formundaki bir maddenin veya karışımın başka madde ile kaplanmasına enkapsülasyon (Madene ve ark. 2006). küçük katı partikülleri, sıvı damlacıkları ve gaz halindeki materyalleri yararlı özellikleri korunarak bir kaplama materyali içerisine paketlenip kapsüller haline dönüştürülmesi ve uygun koşullarda salınımının sağlanması ise mikroenkapsülasyon olarak tanımlanmaktadır (Gharsallaoui ve ark. 2007; Desai ve Park 2005; Gouin 2004; Anal ve Singh 2007). Mikroenkapsüller hassas gıda bileşenlerini korumakta, besinsel kayıpları önlemekte, istenilen zamanda salınım mekanizmasını oluşturmada, tat ve aromaları maskelemekte ve/veya korumaktadır. Gıda bileşenlerinin doğru zamanda ve doğru

yerde kontrollü salınımı mikroenkapsülasyon yöntemleri ile sağlanabilmektedir. Zamanında ve istenilen yerde salınım gıda katkı maddelerinin etkinliğini arttırmakta, kullanım alanlarını genişletmekte ve en uygun dozda kullanımlarını sağlamakta, böylece maliyet düşürülmektedir. Mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda elde edilen mikrokapsüller, yarı geçirgen, küreye yakın bir şekilde, hafif ve kaplanan materyali güçlü bir şekilde çevreleyen, çapları birkaç yüz nanometreden birkaç milimetreye kadar değişen boyutlarda bir yapıya sahiptir (Anal and Singh 2007; Desai and Park 2005). Kaplanan materyal; aktif materyal, öz, iç faz veya dolgu materyali olarak, kaplama materyali ise kabuk, tabaka, duvar, taşıyıcı veya enkapsülant şeklinde adlandırılmaktadır (Augustin ve ark. 2001; Gharsallaoui ve ark. 2007).

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 (Anal ve Sing 2007; Gharsallaoui ve ark. 2007).

Mikroenkapsülasyon amacıyla kullanılan 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. Bu yöntemler ayrı ayrı veya birlikte kullanılabileceği gibi çeşitli modifikasyonlarla da kullanılabilmektedir (Kailasapathy 2002; Lian ve ark. 2002; Krasaekoopt ve ark. 2003; Krasaekoopt ve ark. 2004). Bu yöntemlerden püskürterek kurutma ve ekstrüzyon-emülsiyon (dripping, damlatma) yöntemlerinin probiyotik mikroorganizmaların canlılığını %80-95 oranında koruduğu belirtilmektedir (Sheu ve Marshall 1993; Krasaekoopt ve ark. 2003).

2.3. Gıda Teknolojisinde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları

Peynir, yoğurt ve krema gibi fermente süt ürünlerinin yanı sıra tahıl ürünlerinin üretiminde laktik asit bakterileri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Donkor ve ark. 2007; Plessas ve ark. 2007; Cardarelli ve ark. 2008; Sendra ve ark. 2008). Fermente ürünlerde üretimin temeli organik asit oluşumu sonucundaki asitlik gelişimine dayanmaktadır. Laktozun laktik kültürler tarafından yıkımı sonucunda sindirilebilirliği gelişmekte ve laktik asit bakterilerinin çeşitli metabolik ve enzimatik aktiviteleri sonucu uçucu aroma maddeleri üretilmektedir. Bu da fermente süt ürünlerinde tat, aroma ve yapının gelişmesini sağlamaktadır. Probiyotikler sağlığa yararlı mikroorganizma hücreleridir. Laktik asit bakterileri ve özellikle laktobasil ve bifidobakter cinsleri probiyotik süt ürünleri üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin immobilizasyonunda değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bu tekniklerin amacı ya hücreyi yüksek konsantrasyonda biyoreaktörün içinde tutmak ya da hücreleri çevrenin olumsuz etkilerinden korumaktır. Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyonda kullanılacak, taşıyıcı materyal toksik olmamalı, kolay bulunabilmeli ve maliyeti yüksek olmamalıdır. Ayrıca yüksek hücre yükünü kaldırabilmeli ve canlı kalma süresini uzatabilmelidir. Gıda uygulamalarında en yaygın şekilde kullanılan immobilizasyon tekniği gıda saflığındaki polimerik matriks içerisinde hücre tutuklama yöntemidir. Birçok uygulamada polimer damlacıkları ekstrüzyon veya emülsiyon kullanılarak üretilmektedir. Damlacıkların termal (κ -karagenan, jelatin, agaroz, jelatin) ya da iyonotropik (aljinat, kitozan) katılaşması sonucunda, küre şeklinde biyokatalistler meydana gelmektedir. Bu polimerler kolay temin edilebilen, gıda ve süt endüstrisinde geniş bir şekilde kabul görmüş katkı maddeleridir. Bununla birlikte

gıda sektöründe immobilize hücrelerin endüstriyel üretilere yaygınlaşması için aseptik şartlarda ve büyük ölçekte mikrokapsül üretiminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Krasaekoopt ve ark. 2006; Doleys ve Lacroix 2009).

Biyoaktif bileşenleri içeren fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde çeşitli teknolojik zorluklar bulunmaktadır. Gıdalarda biyoaktif bileşenlerin özellikle probiyotikler, mineraller, fitosteroller, lutein, yağ asitleri, likopen ve antioksidanların amaçlanan hedeflere ulaşması için mikroenkapsülasyon yararlı, tercih edilen bir tekniktir. Gıda endüstrisinde çok çeşitli mikroenkapsülasyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu tekniklerde fonksiyonel gıdaların üretimi ve geliştirilmesi için umut vermektedir. Ayrıca bu teknolojiler biyoaktif bileşenlerin başarılı bir şekilde sindirim sistemine taşınmasını da teşvik etmektedir. Gelecekte yapılacak çalışmaların iki veya daha fazla biyoaktif bileşenin kombine bir şekilde koenkapsülasyonu ile özellikle sinerjik etki sağlamalarına yönelik araştırmalara yönelim olacağı düşünülmektedir (Champagne ve ark. 2007).

2.4. Probiyotik Kültürlerde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları

Probiyotik kültürlerde mikroenkapsülasyon uygulamalarının en önemli nedeni gerek katıldığı gıdanın teknolojik üretim süreçlerinde gerekse konakçının sindirim sisteminde gerçekleşen metabolik faaliyetler süresince hücrenin canlılığını belirli oranda korumasını sağlamaktır. Probiyotik kültürlerin mikroenkapsülasyonu konusunda yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmada olduğu gibi yerel kaynaklardan izole edilerek potansiyel probiyotik özellikleri belirlenmiş kültürlerin endüstriyel üretime kazandırılabilmesi amacıyla bu kültürlerde de

mikroenkapsülasyon tekniklerinin uygulanabilir olduğunun gösterilmesi gerekmektedir.

Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu konusunda yapılan bir çalışmada kaplanmış *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* ve *B. longum* suşları kaplanmış ve homojenizasyon yöntemi ile gerçekleştirilen kaplama ile elde edilen kalsiyum aljinat boncuklarının boyutlarındaki azalma ve bunun mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırmada Ultra-Turrax masaüstü homojenizatör, Avestin pistonlu homojenizatör ve Silverson mikser tipi olmak üzere üç farklı homojenizatör ve homojenizasyon tekniği kullanılarak boncuk büyüklüğü azaltılmıştır. Ayrıca homojenizasyon sırasında probiyotik mikroorganizmaların canlı kalmaları da incelenmiştir. En küçük boncuk büyüklüğü (39,2 µm) 13500 rpm’de 4 dk. ile Ultra-Turrax masaüstü homojenizatörde elde edilmiştir. Silverson mikser tipi homojenizatör kullanıldığında her bir probiyotik kültürün canlılığında kayda değer bir azalma gözlenmiştir. (<%5.5). Ancak homojenizasyon işleminde Ultra-Turrax ve Avestin homojenizer kullanıldığında sırasıyla %64.4 ve %47.7 olmak üzere canlı kalmada daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Capela ve ark. 2007).

Kim ve ark. (2008) araştırmalarında *L. acidophilus* ATCC 43121 kültürünü damlatma yöntemi ve sodyum aljinat ile mikroenkapsüle etmişlerdir. Çalışmada mikroenkapsülasyon işleminin bakterinin canlı kalma oranı üzerine etkisi, yapay gastrointestinal sisteme direnci ve sıcaklık duyarlılığı araştırılmıştır. Kaplama işlemi uygulanmamış hücreler yapay mide sıvısına (pH 1,2 ve pH 1,5) maruz bırakıldığında tamamen parçalanmıştır. Aynı uygulama, kaplanmış örneklerle yapıldığında sadece 3 log birimlik bir azalma olmuştur. Kaplanmış hücreler yapay mide suyu ve sıcaklık uygulamasına karşı serbest hücrelere göre önemli derecede daha yüksek direnç göstermişlerdir. Kolesterolün asimilatif azalması ise enkapsüle ve enkapsüle olmayan

örneklerde sırasıyla %35.98 ve %32.84 olmuştur. Mikroenkapsülasyon işleminin asit ve sıcaklık uygulamasında mikroorganizmalar üzerine etkin bir şekilde koruyucu rol oynadığı tespit edilmiştir.

Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu ile ilgili yapılan bir başka çalışmada ise üç farklı prebiyotik (yüksek dirençli mısır nişastası, raftilin, raftiloz) ile kaplanmış *L. acidophilus*'un, *in vitro* ortamda asitlik ve safra tuzları varlığında canlılığı araştırılmış; yüksek 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 yüksek 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 test edilmiş ve bu bakterinin yüksek dirençli mısır nişastası ve kitosan ile birlikte kaplanmasının *in vitro* asidik ve safra tuzu ortamında ve yoğurtta, aljinata göre canlılığını önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir (Iyer ve Kailasapathy 2005).

Mikroenkapsülasyonun, kaşar peynirinin olgunlaşması süresince *L. acidophilus* ve *B. bifidum*'un canlılığına etkisinin incelenmesi üzerine yapılan bir çalışmada; ekstrüzyon ve emülsiyon teknikleri ile kaplanan *L. acidophilus* ve *B. bifidum* kaşar peynirine ilave edilmiş ve 90 gün boyunca kaşar peynirinin mikrobiyolojik, biyokimyasal ve duyusal özellikleri incelenmiştir. Depolama sonucunda probiyotik hücrelerin canlılığının mikroenkapsülasyon sayesinde büyük çapta korunduğu gözlenmiştir. Haşlama işlemi sonunda kontrol grubu peynirdeki kaplanmamış probiyotik bakteri sayısı sürekli bir şekilde azalırken, kaplanmış

probiyotik bakteri sayısı minimum probiyotik etkinin görüldüğü eşik değerin üzerinde kalmıştır (Özer ve ark. 2009).

Sultana ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada kalsiyum aljinat–mısır nişastası karışımı ile kaplanmış *L. acidophilus* ve *B. bifidum* kültürlerinin yapay gastrointestinal sistemdeki ve yoğurttaki canlılık düzeylerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda mısır nişastası kullanımının kaplamada bakterilerin canlılığını nişasta kullanılmadan kaplananlara kıyasla arttırdığını tespit etmişler ancak; kaplama işleminin yüksek asit ve safra tuzu ortamında bakterilerin canlılıklarını arttırmada önemli bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Araştırmada ayrıca kaplanmış bakterilerin 8 haftalık depolama sonunda canlılıklarını 0,5 log birimi kaybederken, serbest hücrelerin sayısında 1 log birimi azalma olduğu tespit edilmiştir.

Soğukta depolanan set tipi yoğurtlardaki probiyotik organizmaların canlılığı ve aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada ise *L. acidophilus* LAFTIs L10 ve *L. casei* LAFTIs L26 probiyotik kültürleri ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Lb1466 ve *S. thermophilus* St1342 yoğurt kültürlerini sırasıyla %0,5 ve %1 oranında; yüksek amilozlu dirençli mısır nişastası veya inulini ise %1,5 (w/v) oranında yoğurt üretiminde kullanılmışlardır. Araştırmada 4°C’de 28 gün depolanan yoğurtlarda depolama boyunca probiyotiklerin canlı hücre sayıları, metabolitleri ve proteolitik aktiviteleri ile yoğurtların viskoziteleri incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre probiyotik bakterilerin canlılıklarını, inülin içeren yoğurtlarda yüksek amilozlu dirençli mısır nişastası içerenlere göre daha yüksek oranda koruduğu belirlenmiş; ayrıca her iki kaplama materyalinin de yoğurtların viskozitesini etkili bir biçimde arttırdığı tespit edilmiştir (Donkor ve ark. 2006).

Bazı *L. plantarum* türlerinin (*L. plantarum* 299v, *L. plantarum* 800 ve *L. plantarum* CIP A159) mikroenkapsülasyonu ile ilgili 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 demelerinde, dondurularak kurutulan küreciklerdeki çapraz bağların açılarak bakterilerin aljinat matriksinden salınımı incelenmiştir. Kaplanmış *L. plantarum* 299v (10,04 log kob/g), *L. plantarum* 800 (10.03 log kob/g) ve *L. plantarum* CIP A159 (10.12 log kob/g) yapay mide sıvısı içerisinde 37°C’de 60 dakika 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 dakika inkübasyona bırakılmış ve sadece bir bakteri küreciğinde (Lp299v) 2,74 log kob/g canlı bakteri kaldığı bulunmuştur. Bu alışma sonucunda araştırıcılar peyniraltı suyu proteinlerinin bakteri içeren aljinat küreciklerinin kaplanması için uygun, ucuz ve verimli bir kaplama materyali olduğunu göstermişlerdir (Gbassi ve ark. 2009).

Chen ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada, prebiyotiklerin kullanımının probiyotik mikroenkapsülasyonuna etkisini; optimum proses koşullarını, performansını ve bakterilerin canlılık oranlarını belirlemeyi amaçlamışlardır. Araştırmada prebiyotik olarak fruktooligosakkarit veya izomaltooligosakkarit;; büyüme destekleyici (peptidler) ve sodyum aljinat kullanılarak 4 farklı probiyotik bakteri (*L. acidophilus*, *L. casei*, *B. bifidum* ve *B. longum*) kaplanmıştır. Prebiyotiklerin, peptit ve sodyum aljinatın kullanım oranları cevap yüzey tekniği (Response Surface Method; RSM) yöntemi ile optimize edilerek belirlenmiştir. Optimizasyon sonuçları incelendiğinde %1 sodyum aljinat, %1 peptit ve %3 fruktooligosakkarit karışımı kaplama materyali olarak kullanıldığında probiyotiklerin canlılıklarını yüksek oranda korudukları belirlenmiştir. Yapay mide sıvısı ve safra

tuzu testlerinden sonra probiyotik bakteri sayısının 10^6 - 10^7 kob/g seviyelerinde kaldığı görülmüştür.

Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu üzerine yapılan başka bir çalışmada ise Ding ve Shah (2007) 8 probiyotik bakteri kültürünün asit ve safra 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 6,51 log kob/mL azalırken kaplanmış kültürlerin 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.

2.5. Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Bazı Kaplama Materyalleri

Mikroenkapsülasyon işleminin ilk aşaması mikroorganizmaya/materyale uygun bir kaplama maddesinin seçimidir. Kaplama materyali kapsül, duvar materyali, membran, taşıyıcı veya kabuk olarak adlandırılır. Kaplama maddeleri genel olarak film oluşturabilen, şekerler, gamlar, proteinler, doğal ve modifiye polisakkaritler, yağlar veya sentetik polimerlerdir. Kontrollü ilaç salınımını amaçlayan mikropartiküller genellikle suda çözünmeyen sentetik polimerler kullanılarak hazırlanmaktadır. Günümüzde polilaktik asit ve poligalaktik asit en çok

tercih edilen polimerlerdir. Çünkü bu maddeler ABD’de FDA tarafından onaylanan cerrahi dikişler, depo formülasyonları, biyomedikal uygulamalar için uzun zamandır kullanılmaktadır. Gıda sanayiinde ise genelde yağlar, nişastalar, dekstrinler, aljinatlar, protein ve lipit materyalleri enkapsülasyon materyali olarak kullanılmaktadır (Çizelge 2.4). Doğal örnekler olarak yumurta kabukları, bitki tohumları, bakteri sporları, deri ve deniz kabuğu verilebilir. Kaplama maddesinin yapısı mikrokapsüllerin fonksiyonel özelliklerini belirleyen ana faktördür (Gibbs ve ark. 1999; Adhikari 2000; Ersus 2006; Poncelet 2009).

Çizelge 2.4. Gıda bileşenlerinin kaplanmasında kullanılan bazı kaplama materyalleri

Grup Adı	Kaplama Materyali
Karbonhidratlar	Nişasta (dirençli, modifiye), maltodekstrin, mısır şurubu, dekstran, sukroz
Selülozlar	Karboksimetilselüloz, metilselüloz, etilselüloz, nitroselüloz, asetilselüloz, selüloz asetat fitalat, selüloz asetat-bütilat-fitalat
Gamlar	Aljinat, sodyum ve kalsiyum aljinat, akasya gamı, guar gam, agar, karrajenan
Yağlar	Vaks, parafin, balmumu, tristearik asit, monogliseritler, digliseritler, katılaştırılmış yağlar, katı yapılar ve sıvı yağlar
Proteinler	Gluten, kazein, jelatin, albumin, hemogloblin, peptitler

İdeal bir kaplama materyalinin taşıması gereken özellik şunlardır:

1. Yüksek konsantrasyonlarda iyi akışkanlık özelliği göstermeli,
2. Stabil bir emülsiyon oluşturmalı ve aktif materyalin dağılmasını engellemeli,
3. Kaplanacak madde ile proses sırasında veya depolamada reaksiyona girmemeli,
4. Proses ve depolamada aktif materyali tutabilme özelliğine sahip olmalı,

5. Enkapsülasyon işleminin gerçekleştirildiği kurutma veya diğer çözücü uzaklaştırma işlemleri sırasında çözücünün ayrılmasına olanak vermeli,
6. Aktif materyalin çevresel koşullara karşı (ısı, ışık, nem vb.) korunmasını sağlamalı,
7. Gıda endüstrisi için kabul edilebilir çözücülerde (su, etanol vb.) çözünmeli,
8. Kimyasal olarak geri dönüşümsüz reaksiyonlara neden olmamalı,
9. İstenilen kapsül çözünabilirliğine ve aktif materyalin istenilen oranda ortama salınmasına izin vermeli,
10. Ekonomik olmalıdır (Shahidi ve Han 1993; Ersus 2006; Weissbrodt 2009).

Kaplama materyalleri yukarıda sıralanan tüm özellikleri karşılayamayabilir. Bu nedenle kaplama materyallerinin farklı oranlarda karışım halinde kullanımı üzerine araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Mikroenkapsülasyonda genel olarak suda çözünmeyen polimerler kullanılmaktadır.

Mikroenkapsülasyon niteliklerine göre en sık kullanılan kaplama materyali grubunu hidrokolloitler ve gamlar oluşturur. Bu bileşenler su içinde çözünabilen, dağılabilen, kıvam ve viskozite arttırıcı etkileri olan uzun zincirli polimerlerdir. Gamlar genel olarak yapı ingrediyehteri olarak kullanılmaktadır. Gamlar enkapsülasyonda, emülsiyonların stabilizasyonunda, partiküllerin homojen dağılımında, kristalizasyonun kontrolünde ve sinerezisin engellenmesinde kullanılmaktadırlar. Bazı gam çeşitlerinin jel oluşturma özellikleri de bulunmaktadır (Brazel 1999).

2.6. Bazı Kaplama Materyallerinin Teknolojik Özellikleri

2.6.1. 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 bir polimerlerdir. Aljinik asit aljinatların serbest formu olup, ticari olarak üretilen aljinatların ara ürünüdür. Aljinik asit sınırlı kararlılık gösterir. Aljinik asit su tutma kapasitesi yüksek, suda çözünme yeteneği olan ve ticari olarak satılan Na, K, NH₄, Mg ve Ca aljinat tuzlarına dönüşebilir. Kalsiyum aljinat laktik asit ve probiyotik bakterilerin enkapsülasyonu için geniş bir kullanıma sahiptir. Genel olarak %0,5-4'lük konsantrasyonlarda kullanılmaktadırlar (ISP 2006).

Aljinatlar mikrobiyel hücrelerin mikroenkapsülasyonunda özellikle laktik asit bakteri kültürlerinin gıda fermentasyonlarında başarıyla kullanılmaktadır. Örneğin aljinat-nişasta karışımıyla kaplanmış probiyotik bakterilerin, gastrointestinal şartlarda ve yoğurta bakterilerin canlılıklarını önemli ölçüde daha iyi korudukları bilinmektedir. Dondurulmuş buzlu sütte bifidobakterilerin aljinat veya κ -karagenan ile mikrokapsülasyonunun bakterilerin canlılıklarını sürdürmesine katkı sağladığı gözlenmiştir (Lee ve ark. 2000; Homayouni ve ark. 2008).

Aljinatın nişastayla karıştırılarak kullanılması yaygın bir kullanım olup, özellikle laktik asit bakterilerinde enkapsülasyon verimini arttırdığı gösterilmiştir (Gbassi ve ark. 2009). Bakteri hücrelerini iyi korumasının yanı sıra aljinat-nişasta karışımlarının mikrobelerin ve metabolitlerinin de kapsüllerin arasına nüfuz

etmesini sağlayarak başka bir avantaj da sağlamaktadır. Sonuç olarak boncuklar metabolik olarak aktif hücreleri içermektedir (Cantergiani 2009).

Aljinat kapsüllerinin mikroenkapsülasyon uygulamalarında yaygın olarak kullanılmasının nedenleri; bakteri hücrelerinin etrafında kolay jel matriksi oluşturması, metabolizma için toksik özellik taşınaması, gıda için güvenilir ve biyouyumlu olması, ucuz olması, farklı proses koşullarında iyi performans gösterebilmesi, kolay hazırlanabilir ve uygulanabilir olması, bağırsaklarda kolay çözünebilir ve hücrelerin salınımına izin verebilir olması sayılabilir. Bu avantajlarının yanı sıra aljinatların kullanımını kısıtlayan bazı nedenler ise; asidik çevre koşullarına hassas oluşu, laktik asit içeren çevrelerde mekanik stabilitelerinin zayıf oluşu, kalsiyum iyonları varlığında oluşan aljinat jel matriksinin monovalent iyonları, fosfatlar, laktatlar ve sitratlar gibi kelat oluşturan ajanların varlığında yapısının bozulması, endüstriyel uygulamalarda büyük ölçekli üretimlerde maliyetin kısmen de olsa yüksek oluşu, hızlı nem difüzyonuna ve diğer sıvıların kapsüllere penetrasyonuna direncinin zayıf oluşu sayılabilir (Mortazavian ve ark. 2007).

Araştırmada kullanılan manukol, aljinatın gıda saflığında üretilmiş ve gıda endüstrisinde kullanılan sodyum aljinatın ticari ismidir. Manukol; %1'lik çözeltisindeki vizkozitesi 40-90 mPa.s, partikül büyüklüğü 250-355 µm, beyaz-sarımtırak renkte, GRAS statüsünde ve E401 kodu ile bilinen gıda katkı maddesidir (ISP 2006).

2.6.2. Nişasta

Mikroenkapsülasyonda kullanılan nişasta beslenme fizyolojisi ve fonksiyonları açısından önemli bir diyet bileşenidir. Özellikle dirençli nişasta ince

bağırsakta pankreatik amiloz tarafından parçalanamaz ve kalınbağırsağa ulaşır ve burada yerleşik bulunan gastrointestinal sistem mikroflorası tarafından fermente edilebilmektedir. Karbonhidratların anaerobik bakteriler tarafından fermentasyonu sonucu kısa zincirli yağ asitleri meydana gelmekte, bunun sonucu olarak da pH düşmektedir. Bu özelliklerinden dolayı dirençli nişasta gıdalardaki probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistemdeki canlılıklarının korunmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Dirençli nişasta kullanımının bir diğer nedeni, 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 çalışmada 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 bulmuşlardır.

2.6.3. Karagenan

Karagenan, deniz yosunlarından elde edilen, ismini sahilleri boyunca bu deniz yosunlarının yoğunlukta olduğu İrlanda'nın Carragheen köyünden alan bir polisakkarittir. Karagenanların en önemli avantajlarından biri, tiksotropik olmalarıdır. Bu özellikleri sayesinde kolay pompalanabilmekte ve ardından tekrar aynı viskoziteye dönüşmektedir. Üç tip ticari karagenan vardır. Bunlar:

- Kappa-karagenan: Sert ve katı jeller oluşturmakta ve *Kappaphycus cottonii*'den üretilmektedir.
- Iota-karagenan: Yumuşak jeller oluşturmakta ve *Eucheuma spinosum*'dan üretilmektedir.
- Lambda-karagenan: Su yerine proteinlerle birleştiğinde jel oluşturmakta, süt ürünlerini koyulaştırmak amacıyla kullanılmakta ve *Gigartina*'dan üretilmektedir.

Mikroenkapsülasyon uygulamalarında κ -karagenan ve karışımları yaygın olarak kullanılır. κ -karagenan kırmızı deniz yosunlarının selülozik yapısındaki boşlukları dolduran, doğal bir polisakkarittir. Yüksek moleküler ağırlığa sahip lineer bir polisakkarit olan κ -karagenan galaktoz birimlerinin ve 3,6-anhidrogalaktozların tekrarlanmasıyla meydana gelmiştir. κ -karagenanın çözünmesi için yüksek sıcaklıklar gerekir ve %2-5 konsantrasyonlarda uygulanır. Bu polimere sterilize edilmiş ve soğutulmuş (40-50°C) probiyotik içeren hücreler eklendikten sonra oda sıcaklığına soğutulması sonucunda jelleşir. KCl formundaki potasyum gibi monovalent iyonlarının eklenmesi boncuk jellerinin oluşumunu sağlar. Fakat KCl'nin bazı laktik asit bakterileri (*S. salivarius* subsp. *thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) üzerine inhibitör etki gösterdiği belirtilmektedir. K^+ iyonları yerine Rb, Cs ve NH_4^+ iyonlarının kullanımı önerilmekte böylece daha güçlü jel oluşumu sağlanmaktadır (Homayouni ve ark. 2008; Cantergiani 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Mikroorganizmalar, Besiyerleri ve Kaplama Materyalleri

Bu çalışmada daha önceki çalışmalarda izole edilen ve tür düzeyinde moleküler tanısı (16S rRNA dizi analizi) yapılmış olan *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 suşları kullanılmıştır. Bakterilerin izolasyonu MRS Agar (Merck Almanya) besiyerinde gerçekleştirilmiştir.

Mikroenkapsülasyonda kullanılan gıda saflığındaki kaplama materyalleri ISP Corp. (International Specialty Products İstanbul Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Mikroorganizmaların kaplanmasında sodyum aljinat (Sigma), manukol (ISP gıda saflığında sodyum aljinat) ve nişasta (Sigma-Aldrich-Fluka) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanısı ve Antimikrobiyel Aktivitesi

Araştırmada kullanılan mikroorganizmalardan *L. acidophilus* KPb4b suşu fermente süt ürününden, *L. rhamnosus* KPb7 suşu ise anne sütü ile beslenen bebek dışkısından izole edilmiştir. İzolasyon materyalinden aseptik koşullarda alınan 10 g/mL örnek 90 mL fizyolojik tuzlu su (FTS, % 0,85 NaCl) çözeltisi ile 10^{-5} düzeyine kadar seyreltildikten sonra MRS Agara ekim yapılmıştır (Çakır 2003; Kılıç 2008).

İzole edilen mikroorganizmaların saflık kontrolleri yapıldıktan sonra, mikroskopta morfolojik yapıları belirlenmiş, Gram reaksiyonu, katalaz testi, arjininden amonyak oluşumu, oksidaz testi, 10, 15, 45 ve 50°C'de gelişme, litmuslu sütte asitlik geliştirme ve %2, %4 ve %6,5 NaCl'de gelişme ve pH 9,6'da gelişme testleri yapılarak ön tanıları gerçekleştirildikten sonra, API 50CHL (Biomerieux, Fransa) kiti kullanılarak biyokimyasal tanıları gerçekleştirilmiştir (Shah 2000; Çakır 2003).

Moleküler tanı için LAB kültürlerinin DNA izolasyonları Fermentas marka ticari DNA izolasyon kiti (Genomic DNA Purification Kit K0512, Fermentas) kullanılarak, kitte verilen protokole göre gerçekleştirilmiş (Çakır 2003; Çakır ve Çakmakçı 2004); PCR reaksiyonları ve 16S rRNA dizi analizi ise REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'nden (ODTÜ Teknokent, Ankara) hizmet alımı yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre elde edilen baz dizi sıraları, NCBI (National Center for Biotechnological Information) BLAST veri tabanında bulunan kültürlerle karşılaştırılarak tür düzeyinde tanı gerçekleştirilmiştir (Çakır 2003).

İzolasyonu ve moleküler tanısı yapılan bu suşların bazı probiyotik özellikleri önceki çalışmalar kapsamında belirlenerek potansiyel suşlar olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında seçilen mikroorganizmaların bazı indikatör (*Micrococcus luteus*) gıda patojenleri (*Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*) ve aynı cins laktik asit bakterilerine (*L. plantarum*) karşı antimikrobiyel aktiviteleri Çakır (2003) tarafından kullanılan yöntemle göre belirlenmiştir.

3.2.2. Kültürlerin Mikroenkapsülasyonu

3.2.2.1. Kültürlerin Hazırlanması

Kaplama işlemi uygulanacak mikroorganizma kültürü 2 kez aktifleştirildikten sonra 50 mL MRS Broth besiyerinde geliştirilmiş ve daha sonra 30 mL'lik steril santrifüj tüplerine aktararak 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj (Sigma 2-16 KC, Almanya) edilmiştir. Elde edilen pelet iki defa 5 mL FTS ile yıkanarak tekrar aynı koşullarda santrifüj edildikten sonra, 5 mL FTS'de     lm ş ve üzerine 45 mL kaplama    eltisi ilave edilerek 100 rpm'de 5 dakika homojen bir karışım oluşturmak için karıştırılmıştır. Hazırlanan em lsiyondan 20 mL'lik steril şırınga (Ayset, Türkiye) ile alınan bakteri/kaplama materyali karışımı cihaza yerleştirilerek kaplama işlemi uygulanmıştır.

3.2.2.2. Mikroenkapsülasyon İşlemi ve Kaplama Koşulları

Mikroorganizmaların kaplanması Nisco Var A Model (Nisco Eng. Inc. Zürih, İşvi re) mikroenkapsülatör sistemi kullanılmıştır. Bu cihaz elektrostatik titreşim ile ekstrüzyon/emülsiyon tipi kaplama işlemi yapabilen ve komple sterilize edilebilen bir düzenek olup, 100, 150 ve 400  m'lik 3 adet nozzle (Nisco Engineering Inc. Zürih, İşvi re) ile donanımlı bir sistemdir (şekil 3.1).

Yapılan birçok denemeden sonra tercih edilen kaplama materyalleri %1,5 aljinat, %1,5 manukol ve %1,5 aljinat+%0,5 nişasta karışımlarının viskoziteleri viskozimetri cihazı (AND Vibro Viscometer SU-10 Model) kullanılarak, 23-25 C aralığında, 30 Hertz frekansta, sabit titreşimde, her 10 sn'de bir okuma yapılarak

mPa.s cinsinden ölçülmüştür. Tespit edilen en uygun çalışma parametreleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan Nisco Var A model mikroenkapsülasyon cihazı

Çizelge 3.1. Mikroenkapsülasyon işleminde uygulanan çalışma parametreleri

Parametre	Çalışma Aralığı	Çalışma Aralığı
Mikroorganizmalar	<i>L. acidophilus</i> KPb4b, <i>L. rhamnosus</i> KPb7	<i>L. acidophilus</i> KPb4b, <i>L. rhamnosus</i> KPb7
Kaplama materyeli	%1,5 Aljinat, %1,5 Manukol	%1,5 Aljinat+%0,5 Nişasta
Katılaştırma çözeltisi	0,1 M CaCl ₂ ve 1 M CaCl ₂	0,1 M CaCl ₂ ve 1 M CaCl ₂
Nozzle çapı	150 µm	150 µm
Akış hızı	6,5 mL/dk	6,5 mL/dk
Frekans	2,21 kHz	2,48 kHz
Amplitude (Genlik)	%95	%95
Şırınga çapı	20 mL	20 mL
Led duration	%20	%20
Viskozite	70-395 mPa. s	230-400 mPa. s

Sistemin çalışma prensibi kısaca: Cihaz tespit edilen çalışma parametrelerine (akış hızı, frekans ve genlik değerleri) kurulduktan sonra, steril şırıngaya doldurulan emülsiyon cihaza yerleştirilir ve cihaz çalıştırılır. Peristaltik pompanın hareketi ile şırıngadan gelen karışım nozzle sisteminden geçmeye zorlanırken önce büyük damlalar, ardından da standart düzgün bir akış elde edilirken, mikrokapsüller

şeklinde sistemden çıkan çok küçük damlacıklar toplama tankı içerisindeki 0,1 M CaCl_2 sertleştirme çözeltisine düşer. Bu arada toplama tankında bulunan manyetik karıştırıcı çalıştırılarak küreciklerin yapışması engellenir. Bu şekilde üretilen mikrokürecikler 30 dakika karıştırıldıktan sonra buzdolabında bir gece bekletilerek tam katılaşma işlemi tamamlanmış olur.

3.2.3. Mikrokapsüllerin Stabilitesi ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Mikrokapsüllerin Boyutlarının Belirlenmesi

Bu amaç için oküler mikrometre kullanılmıştır. Mikrokapsüllerden hazırlanan yaş preparatlar, aydınlık saha mikroskobunda (Baecon, Almanya) 10x objektifte incelenmiş, her preparatta en az 10 kürecikte, 2 farklı eksen üzerinde yapılan ölçümlerin ortalamaları alınarak bir yandan boyutları belirlendi, diğer yandan da elde edilen küreciklerin şekli belirlenmiştir (Sultana ve ark. 2000; Talwalkar 2003).

3.2.3.2. Mikroenkapsülasyon Verimi ve Mikrokapsülden Hücre Salınımı

Mikroenkapsülasyon veriminin belirlenmesinde kaplama öncesi ve sonrasında mikroorganizma sayıları belirlenmiş ve aradaki farktan yola çıkılarak mikroküreciklerde tutulan mikroorganizma sayıları tespit edilmiştir. Buna ilaveten, 50 mL MRS Broth'ta geliştirildikten sonra santrifüjlenerek elde edilen yaklaşık 0,5 g pelet 2 kez %0,85 FTS ile yıkandıktan sonra 5 mL %0,85 FTS'de karıştırılmış ve 45 mL kaplama çözeltisine katılarak emülsiyon haline getirildikten sonra kaplama işlemi uygulanmıştır. Kaplama sonrasında, katılaştırma işleminden sonra katılaştırma

çözeltilisinden ayrılan mikroküreciklerin sulu ve susuz ağırlıkları tartılarak belirlenmiştir.

Salınım testlerinde ise mikroküreciklerin içerdiği canlı hücre sayısının tespit edilmesi ve mikroküreciklerin parçalanarak mikroorganizma salınımına karşı gösterdikleri direnç özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için 5 g yaş kapsül alınarak içerisinde 45 mL 0,1 M KPO_4 tamponu (pH 7,0) bulunan stomacher torbasına konulmuş ve 30 dakika homojenize edilmiştir. Homojenizasyon öncesi ve sonrası mikroorganizma sayıları karşılaştırılarak ne kadar mikroorganizmanın serbest hale geçtiği tespit edilmiştir (Adhikari 2000; Talwalkar 2003).

3.2.3.3. Oksijen Toksisite Testleri

Bu testte kaplanmış ve serbest mikroorganizma kültürünün aynı koşullarda geliştirilerek elde edilen mikroorganizma sayılarının karşılaştırılması ile kaplama işleminin bakterinin oksijen direncine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için; içerisinde 100 mL RSM (Reconstituted Skim Milk) Broth (%9,5 yağsız süt tozu, %2 glukoz, %0,5 maya ekstraktı içeren) bulunan iki adet 250 mL'lik erlenlere test edilecek mikroorganizma kültürlerinden (kaplanmış ve serbest hücre olarak ayrı ayrı) aynı miktarda inoküle edilmiştir. Erlenlerin tamamı pamuk ile kapatılarak aerobik koşullarda 100 rpm'de, 24 saat inkübe edilmiştir. RSM besiyerinde 37°C'de 24 saat, gıda ortamlarında ise 5°C'de 24 saat inkübasyon sonucunda mikroorganizma sayımı yapılmıştır. İnkübasyon başlangıcında (0. saat) ve sonunda (24. saat) elde edilen mikroorganizma sayıları karşılaştırılarak mikroorganizmanın oksijen direnci belirlenmeye çalışılmıştır (Sultana ve ark. 2000; Kailasapathy 2002; Talwalkar 2003; Talwalkar ve Kailasapathy 2004).

3.2.3.4. Mikrokapsüllerin Sıcaklık Direncinin Belirlenmesi

Sıcaklığın mikrokapsüller üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu denemede 3 farklı materyal ile kaplanmış probiyotik kültürlerinden 1'er gram yaş kapsül, kaplanmamış serbest kültürlerden ise 1 mL alınarak, sıcaklığı önceden ayarlanmış su banyosunda tutulan ve içerisinde 9 mL %1'lik peptonlu su bulunan tüplere konulmuş ve karıştırıldıktan sonra 55°C'lik su banyosuna konulmuştur. Buradan denemenin başlangıcında ve her 30 dakikada bir örnek alınarak 4 saat süresince yapılan ekimlerle mikroorganizma sayısı belirlenmiştir (Gardiner ve ark. 2000; Sultana ve ark. 2000; Kailasapathy 2002; Talwalkar 2003; Lakkis 2007).

3.2.3.5. Mikrokapsüllerin Depolama Stabilitésinin Belirlenmesi

Farklı kaplama materyalleri (aljinat, manukol ve aljinat+nişasta karışımı) ile hazırlanan kapsüller ve serbest hücre kültürleri +24°C, +5°C ve -18°C'de 1 ay depolanmış, depolamanın başlangıcında ve haftada bir yapılan sayımlarla, farklı sıcaklıklarda kaplama materyallerinin, mikroorganizma canlılığı üzerine etkisi belirlenmeye çalışılmıştır (Sultana ve ark. 2000; Kailasapathy 2002; Lee ve ark. 2004; Donkor ve ark. 2007; Li ve ark. 2009).

3.2.3.6. Mikrokapsüllerin Yapay Mide ve Bağırsak Ortamındaki Stabilités

Kaplama işleminin probiyotik mikroorganizmaların sindirim sistemi ortamdaki canlılıkları üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu

denemede, mide ve ince bağırsak ortamları *in vitro* koşullarda oluşturulmuş ve bu ortamlarda kapsüllerdeki canlı mikroorganizma sayıları belirlenmiştir. Buna göre yapay mide ortamı için 0,2 g NaCl tartılarak, üzerine 1 N 0,7 mL HCl eklenmiş ve saf suyla 100 mL'ye tamamlandıktan sonra bu çözeltinin 1,2 olan pH'sı 2,0'a ayarlanmış ve 100 mL'lik şişelere 20'şer mL olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Yapay bağırsak ortamı için ise 0,2 N 11,8 mL NaOH çözeltisi üzerine 0,2 M 25 mL KH₂PO₄ eklenmiş ve çözelti saf suyla 100 mL ye tamamlanmıştır. pH'sı 6,8 olan bu çözelti de 100 mL'lik şişelere 20'şer mL olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Deneme esnasında üç farklı kaplama materyali ile kaplanmış olan *L. acidophilus* KPb4b, *L. rhamnosus* KPb7 kapsüllerinden 1'er gram tartılarak içerisinde 20 mL yapay mide ve ince bağırsak ortamı bulunan şişelerin içerisine atıldıktan sonra 37°C'deki inkübatörde 3 saat boyunca saat başı ekimler yapılarak canlı mikroorganizma sayısı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu denemede kapsüller yapay ortamlara ilave edildikten sonra sayım için yapılan ilk 1/10'luk seyrelti 0,1 M KPO₄ tamponu (pH 7,4, Merck) içerisinde, diğer seyreltiler ise MRD (Maximum Recovery Diluent, Merck) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk seyreltide fosfat tamponu kullanılmasının nedeni kapsüllerin tam olarak açılmasını sağlamaktır (Lee ve Heo 2000; Sultana ve ark. 2000; Hou ve ark. 2003; Iyer ve Kailasapathya 2005; Kim ve ark. 2008).

3.2.4. Mikrokapsüllerin Yapısının Elektron Mikroskopta İncelenmesi

Farklı kaplama materyallerini ile hazırlanan mikrokapsüllerin görüntüleri AİBÜ Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü'nde, taramalı elektron mikroskop

(SEM; JEOL JSM 6390 VL, Akishima, Japonya) kullanılarak, 20 kV hızlandırılmış voltaj uygulaması altında çekilmiştir. SEM'deki morfolojik incelemelerde yaklaşık 0,5 g ağırlığındaki yaş kapsülün ikincil elektron görüntüleri (SEI; Secondary Electron Image) kullanılmıştır (Sultana ve ark. 2000; Calleros ve ark. 2007).

3.2.5. Mikroenkapsüle Probiyotik İçeren Gıda Örneğinin Duyusal Analizi

Mikroenkapsüle probiyotik mikroorganizma kullanımının gıdaların duyusal özelliklerine etkisini model gıda olarak seçilen puding ortamında gerçekleştirilmiştir. Denemede ticari olarak satılan hazır toz puding karışımı kullanılmış ve pudingler üretici firma talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Pişirme işleminden sonra sıcaklık 40-45°C civarında iken, 10^8 kob/g düzeyinde canlı kültür içeren kapsüller, ürünlere 1/10 oranında katılıp, homojen bir karışım sağlandıktan sonra porsiyonlara bölünmüş ve 0. günde mikroorganizma sayısı ve pH (Selecta pH Meter pH-2005 Model, İtalya) değerleri belirlenmiş ve ayrıca duyusal analizleri yapılmıştır. Bu tür ticari sütlü tatlıların raf ömrüne uygun olarak, kapalı kaplarda, +4°C'de buzdolabında muhafaza edilen ürünlerde aynı analizler bir hafta sonra tekrar yapılmış ve değişimler tespit edilmeye çalışılmıştır. Duyusal değerlendirme öncesinde 8 panelist tadım yapacakları ürünler hakkında bilgilendirildikten sonra rastgele üç basamaklı rakamlarla kodlanan ürünlerin değerlendirilmesi istenmiştir. Değerlendirmede panelistlerin ürünleri, koku, kıvam, renk, görünüş, tat, ağızda bıraktığı his ve genel beğeni açısından ürünlere 1: Çok kötü, 2: Kötü, 3: Orta, 4: İyi ve 5: Çok iyi olmak üzere puanlandırılması istenmiştir (Uysal-Pala ve ark. 2005; Temiz ve Hurşit 2005).

3.2.6. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kapsüllerinin depolama stabilitesi, yapay mide ve bağırsak ortamındaki stabiliteleri arasında fark olup olmadığı, fark varsa hangi grubun (veya grupların) diğerlerinden farklı olduğu, fark yoksa ortalamaların ne olduğu araştırılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar incelenirken, iki gruplu karşılaştırmalar için *t* testi veya Mann-Whitney U testi, ikiden fazla gruplu karşılaştırmalar için ise Anova veya Kruskal-Wallis testleri kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda, hangi grubun diğerlerinden farklı olduğunu belirlemek için, Scheffe ve Tamhane's T2 testleri kullanılmıştır. Veriler SPSS 18.00 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar incelenirken, normal dağılan iki gruplu karşılaştırmalar için *t* testi, ikiden fazla gruplu karşılaştırmalar için Anova kullanılmıştır. Normal dağılmayan iki gruplu karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi, ikiden fazla gruplu karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. İzolasyon ve Tanı Sonuçları

Araştırmada kullanılan *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 suşlarının API 50CHL biyokimyasal tanı ve 16S rRNA dizilimi moleküler tanı sonuçları baz dizisi erişim numarası (accession number) ile birlikte Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde biyokimyasal tanı sonucuna göre %65,3 oranında *L. delbrueckii* subsp *lactis* olarak adlandırılan KPb4b suşunun moleküler tanı sonucuna göre %98 oranında *L. acidophilus* olduğu tespit edilirken; KPb7 suşunun hem biyokimyasal hem de moleküler tanı sonucuna göre *L. rhamnosus* olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan suşların biyokimyasal ve moleküler tanı sonuçları

Kodu	Biyokimyasal Tanı Sonuçları		Moleküler Tanı Sonuçları		
	API 50CH Tür Adı	Yüzde (%)	16Sr RNA Tür Adı	Yüzde (%)	Erişim Numarası
KPb4b	<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i>	65.3	<i>L. acidophilus</i>	98	AY763430.1
KPb7	<i>L. rhamnosus</i>	99.7	<i>L. rhamnosus</i>	97	EU483094.1

L. acidophilus KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 suşlarının 16S rRNA dizilimine göre gerçekleştirilen moleküler tanı sonuçlarından elde edilen dendogramlar EK1 ve EK 2’de verilmiştir.

Laktik asit bakterileri izole edildikleri ortamlarda aynı familyadan birçok diğer bakteri ile benzer morfolojik özellikleri gösterdikleri için klasik tanı testleri ile kesin olarak tanımlanmaları her zaman mümkün değildir. İnsan beslenmesinde kullanılmak üzere seçilen potansiyel probiyotik kültürlerde aranması gereken en öncelikli özellik, bu mikroorganizmaların moleküler yöntemler kullanılarak kesin tanımlarının yapılmış olmasıdır. Laktik asit bakterileri GRAS statüsünde mikroorganizmalar olup birçok gıda maddesinin üretiminde starter kültür olarak da kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmaların beklenen ve/veya tespit edilen üstün teknolojik özellikleri gösterebilmeleri ve ticari üretimlerde kullanılabilmesi için öncelikle bu kültürlerin saf olarak izole edilmesi ve ileri moleküler tekniklerle kesin tanımlarının yapılması gerekmektedir (Roy ve ark. 2001; Çakır 2003).

Roy ve ark. (2000) potansiyel probiyotik bakterilerinin moleküler yöntemlerle tanısını yaptıkları araştırmalarında, *L. acidophilus* grubu içerisinde, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* ve *L. johnsonii* olmak üzere 6 adet bakteri bulunduğunu ve bunların klasik yöntemlerle birbirlerinden ayrımlarının çok zor olduğunu belirtmişlerdir. Buna göre araştırmacılar 16S ve 23S rRNA hedefli problemler kullanarak yaptıkları araştırmada, standart suşlardan *L. acidophilus* olarak alınan bazı bakterilerin aslında *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum* ve *L. gasseri* türü suşlar olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da benzer olarak *L. acidophilus* KPb4b suşu klasik biyokimyasal yöntemlerle elde edilen tanısından farklı bir tür olduğu belirlenmiştir.

Fonksiyonel ürünlerin bilinçli tüketiciler tarafından daha çok tercih edildiği günümüzde probiyotiklerin fonksiyonel gıda üretimindeki payları giderek artmaktadır. Probiyotiklerin beklenen faydalı etkileri gösterebilmesi için 10^6 - 10^8 kob

düzeyinde bağırsak sistemine ulaşması gerekmektedir (IPW 2004; Borza 2007). Probiyotik ve teknolojik tüm özelliklerinin mükemmel olduğu bir mikroorganizma henüz tanımlanmamıştır. Ancak araştırmacılar üstün nitelikleri olan suşların bazı dezavantajlarını iyileştirmek amacıyla ya kültürlerin birlikte kullanımı yoluna gitmiş ya da bu probiyotik kültürleri kaplayarak olumsuz etkilerden korunmasını amaçlamıştır. Böylece bu kültürlerin hem teknolojik özellikleri iyileştirilmekte hem de gastrointestinal sistemde canlılıkları korunarak bağırsak sistemine yüksek sayıda ulaşmaları sağlanmaktadır (Desai ve Park 2005). Çakır (2003) tarafından yapılan bir çalışmada piyasa satılan hazır bazı ticari probiyotik diyet destekleyici tablet ve kapsüllerde, etiket üzerinde belirtilen içerikten farklı probiyotik cins ve türden mikroorganizmaların da bulunduğu tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada bazı ürünlerde canlı probiyotik bakteri kültürüne rastlanmazken bazılarında da mikroorganizmaların canlılıklarını önemli oranda kaybettikleri belirlenmiştir. Bu nedenle probiyotik mikroorganizma seçiminde kesin tanı ve canlılık düzeyi önemli birer kriter olarak karşımıza çıkmaktadır.

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Aktivite Sonuçları

Araştırma kapsamında izole edilen LAB'nin antimikrobiyel aktivite testleri bazı indikatör mikroorganizma ve belirli gıda patojenlerine karşı gösterdikleri inhibisyon zonlarının belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Suşların indikatör mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antimikrobiyel aktivite Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Araştırmada kullanılan LAB'nin antimikrobiyel aktiviteleri

Tür Adı	İndikatör Mikroorganizmalar						
	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	O157:H7	<i>S. enteritidis</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KPb4b	+/-	Nz	+		+/-	+	Nz
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KPb7	+	Nz	+		+	+	Nz

+: Antimikrobiyel aktivite zonu var; +/-: Kısmi (zayıf) inhibisyon var; Nz: İnhibisyon gerçekleşmedi

Çizelgeden görüldüğü gibi hem *L. acidophilus* KPb4b hem de ve *L. rhamnosus* KPb7 suşları önemli gıda patojenlerinden *L. monocytogenes* ve *S. enteritidis*'e karşı antimikrobiyel aktivite göstermiş ancak aynı cinsten olan *L. plantarum*'a karşı inhibisyon etki göstermemiştir. Probiyotik olarak seçilen potansiyel suşların aynı cins mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkisi göstermemesi istenen bir özelliktir.

4.3. Mikroenkapsülasyon Koşulları ve Kaplama Materyalinin Seçilmesi

Mikroenkapsülasyon çalışmalarında öncelikle uygun kaplama maddeleri ve konsantrasyonlarının seçilmesi amacıyla çeşitli kaplama materyallerinin kapsül oluşturabilme yetenekleri belirlenmiştir. Bu denemelerde kullanılan kaplama materyalleri, özellikleri ve denemelerde kullanılan konsantrasyonlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Kaplama materyalleri, önce kullanılacakları konsantrasyonlarda tartılarak otoklavda 118-121°C'de 15 dk. sterilize edildikten sonra steril su ilave edilerek, su banyosunda 70-80°C'de, arada bir karıştırılarak homojen bir karışım hazırlanmıştır.

Çizelge 4.3. Kaplama işleminde kullanılan maddeler ve bazı özellikleri

Materyal Adı	Özellikleri	Konsantrasyon (w/v)
Aljinat (Alginic acid sodium salt)	Yüksek viskoziteli, kahverengi algden elde edilmiş, Sigma-Aldrich ürünü	%0,5, %1, %1,5
Manukol DH	Viskozitesi (%1'lik çözelti) 40-90 mPa.s, partikül büyüklüğü 250-355 µm, beyaz-sarımtırak, GRAS, E401 (Sodyum aljinat)	%0,5, %1,5
Karragen (Carrageenan)	Irish moos olarak bilinen bir algden (<i>Chondrus crispus</i>) elde edilmiş, kıvam arttırıcı ve stabilizör olarak kullanılan, Tip 1 bitkisel jelatin, Sigma	%0,5, %1,5
Keçiboynuzu gamı A (Locust bean gum ISP LBG A175)	Viskozitesi (%1'lik çözelti) 2600-3200 mPa.s, partikül büyüklüğü 150-250 µm, beyaz-sarımtırak, GRAS, E410	%0,5, %1,5
Keçiboynuzu gamı B (Locust bean gum ISP LBG B175)	Viskozitesi (%1'lik çözelti) 2400-3000 mPa.s, partikül büyüklüğü 150-250 µm, beyaz-sarımtırak, GRAS, E410	%0,5, %1,5
Ksantan (Xanthan) gum XG 80	Viskozitesi (%1'lik çözelti) 1200-1600 mPa.s, partikül büyüklüğü 180-250 µm, beyaz-krem, E415	%0,5, %1,5
Ksantan (Xanthan) gum XG 200	Viskozitesi (%1'lik çözelti) 1200-1600 mPa.s, partikül büyüklüğü 75-180 µm, beyaz-krem, E415	%0,5, %1,5
Demineralize (%70) peynir altı suyu tozu	Gıda saflığında üretilmiş, beyaz peynir altı suyu tozu	
Nişasta	Patatesten elde edilmiş çözülebilir, beyaz toz, Sigma-Aldrich-Fluka	%0,5, %1, %1,5
Arap zambkı, akasya gamı (Acacia gum ISP AC 100)	Çok yüksek saflıkta, partikül büyüklüğü 150 µm, kirli beyaz-açık sarımtırak, E414	%0,5, %1,5
Arap zambkı, akasya gamı (Acacia gum ISP AC 150)	Saf, partikül büyüklüğü 150 µm, beyaz-kirli beyaz, E414	%0,5, %1,5

Kaplama işlemi öncelikle 100 µm'lik nozzle kullanılarak denenmiş, ancak özellikle manukol (gıda saflığında aljinat) ile kaplama işleminde hazırlanan materyalin nozzle sistemini tıkaması sonucu 150 µm'lik nozzle ile çalışılmaya karar verilmiştir. Kaplama işlemine başlamadan önce tespit edilen kaplama materyali

konsantrasyonlarındaki çalışma parametrelerinin tespit edilmesi ve böylece olabildiğince standart kapsüllerin elde edilmesi amacıyla parametreler, belirli aralıklarda denenerek cihazın optimum çalışma koşulları tespit edilmiştir. Üzerinde çalışılan parametrelerden en önemlileri peristaltik pompanın akış hızı, elektrostatik cihazın frekansı ve genlik değeridir. Bu üç değer her bir mikroorganizma ve kaplama materyali için önceden belirlenmiş, cihaz sterilize edilerek yapılan asıl denemelerde direkt olarak kullanılmıştır. Bunlara ilaveten kullanılan nozzle çapı, katılaştırma çözeltisi (CaCl_2) konsantrasyonu, kaplama materyalinin partikül büyüklüğü ve hazırlanan emülsiyonun viskozitesi, kullanılan şırınganın hacmi gibi özellikler de kapsül oluşumunu etkileyen parametrelerdendir. Çalışma koşullarının tespit edilmesinde denenen parametre sınırları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

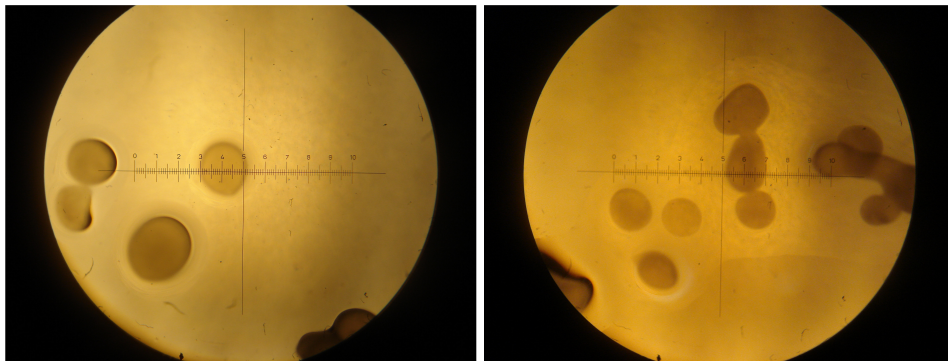
Çizelge 4.4. Çalışma koşullarının belirlenmesinde kullanılan parametreler ve sınırlar

Parametre	Denenen Sınır Aralığı	Tespit Edilen Çalışma Değeri
Mikroorganizmalar	-	<i>L. acidophilus</i> KPb4b <i>L. rhamnosus</i> KPb7
Kaplama materyeli	-	Çizelge 4.5'te verilen materyaller
Katılaştırma çözeltisi	0,1– 2M CaCl_2	0,1 M CaCl_2 ve 1 M CaCl_2
Nozzle çapı	100– 400 μm	150 μm
Akış hızı	1–10 mL/dk	6,5 mL/dk
Frekans	160 – 3000 Hz	2,21 kHz
Amplitude (Genlik)	%60 – % 100	%95
Şırınga çapı	0,5mL – 50 mL	20 mL
Led duration	%20	%20
Viskozite	70-400 mPa. s	70-400 mPa. s

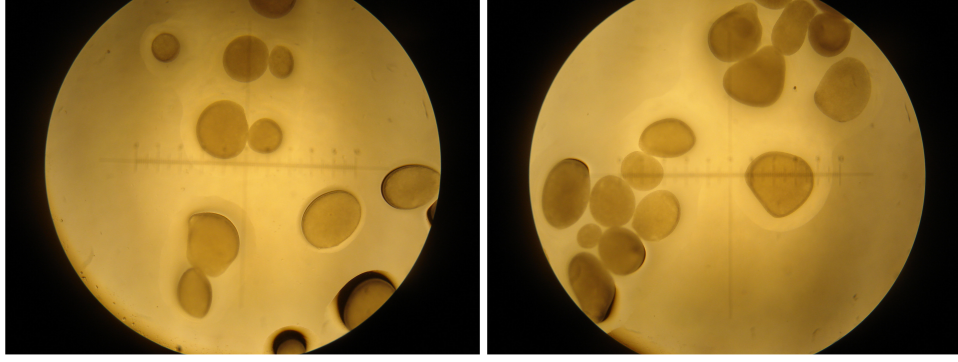
Yapılan denemeler sonucunda, keçiyoynuzu gamı A, keçiyoynuzu gamı B, ksantan gam 80, ksantan gam 200, karagenan, demineralize (%70) peynir altı suyu tozu, akasya gamı AC 100 ve akasya gamı AC 150 kaplama materyalleri kullanılarak mikrokapsül oluşumu sağlanamamıştır. Burada gerek mikroenkapsülasyon sisteminin parametreleri, gerekse kaplama materyalinin konsantrasyonu değiştirildiği halde

olumlu sonuç alınamamıştır. Buna göre ksantan gam 80 ve ksantan gam 200'de, %0,5'lik çözeltilerinde bile viskozitesi çok yüksek ve akışkan olmayan bir jel yapısı meydana gelmiş, bu karışıma mikroorganizmanın ilave edilerek homojen dağılımı mümkün olamamış; keçi boynuzu gamları nozzle sistemini tamamen tıkanmış; akasya gamlarının kullanımında ise homojen bir kaplama materyali/mikroorganizma kültürü elde edilmiş, cihazda düzgün bir akış sağlanmış ancak, 0,1 M CaCl_2 ve 1 M CaCl_2 çözeltilerinde katılaşma ve mikroküre oluşumu sağlanamamıştır.

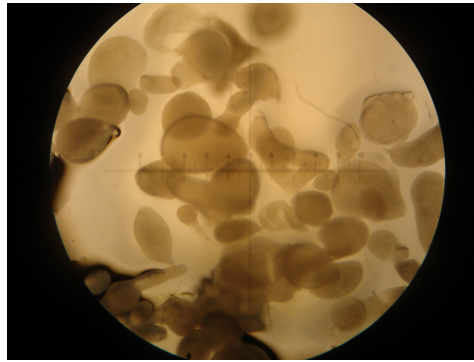
Buna göre kaplama materyali olarak; %1,5 aljinat (0,1 M CaCl_2 katılaştırma çözeltilisinde), %1,5 manukol (1 M CaCl_2 katılaştırma çözeltilisinde) ve %1,5 aljinat +%0,5 nişasta (0,1 M CaCl_2 katılaştırma çözeltilisinde) karışımlarından elde edilen emülsiyonların kullanılmasına karar verilmiştir. Kaplama işlemi sonrasında elde edilen *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kapsülleri, preparatları hazırlanarak mikroskopta x100 büyütme ile elde edilen görüntüleri kaydedilmiştir. Aljinat, manukol ve aljinat+nişasta mikrokürelerinin görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil.4.5 ve Şekil. 4.6'da görülmektedir.



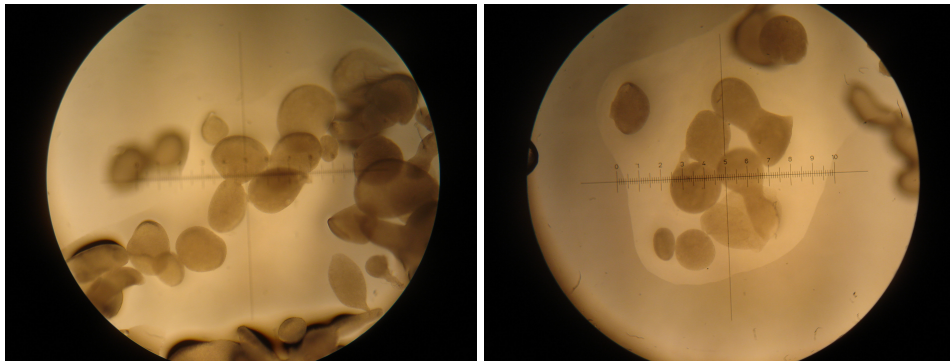
Şekil 4.1. *L. acidophilus* KPb4b aljinat kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüleri



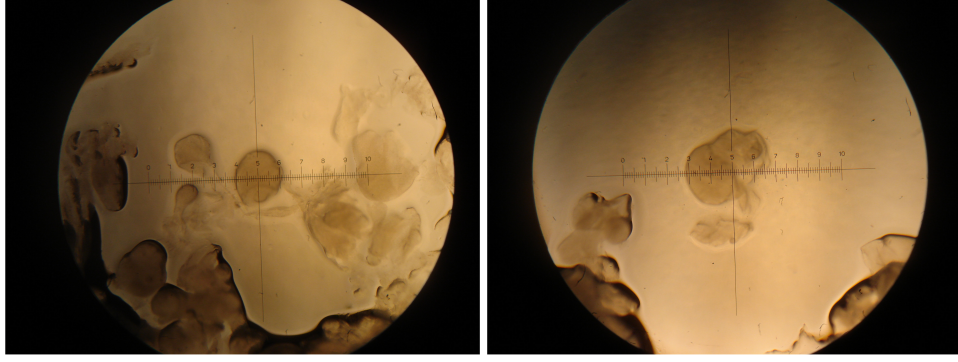
Şekil 4.2. *L. rhamnosus* KPb7 aljinat kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüleri



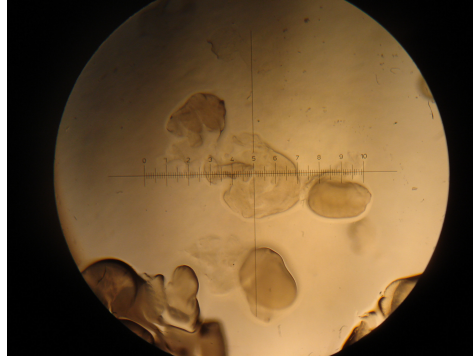
Şekil 4.3. *L. acidophilus* KPb4b aljinat+nişasta kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüsü



Şekil 4.4. *L. rhamnosus* KPb7 aljinat+nişasta kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüleri



Şekil 4.5. *L. acidophilus* KPb4b manukol kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüleri



Şekil 4.6. *L. rhamnosus* KPb7 manukol kapsüllerinin mikroskoptaki görüntüsü

Mikrokapsüllerin gerek kontrollü salınım gerekse olumsuz stres koşullarına maruz kaldıklarında canlılık kaybının en aza indirilmesi açısından morfolojik olarak yeknesak bir yapıda olmaları teorikte istenen bir özelliktir. Ancak mikrokapsüllerin şekilleri mikroenkapsülatör cihazının çalışma parametrelerinden, kaplamada kullanılan materyalin doğal yapısından ve kaplanan kültürün fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmektedir. Örneğin ekzopolisakkarit benzeri metabolitler üreten laktik asit bakterilerinin kaplanması sonucu, üretmeyenlere kıyasla daha amorf yapılı mikroküreler elde edildiği tespit edilmiştir. Yukarıda verilen mikrokapsüllerin görüntüleri incelendiğinde her iki bakteri kültüründe de aljinat ve aljinat+nişasta ile kaplanan mikroorganizma kapsüllerinin manukol ile kaplanarak hazırlanan kapsüllere göre daha düzgün yüzeylere sahip oldukları görülmektedir.

Mikroenkapsülasyon işleminde uygulanan tekniklerden en yaygın olanı püskürterek kurutma yöntemi olup 1950’li yılların sonlarından beri özellikle aromatik bileşiklerin ve uçucu yağların oksidasyona karşı korunması amacıyla kullanılmaktadır (Gharsallaoui 2007). Bunun yanı sıra, dondurarak kurutma, püskürtmeli soğutma, akışkan yatak kaplama, ekstrüzyon, koazervasyon, kokristalizasyon ve lipozom tutuklama gibi birçok mikroenkapsülasyon tekniği gıda maddelerinin kaplanmasında kullanılmaktadır (Poncelet 2009).

Mikroenkapsülasyon tekniğinin probiyotik kültürlerde uygulanması ile ilgili çalışmaların sayısı da oldukça fazladır. Uygulanan yöntemler açısından incelendiğinde daha çok püskürtmeli soğutma, dondurarak kurutma, liyofilizasyon ve immobilizasyon gibi teknikler ön plana çıkmaktadır. Probiyotiklerde emülsiyon-elektrostatik titreşim sistemi endüstride yaygın olarak kullanılan bir sistem değildir. Ancak son yıllarda çoklu nozzle sistemlerinin gelişmesi ile ölçek büyütmede yaşanan gelişmeler nedeniyle bu teknoloji üzerinde yapılan araştırmaların sayısı artmıştır (Champagne 2007; Poncelet 2009).

Crittenden ve ark. (2005) ise araştırmalarında *B. infantis*’i film formunda protein-karbonhidrat-yağ emülsiyonu ile kaplamışlar ve buzdolabı dışındaki depolama sıcaklıklarında ve gastrointestinal sistem geçişindeki direnci araştırmışlardır. Araştırma sonunda selüloz asetat fitalat ile elde edilen kapsüllerin ksantan gam ve jellan gam ile üretilen kapsüllerden daha küçük olduğu, gıdaya katıldığında gıdanın yapısı ve ağızda bıraktığı his açısından önemli bir avantaj sağlayacağı belirtilmiştir. Boyutları 15-20 µm olan kurutulmuş mikrokapsüllerin yapay mide ve bağırsak ortamında hızla parçalanarak mikroorganizmayı serbest hale geçirdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada ise ksantan gam 80 ve ksantan gam 200’ün %0.5’lik çözeltilerinde çok viskoz ve akışkan olmayan bir jel yapısı meydana gelmiş;

bu karışıma mikroorganizma ilave edilerek homojen dağılımı mümkün olamamıştır. Benzer şekilde keçiboynuzu gamlarıda nozzle sistemini tamamen tıkamıştır. Akasya gamları ile yapılan denemelerde ise homojen bir kaplama materyali/mikroorganizma emülsiyonu elde edilmiş, mikroenkapsülatörde düzgün bir akış sağlanmış ancak, 0.1 M CaCl₂ ve 1 M CaCl₂ çözeltilerinde topaklaşma meydana geldiğinden sertleşme ve mikroküre oluşumu sağlanamamıştır.

4.4. Mikrokapsüllerin Boyutlarının Belirlenmesi

L. acidophilus KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kültürlerinin %1,5 aljinat, %1,5 manukol ve %1,5 aljinat+%0,5 nişasta ile kaplanmasında elde edilen kapsüllerin aydınlık saha mikroskobunda yapılan boyut ölçüm sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 mikrokapsüllerinin boyutları (µm)

Ölçüm Yapılan Kapsül	<i>L. acidophilus</i> KPb4b			<i>L. rhamnosus</i> KPb7		
	Aljinat	Manukol	Aljinat+ Nişasta	Aljinat	Manukol	Aljinat+ Nişasta
1. Kapsül	290	420	300	270	400	400
2. Kapsül	300	300	420	330	350	350
3. Kapsül	310	250	260	320	240	250
4. Kapsül	250	470	500	260	480	550
5. Kapsül	410	300	390	400	400	400
6. Kapsül	490	450	510	500	500	520
7. Kapsül	380	350	400	370	370	300
8. Kapsül	400	400	380	450	450	450
9. Kapsül	520	480	440	550	470	430
10. Kapsül	420	280	350	400	240	390
Ort±Std Sapma	377±88,70	370±84,72	395±79,19	385±95,13	390±92,74	404±91,43

Her bir mikroorganizma için seçilen 10 kapsülde, her bir kapsül için ise 2 değişik eksende ölçüm yapılarak sonuçların ortalama ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

Klokk ve Melvik (2002) yaptıkları çalışmada elektrostatik titreşim ile mikrokürecik üreten prototip bir jeneratör kullanarak ürettikleri aljinat mikrokürecikleri üzerine nozzle çapı, akış hızı ve emülsiyon viskozitesinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 180 μm iç çaplı nozzle kullanıldığında yaklaşık 300 μm çapında mikrokürecikler üretmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar ayrıca %1,5 aljinat konsantrasyonunda, 10 mL/saat akış hızı ile ürettikleri kapsüllerin çaplarının elektrik potansiyel arttıkça azaldığını ve 2,5 kV/cm'de en küçük çaplı kapsül boyutuna ulaşıldığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda 150 μm çapındaki nozzle kullanılarak aljinat ile yapılan kaplama işleminde ürettiğimiz mikroküreciklerin çapları da benzer olarak 240 μm – 550 μm arasında değişmektedir. Araştırmamızda ayrıca 2,21 kHz titreşim uygulandığında en küçük mikroküre çapına ulaşılmıştır. Sisteme uygulanan emülsiyon akış hızı (390 mL/saat) dikkate alındığında aynı zamanda daha yüksek hacimde kaplama işlemi gerçekleştirildiği açıkça görülmektedir.

4.5. Mikroenkapsülasyon ve Mikrokapsülden Hücre Salınımı

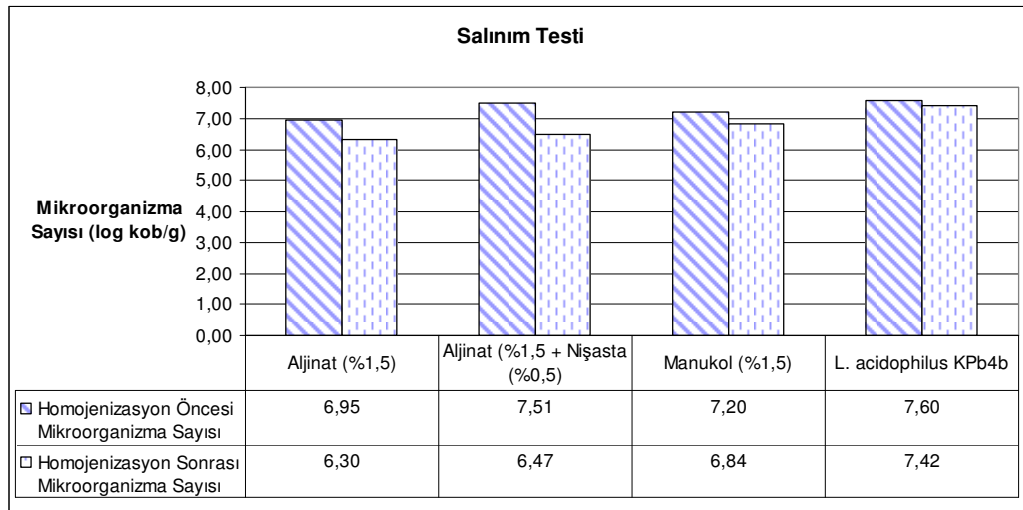
Bu çalışmada mikroenkapsülasyonda kullanılan *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kültürleri 2 defa aktifleştirildikten sonra kaplama işlemi uygulanmıştır. Buzdolabında 1 gece sertleştirme çözeltisinde bekletilmişlerdir. Kaplama işlemi her kaplama konsantrasyonunda aynı kaplama materyali miktarı ve cihaz çalışma parametreleri (5 mL mikroorganizma kültürü + 45 mL kaplama Na-aljinat çözeltisi emülsiyonu) kullanılmasına rağmen elde edilen yaş kapsül miktarları farklı bulunmuştur. Buradaki farkların temel nedeni kaplama esnasında kullanılan 150 μm 'lik nozzle'da meydana gelen tıkanmalar sonucu oluşan topaklanmış veya

birbirine yapışmış kapsüllerin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Çalışma esnasında cihazın tıkanması ve/veya başlangıçta oluşan daha büyük kapsüllerin ortamdan uzaklaştırılmasından sonra elde edilen yaklaşık aynı boyutlardaki kapsüller denemelerde kullanılmıştır. Her iki mikroorganizma kültüründe de %2 kaplama materyali konsantrasyonunda tıkanmaların çok sık yaşanması nedeniyle elde edilen yaş kapsül; dolayısıyla da kuru kapsül miktarı oldukça az bulunmuştur. Kaplamada kullanılan başlangıç mikroorganizma sayıları her 3 kaplama maddesi konsantrasyonunda aynı olmasına rağmen kaplanamadan kalan veya kapsüllerin katılaşması henüz tamamlanamadan, kapsülden ayrılıp CaCl_2 çözeltisine geçen mikroorganizma sayıları birbirinden farklı bulunmuştur. Buna göre gerek yaş kapsül ağırlıkları, gerekse kaplanmadan kalan mikroorganizma sayısı açısından ele alındığından en uygun kaplama konsantrasyonunun %1,5 aljinat olduğu tespit edilmiş ve daha sonraki denemelerde bu konsantrasyon ile çalışılmıştır.

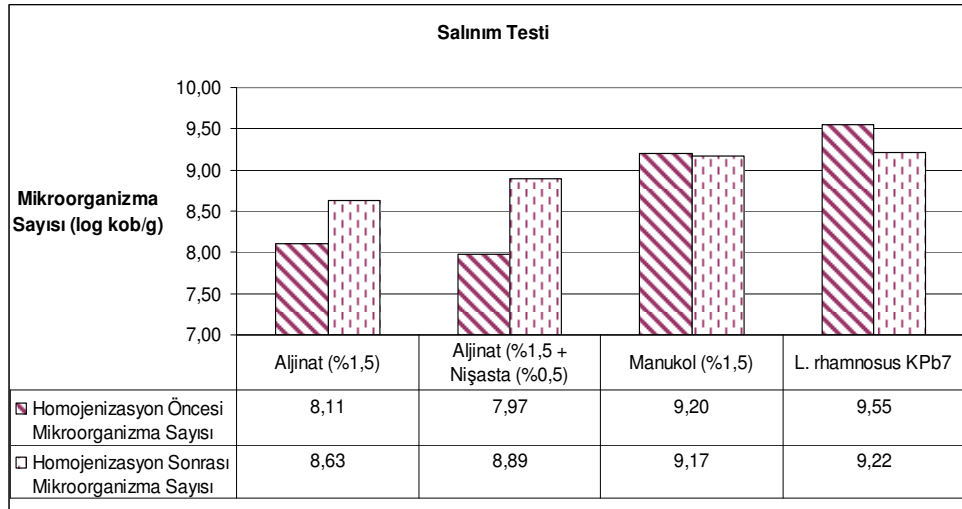
Kaplama işleminde kullanılacak Na-aljinat miktarı %1,5 olarak tespit edildikten sonra aynı miktar gıda saflığında Na-aljinat olarak da bilinen manukol için de aynı oranda kullanılmıştır. Bu iki kaplama materyaline ilave olarak literatür verileri de dikkate alındığında 3. bir kaplama materyali olarak %1,5 aljinat + %0,5 nişasta da denemeye dahil edilmiştir. Nişasta ve aljinat karışımının bu konsantrasyonu yapılan ön denemelerle en uygun konsantrasyon olarak tespit edilmiştir.

L. acidophilus KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 mikrokapsüllerinin mikroorganizma salınım özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen homojenizasyon deneylerinin sonuçları sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. Şekiller incelendiğinde *L. acidophilus* KPb4b suşunda salınım testi sonunda en fazla canlılık kaybı aljinat+nişasta kapsüllerinde (1,04 log kob/g) gerçekleştiği ardından

aljinat kapsüllerinin (0,65 log kob/g) ve manukol (0,36 log kob/g) geldiği görülmektedir. Şekil 4.7’de ayrıca, aynı işleme tabi tutulmuş kaplanmamış *L. acidophilus* KPb4b suşunda ise 0,18 log kob/mL’lik bir canlılık kaybı meydana geldiği tespit edilmiştir. *L. rhamnosus* KPb7 suşunda ise salınımın en yüksek aljinat+nişasta kapsüllerinde (0,92 log kob/g) gerçekleştiği, ardından aljinat kapsüllerinin (0,52 log kob/g) geldiği görülmektedir. Salınım denemelerinde her iki probiyotik kültürün serbest hücrelerinden 30 dk. homojenizasyon uygulamasının mikroorganizma sayısını çok fazla belirlenmiştir.



Şekil 4.7. *L. acidophilus* KPb4b suşunun salınım testi sonuçları

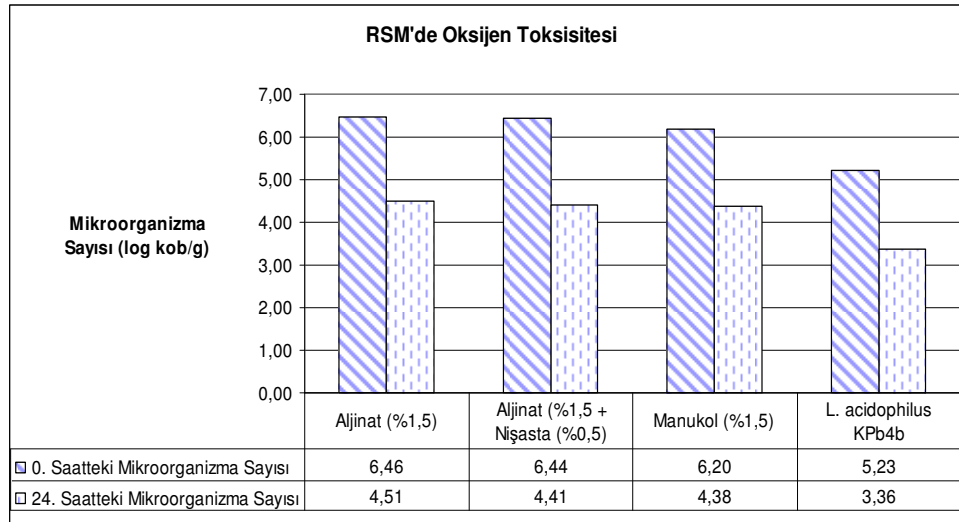


Şekil 4.8. *L. rhamnosus* KPb7 suşunun salınım testi sonuçları

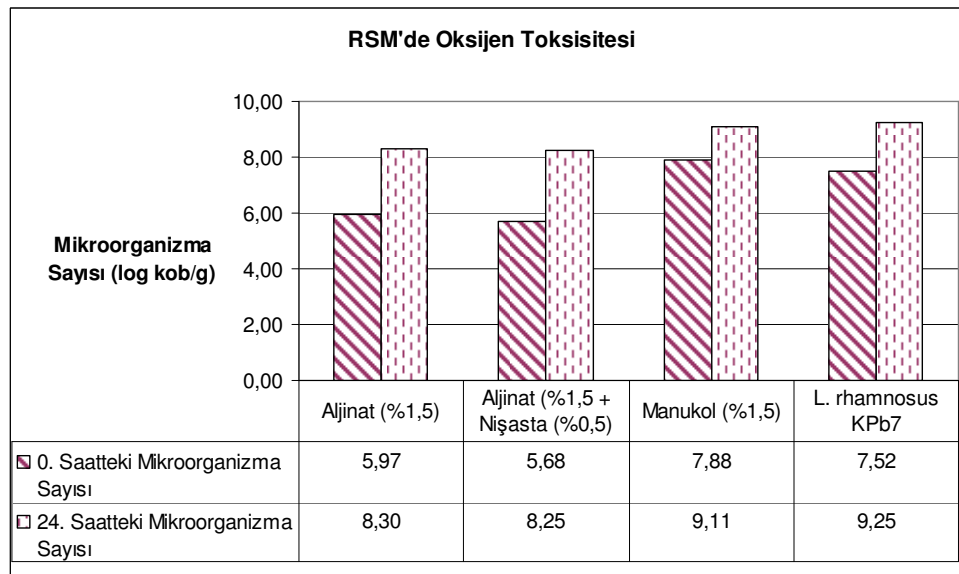
4.6. Oksijen Toksisitesi Test Sonuçları

4.6.1. RSM besiyerinde oksijen toksisitesi sonuçları

Bilindiği gibi laktik asit bakterileri mikroaerofilik veya anaerobik metabolizmaya sahiptir. Özellikle anaerobik, kısmen de mikroaerofilik mikroorganizmaların oksijene direnci oldukça zayıftır. Hatta bifidobakterler gibi anaerobik mikroorganizmalar üzerinde oksijenin toksik etkisi vardır. Bu denemelerde kullandığımız *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 mikroküreciklerinin, kaplama işlemi ile oksijen toksisitesine olan direncindeki değişimin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için, içerisinde 90 mL RSM Broth (%9,5 yağsız süt tozu, %2 glukoz, %0,5 maya ekstraktı içeren) besiyeri bulunan 250 mL'lik erlene test edilecek kapsüllerden 10'ar g; kaplanmamış mikroorganizma kültüründen ise 10 mL ilave edilmiştir. Erlenler pamuk ile kapatılarak aerobik koşullarda 100 rpm'de, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve 0. ile 24. saatteki mikroorganizma sayıları belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.9. *L. acidophilus* KPb4b kapsüllerinin RSM ortamında oksijen toksisitesi



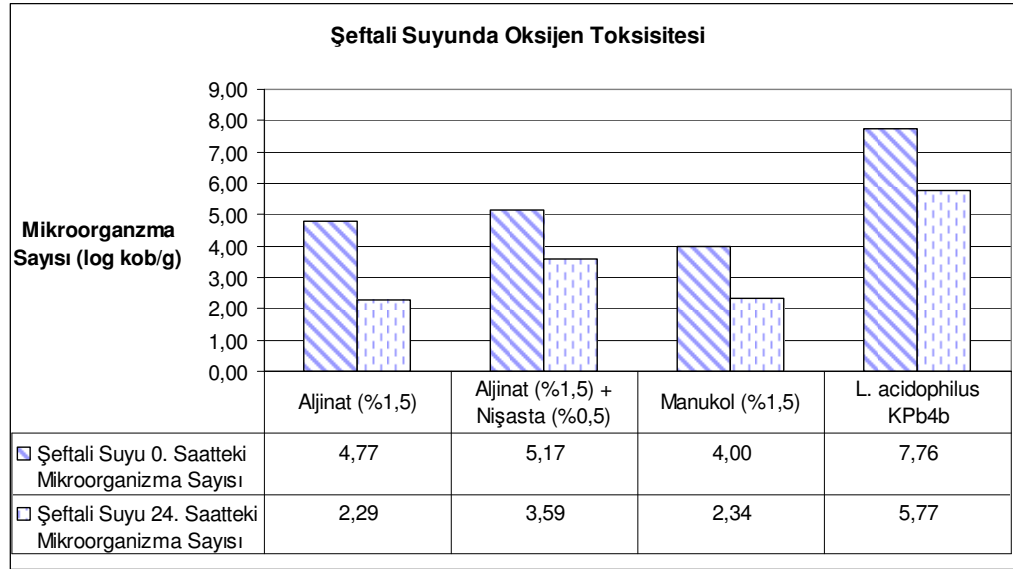
Şekil 4.10. *L. rhamnosus* KPb7 kapsüllerinin RSM ortamında oksijen toksisitesi

L. acidophilus KPb4b kapsüllerinin RSM ortamında gerçekleştirilen oksijen toksisitesi denemelerinde aljinat, aljinat + nişasta, manukol ile kaplanan kültürlerin başlangıç sayılarına göre sırasıyla 1,95 log kob/g, 2,03 log kob/g, 1.82 log kob/g canlılık kaybı olduğu belirlenmiştir. Buna göre mikroaerofilik özellik gösteren bu mikroorganizmanın manukol ile kaplanmasının oksijene direnç açısından daha uygun

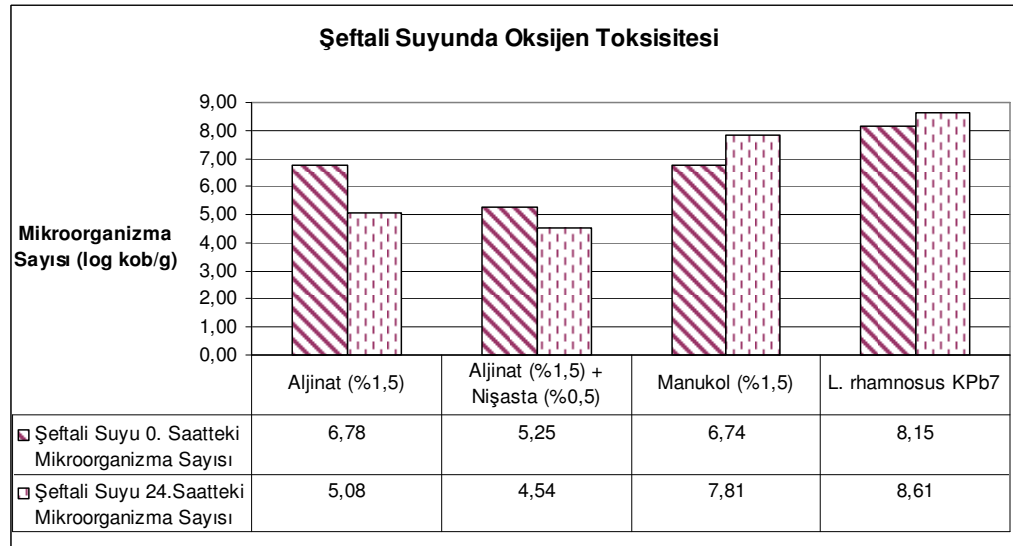
olduğu belirlenmiştir. *L. rhamnosus* KPb7 kapsüllerinin RSM ortamında gerçekleştirilen oksijen toksisitesi denemelerinde ise gerek kaplanmamış kültürde gerekse her 3 kaplama materyali ile hazırlanan mikroküreciklerde oksijen toksisitesi görülmediği tam tersi olarak başlangıç sayısına göre mikroorganizma sayısında 1,23-2,59 log kob/g arasında artış olduğu tespit edilmiştir. Mikroorganizmaların oksijen toksisitesine karşı gösterdikleri bu farklılığın metabolik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.6.2. Gıda ortamında oksijen toksisitesi sonuçları

L. acidophilus KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kapsüllerinin gıda ortamındaki oksijen toksisitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu denemede ise amaç kapsüllerin gıda ortamındaki davranışlarının belirlenmesidir. Denemede RSM yerine şeftali nektarı kullanılmış ve inkübasyon +5°C’de soğutmalı inkübatör de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.11. *L. acidophilus* KPb4b kapsüllerinin şeftali nektarı ortamında oksijen toksisitesi



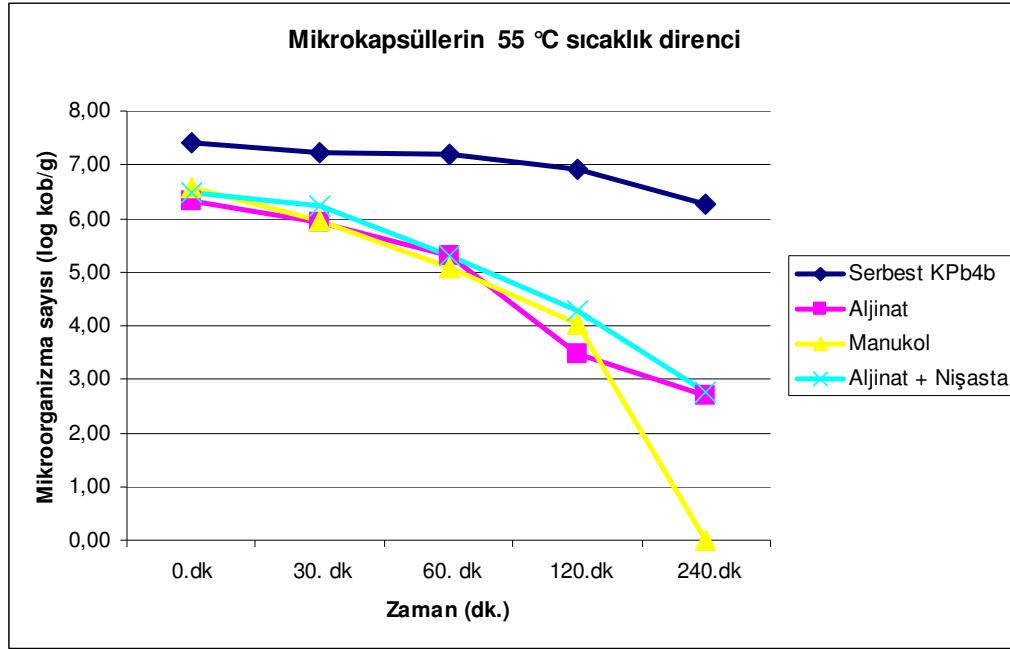
Şekil 4.12. *L. rhamnosus* KPb7 kapsüllerinin şeftali nektarı ortamında oksijen toksisitesi

L. acidophilus KPb4b kapsüllerinin şeftali nektarı ortamındaki oksijen toksisitesi denemesinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde aljinat, aljinat + nişasta, manukol ile kaplanan kültürlerin başlangıç sayılarına göre sırasıyla 2,48 log kob/g, 1,58 log kob/g, 1,66 log kob/g canlılık kaybı olduğu belirlenmiştir.

L. rhamnosus KPb7 kültürünün aljinat ve aljinat+nişasta ile kaplanmasından elde edilen sayım sonuçlarının ise kaplanmamış kültürle karşılaştırıldığında başlangıç sayısına göre 0,71-1,7 log kob/g'lık bir azalma olduğu ancak manukolle kaplanmış mikroküreciklerde oksijen toksisitesi görülmediği tam tersi olarak başlangıç sayısına göre mikroorganizma sayısında 1,07 log kob/g artış olduğu tespit edilmiştir. Bu denemenin sonucuna göre manukol kapsüllerinin şeftali nektarı ortamında mikroorganizmayı oksijen toksisitesine karşı daha iyi koruduğu belirlenmiştir.

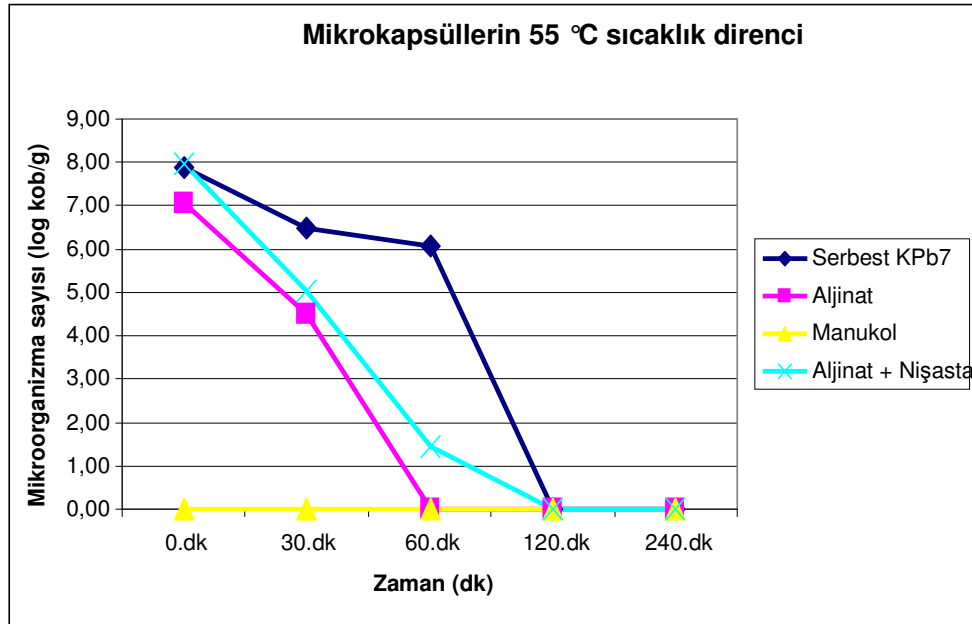
4.7. Mikrokapsüllerin Sıcaklık Direncinin Belirlenmesi

Probiyotik ürün geliştirmede mikroorganizmanın sıcaklık direnci en önemli parametrelerden birisidir. Bu deneme sıcaklığın mikrokürecikler üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Buna göre 3 farklı materyal ile kaplanmış *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kültürlerinin sıcaklık denemelerinden alınan sonuçlar Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.13. *L. acidophilus* KPb4b kapsüllerinin 55°C sıcaklık direncinin belirlenmesi

Şekil incelendiğinde sıcaklık direnci açısından kaplama işlemi uygulanmış kültürlerin başlangıç sayıları dikkate alındığında ilk 120 dakika içerisinde benzer bir azalma gösterdikleri görülmektedir. Ancak 2. saatin sonunda manukol ile kaplanan kültürler canlılığını tamamen kaybederken, aljinat, aljinat+nişasta ile kaplanan kültürün ve kaplanmamış kültürün sırasıyla 3,63 log kob/g, 3,72 log kob/g ve 1,16 log kob/g'lık bir azalma gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlara göre hazırlanan *L. acidophilus* KPb4b mikroküreciklerinden sıcaklık direnci en yüksek olanın aljinat+nişasta olduğu bunu sırasıyla aljinat ve manukol'ün takip ettiği belirlenmiştir. Şekilde görüldüğü gibi kaplama işlemi uygulanmamış kültürün sıcaklık direnci açısından irdelendiğinde kaplamaya ihtiyacı olmadığı açıkça görülmektedir. Ancak gıdaların üretim prosesindeki tek stres koşulunun sıcaklık olmadığı dikkate alındığında, kaplama işleminde yapılan bu denemenin gerekliliği daha kolay anlaşılabacaktır.



Şekil 4.14. *L. rhamnosus* KPb7 kapsüllerinin 55°C sıcaklık direncinin belirlenmesi

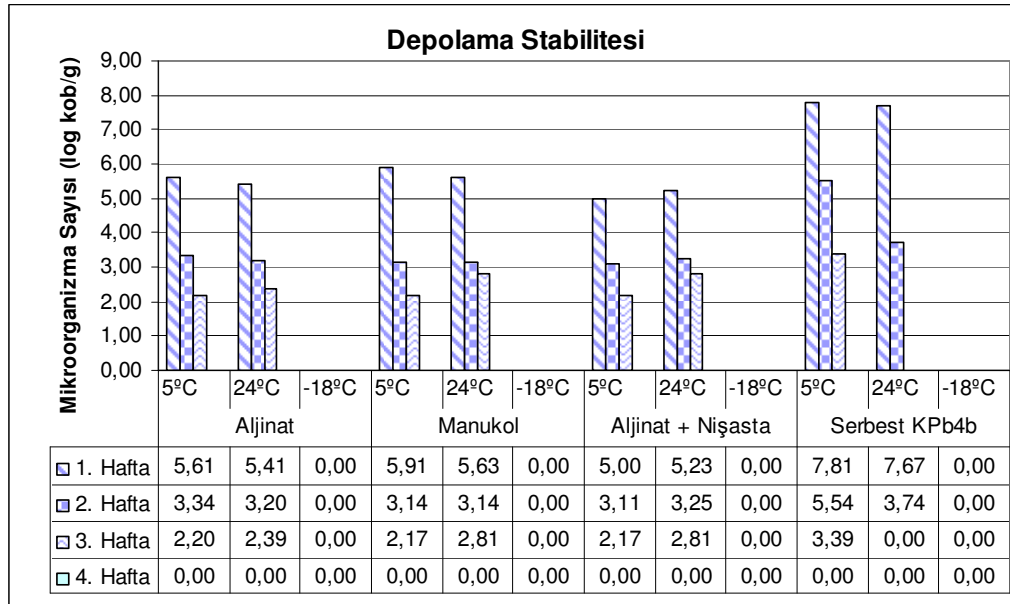
L. rhamnosus KPb7 kapsüllerinin sıcaklık direnç özellikleri incelendiğinde ilk 30 dakika içerisinde serbest KPb7 kültürü 1,4 log kob/g'lık bir azalma olurken, aljinatla kaplanmış küreciklerde 2,55 log kob/g ve aljinat+nişasta ile kaplanmış küreciklerde ise 2,93 log kob/g'lık bir azalma görülmüştür. Sıcaklık uygulamasının 60. dakikasında kaplama işlemi uygulanmış kültürlerdeki canlı mikroorganizma sayısı aljinatta sıfıra düşerken aljinat+nişasta kapsüllerinde 1,43 log kob/g düzeyine inmiştir. Birinci saat sonunda kaplanmamış kültürdeki canlı mikroorganizma sayısı ise sadece 2 log kob/g azalmıştır. Ancak 2. saatin sonuna gelindiğinde gerek kaplanmış gerekse kaplanmamış kültürlerde canlı mikroorganizma kalmamıştır.

L. acidophilus KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kültürleri sıcaklık direnci açısından mukayese edildiğinde her iki kültürün de kaplama işlemi ile sıcaklığa direnç kazanmadığı görülmektedir. Kaplanmış kültürler açısından bakıldığında ise *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kültüründe sıcaklık direnci açısından aljinat+nişastanın daha uygun bir kaplama materyali olduğu görülmüştür.

Serbest ve mikroenkapsüle edilmiş probiyotik bakterilerin asit, safra ve sıcaklık toleransının incelendiği bir çalışmada 8 probiyotik bakteri kültürü ile çalışılmış ve bu bakterilerin asit, safra ve sıcaklık toleransları araştırılmıştır (Ding ve Shah 2007). Bu bakteriler *L. rhamnosus*, *B. longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis* type BI-O4, ve *B. lactis* type Bi-07'dir. Bu çalışma deneme deseni açısından bizim çalışmamıza benzerlik göstermektedir. Bakterilerin asit, safra tuzları ve sıcaklığa dirençlerini arttırmak amacıyla mikroenkapsülasyon işlemi, aljinat matriksiyle gerçekleştirilmiştir. Serbest probiyotik bakteriler ise kontrol amacıyla kullanılmıştır. Probiyotik bakterilerin aside karşı toleransı MRS broth içerisine HCl katılarak 2 saatlik bir inkübasyon periyodu boyunca test edilmiştir. Safra tuzu toleransı, 2 tip safra tuzu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık toleransı probiyotik bakteriler 65°C sıcaklıkta 1 saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonunda içerisine HCl katılmış MRS Broth içerisinde mikroenkapsüle edilmiş probiyotik bakterilerin canlı kalma süreleri serbest probiyotik bakterilere göre daha uzun olmuştur. Serbest hücreler safra tuzlarına maruz bırakıldığında canlılık 6,51 log kob/mL azalmıştır. Aynı çalışmada mikroenkapsüle edilmiş kültürlerde 30 dakikalık sıcaklık uygulaması sonunda canlılık kaybı 4,17 log kob/mL olurken, serbest probiyotik bakterilerde bu oran 6,74 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Ancak 1 saatlik sıcaklık uygulamasında hem serbest hem de kaplanmış kültürlerde canlı kalma sayılarında benzer sonuçlar alınmıştır. Bizim çalışmamızda da sıcaklık denemelerinde *L. rhamnosus* KPb7 aljinat+nişasta kapsüllerinde 120.dakikanın aljinat ve manukol kapsüllerinde ise 60. dakikanın sonunda canlı bakteri kalmamasına rağmen *L. acidophilus* KPb4b aljinat + nişasta ve aljinat kapsüllerinde 240. dakikanın sonunda yaklaşık 3 log kob/g'lık bir azalma görülmüştür.

4.8. Mikrokapsüllerin Depolama Stabilitésinin Belirlenmesi

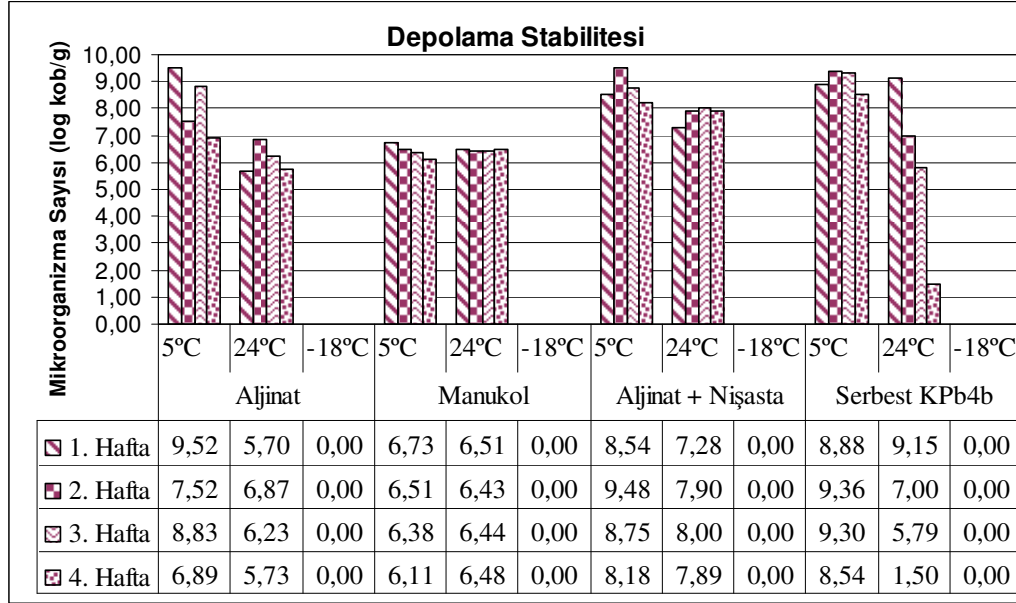
Depolama stabilitésinin belirlenmesinde *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kültürleri aljinat, manukol ve aljinat+nişasta karışımı ile kaplanmış ve elde edilen mikroküreler +24°C, +5°C ve -18°C’de depolanmıştır. Depolamanın başlangıcında ve haftada bir yapılan sayımlarla, kaplama işleminin mikroorganizmanın canlılığı üzerine etkisi belirlenmiştir. Deneme sonuçları kültürler için sırasıyla Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.15. Depolama süresince *L. acidophilus* KPb4b kültürünün canlılık durumu

Bir aylık depolama sonucu elde edilen veriler incelendiğinde *L. acidophilus* KPb4b kapsüllerinin stabilitésini en iyi 5°C’de ve 24°C’de koruduğu görülmüştür. Bu suşunda tüm kapsüllerde ve serbest hücrelerde -18°C’de yapılan depolama işleminde canlı mikroorganizma sayısını 1 hafta içerisinde sıfıra düşürdüğü görülmektedir.

24°C’de serbest hücredeki canlı mikroorganizma sayısı 2. haftanın sonunda sıfıra düşerken, mikrokapsüllerin canlılığını 3. haftada da koruduğu tesbit edilmiştir.



Şekil 4.16. Depolama süresince *L. rhamnosus* KPb7 kültürünün canlılık durumu

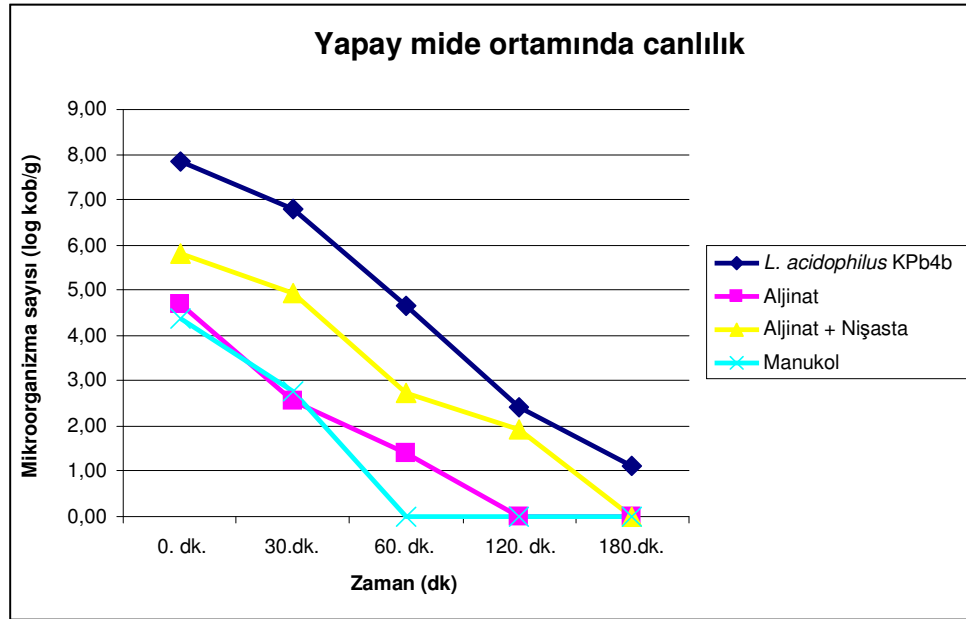
Şekilde verilen grafik incelendiğinde başlangıçta kapsüllerde bulunan 9-10 log kob/g’lık mikroorganizma düzeylerinin en yüksek buzdolabı sıcaklığında korunmuş olmasıdır. Tüm kapsüllerde ve serbest hücrelerde -18°C’de yapılan depolama işleminde canlı mikroorganizma sayısını 1 hafta içerisinde sıfıra düşürdüğü görülmektedir.

Chen ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada prebiyotikler, büyüme destekleyiciler ve sodyum aljinat kullanarak kapladıkları 4 farklı probiyotik kültürün yapay mide sıvısı ortamındaki canlılıklarını değerlendirmişlerdir. Araştırma sonucunda %1 sodyum aljinat, %1 peptid ve %3 fruktooligosakkarit karışımı ile yapılan kaplama işleminin probiyotiklerin canlılıklarını koruduğunu, +4°C’de yapılan depolama işleminde serbest hücrelerde ise 2 log kob/mL azalma meydana

geldiğini ancak prebiyotik katılarak yapılan kaplama işleminde bir azalma görülmediğini belirlemişlerdir. Bizim yaptığımız depolama stabilitesi çalışmalarında da +5°C’de yüksek stabilite gerçekleşmiş, ancak aljinat ile kaplanmış *L. rhamnosus* KPb7 kültürü 2,63 log kob/g düşmesine rağmen yine de canlı bakteri sayısı 6.89 log kob/mL düzeyinde kalmıştır. *L. acidophilus* KPb4b kültüründe ise 4. hafta sonunda hiç canlı bakteri kalmamıştır. Buna karşın kaplanmış kültürün canlılığını 3. haftanın sonuna kadar koruduğu gözlemlenirken kaplanmamış kültürdeki canlı bakteri sayısının 3. hafta sonunda sıfıra düştüğü belirlenmiştir.

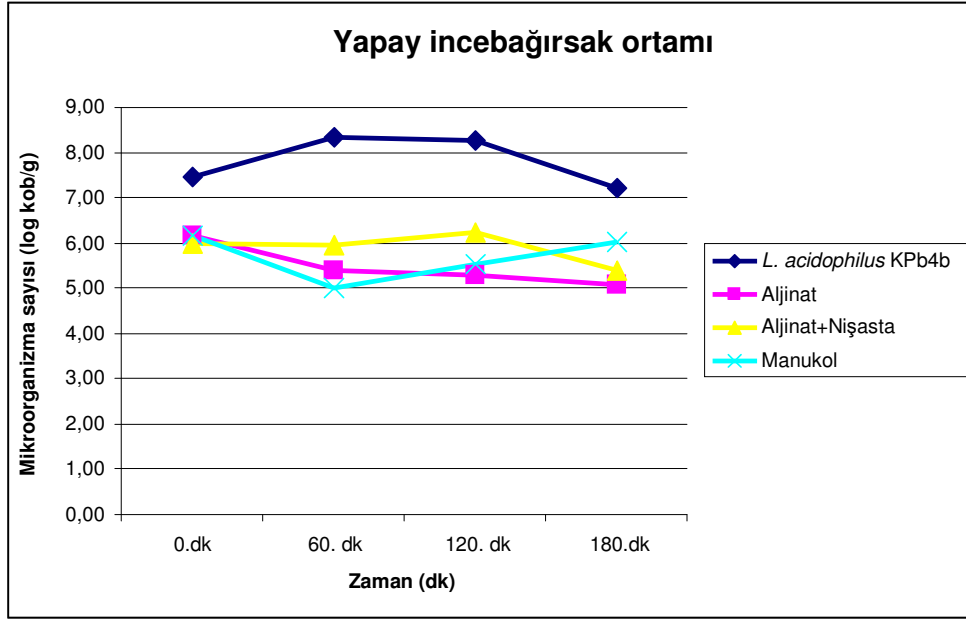
4.9. Mikrokapsüllerin Yapay Mide ve Bağırsak Ortamındaki Stabilitesi

L. acidophilus KPb4b kültürünün *in vitro* yapay mide ortamındaki canlılıkları Şekil 4.17 ve yapay ince bağırsak ortamındaki canlılıkları ise Şekil 4.18’de verilmiştir. Şekil 4.17 incelendiğinde kaplanmamış kültürün yapay mide ortamında canlılığının daha uzun süre koruduğu, burada da düşük pH ortamına direnç bakımından en iyi kaplama materyalinin aljinat+nişasta karışımı ile elde edilen materyal olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.17. *L. acidophilus* KPb4b kültür ve kapsüllerinin yapay mide ortamında canlılığı

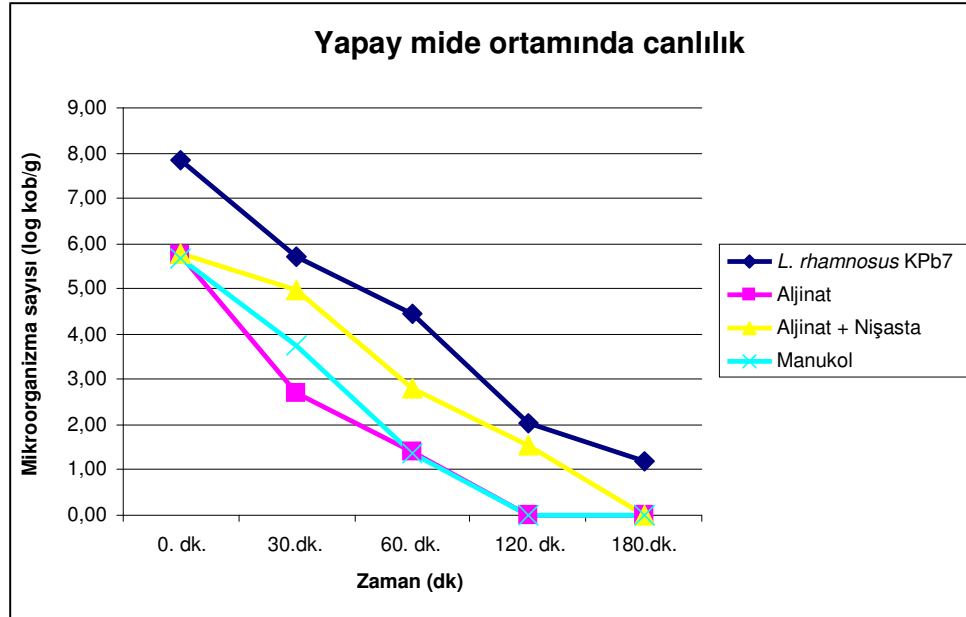
L. acidophilus KPb4b kültüründe yapay ince bağırsak ortamında kapsüllerin, mikroorganizma canlılığını korumadaki etkilerinin birbirine benzer olduğu; 3. saatin sonunda mikroorganizma sayılarındaki değişikliğin başlangıç sayılarına göre $\pm 1,0$ log kob/g düzeyinde kaldığı tespit edilmiştir. Burada dikkati çeken nokta diğer materyallerle kaplanmış ve serbest kültürdeki mikroorganizma sayısı azalma eğilimi gösterirken, manukol kapsüllerindeki mikroorganizma sayısı önce 60. dakikaya kadar düşme eğilimi gösterirken 180. dakika sonunda 0,14 log kob/g aşağıda kalmayı başarmıştır. Buna göre yapay ince bağırsak ortamında probiyotik mikroorganizmaların manukol ile kaplanmasının mikroorganizma canlılığına olumlu etki sağlayacağı görülmektedir.



Şekil 4.18. *L. acidophilus* KPb4b kültür ve kapsüllerinin yapay incebağırsak ortamında canlılığı

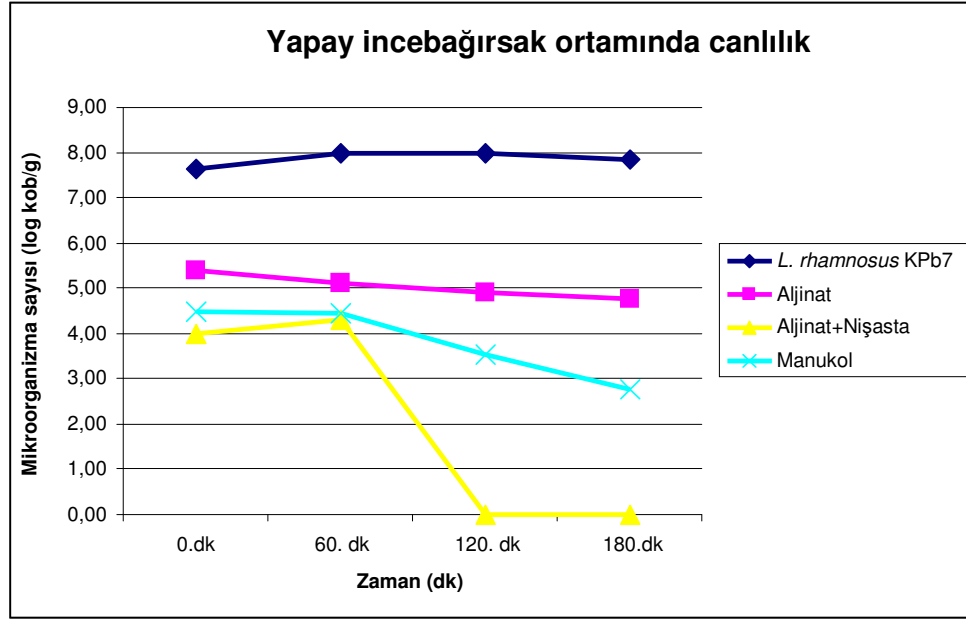
L. rhamnosus KPb7 kültürünün *in vitro* yapay mide ortamındaki canlılıkları Şekil 4.19 ve yapay ince bağırsak ortamındaki canlılıkları ise Şekil 4.20’de verilmiştir. Şekil 4.19’da verilen mikroorganizma sayıları incelendiğinde düşük pH’lı mide ortamında kaplanmamış mikroorganizma sayısının kaplanmış olanlara göre daha uzun sürede canlılığını yitirdiği görülmektedir. Yapay mide ortamında farklı kaplama materyallerinin canlılık üzerine etkisinin benzer olduğu, ancak 1. saatin sonunda kaplanmış mikroorganizmaların canlılıklarını önemli ölçüde kaybettikleri tespit edilmiştir. Düşük pH ortamına direnç bakımından en iyi kaplama materyalinin aljinat+nişasta karışımı ile elde edilen materyal olduğu belirlenmiştir. *L. rhamnosus* KPb7 kültürünün aljinata+nişasta ile kaplanması sonucu midenin düşük pH’sından geçmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Burada *L. rhamnosus* KPb7 serbest kültürlerinin de bu ortamda canlı kaldıkları dikkate alındığında bu görüş yanlış gibi görünse de, düşük asitlik direncine sahip ancak probiyotik nitelikleri üstün olan

kültürlerin kaplanması aljinat+nişasta karışımının kullanılabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.19. *L. rhamnosus* KPb7 kültür ve kapsüllerinin yapay mide ortamında canlılığı

L. rhamnosus KPb7 kültürü ve kapsüllerinin ince bağırsak ortamındaki durumunun incelendiği bu denemede kaplanmamış kültürde bulunan mikroorganizma sayısı ile kaplama işlemi uygulanmış mikroküreciklerden aljinat küreciklerinde canlı mikroorganizma sayısı oldukça stabil kalmış, aljinat+nişasta kapsüllerindeki mikroorganizma sayısı 1. saate kadar stabil kalmış ancak bu andan itibaren 2. saatin sonuna gelinceye kadar canlı bakteri sayısı sıfıra düşmüştür. Manukol kapsüllerinde ise 1,75 log kob/g'lık bir düşüş tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. *L. rhamnosus* KPb7 kültür ve kapsüllerinin yapay ince bağırsak ortamında canlılığı

Sultana ve ark. (2000) koazervasyon tekniğini kullanarak, aljinat nişasta karışımını ile kaplanan probiyotik kültürlerinin gastrointestinal sistemdeki canlılığını inceledikleri çalışmalarında kaplama materyali bileşiminde dirençli mısır nişastası kullanmışlardır. Araştırmacılar ürettikleri 500 µm'den küçük kapsüllerde bulunan *L. acidophilus* 2409 kültürünün 3 saat sonunda pH 2 deki 5,0 log kob/mL azaldığını, aynı bakterinin %1 safra tuzu konsantrasyonunda ise sadece 1,0 log kob/mL azaldığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızda kullandığımız her iki probiyotik kültürden aldığımız sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Yine bu çalışmada serbest ve enkapsüle edilmiş probiyotik kültürlerin yoğurttaki depolama süresince canlılığı incelenmiş, araştırma sonunda hem serbest hem de kaplanmış kültürlerin canlılığında aynı oranda azalma kaydedilmiştir.

Iyer ve Kailasapathya (2005) araştırmalarında prebiyotik varlığında kitosan, poli-L-lisin ve %1,8 aljinat gibi farklı kaplama maddeleri ile kapladıkları *L. acidophilus* CSCC 2400 ve CSCC 2409 suşlarının *in vitro* asidik ortamda ve safra

tuzları varlığında canlılıklarını incelemişlerdir. Araştırma sonucunda prebiyotik varlığında kaplama işleminin, probiyotiklerin canlılıklarını korumada olumlu etki gösterdiği belirtilmiş, ancak buna rağmen asidik ortamda 3 saat içerisinde canlı mikroorganizma sayısında yaklaşık 5,0 log kob/g düzeyinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bizim her iki kültür için bulduğumuz sonuçlarla paralellik göstermektedir.

B. longum B6 ve *B. infantis* CCRC 14633 bakterilerinin püskürterek kurutma yöntemi ile kaplandığı bir çalışmada (Lian ve ark., 2003) kaplama materyali olarak %10 (w/w) jelatin, çözünebilir nişasta, yağsız süt tozu ve Arap zamkı kullanılmıştır. Mikroenkapsüle ve serbest hücrelerin canlılıkları yapay mide suyunda (pH 2.0 ve 3.0) ve safra solüsyonunda incelenmiştir (%0.5 ve 2). *B. infantis* CCRC 14633 suşunun simule gastrik koşullarda ve safra solüsyonunda *B. longum* B6 suşuna göre daha hassas olduğu görülmüştür. Mikroenkapsüle edilmiş bifidobakter'lerin canlılığı gastrik koşullarda ve safra solüsyonunda serbest hücrelere göre daha az azalma göstermiştir. Bu olay mide suyu (pH 2) ve safra solüsyonu %2'de daha belirgin bir şekilde görülmüştür (Lian ve ark. 2002).

Yapılan diğer bir çalışmada *L. acidophilus* LA1 suşunun sodyum aljinat ve nişasta ile mikroenkapsülasyonunun proses koşullarına ve yapay mide ve bağırsak koşullarına etkisi araştırılmıştır. Mikroenkapsüle probiyotik bakterinin canlılığı yüksek sıcaklıkta (72, 85 ve 90°C) ve yüksek tuz konsantrasyonunda (%1, %1,5 ve %2) araştırılmıştır. Buna göre serbest hücreler 90°C sıcaklıkta tamamen yok olmasına rağmen mikroenkapsüle hücreler 4,14 log kob/mL birimlik azalma göstermiştir. Kaplanmış hücreler yapay mide ortamında (pH 1.0, 1.5 ve 2.0) ve yüksek tuz konsantrasyonunda (%1.0, %1.5, ve %2.0) bakteri canlılığını daha iyi korumuştur. Serbest hücrelerde %2'lik safra tuzunda 3 saatlik inkübasyon sonunda

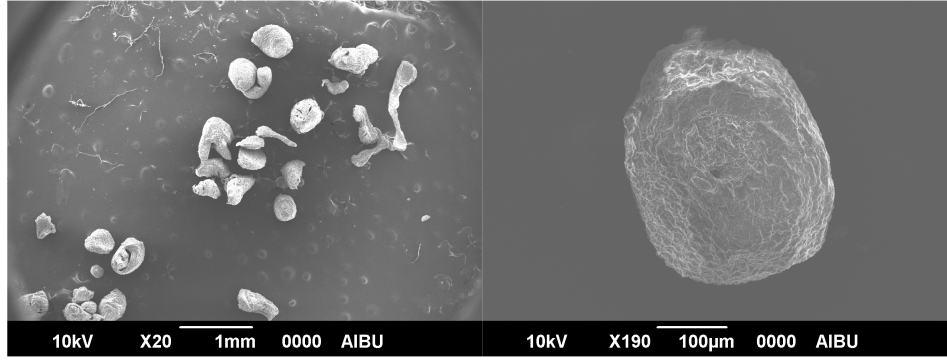
5,47 log birimlik azalma görülürken kaplanmış hücrelerde 2,16 log birimlik bir azalma görülmüştür. Yapay bağırsak pH'sında mikroenkapsüle hücrelerin serbest hale geçmeleri 2,5 saat sürmüştür. Yapılan bu çalışmalar sonunda *L. acidophilus* LA1 suşunun sodyum aljinat ile mikroenkapsülasyonunun etkin bir kaplama yöntemi olduğu gösterilmiştir (Sabikhi, 2008). Yapay mide ortamında bizim yaptığımız çalışmalarda her iki bakteri kültürünün de 1. saat sonunda canlılık kaybına yol açtığı, ancak yapay bağırsak ortamında Sabikhi (2008) ile yakın sonuçlar elde edildiği tespit edilmiştir.

Lee ve Heo (2000) yaptıkları çalışmada kalsiyum aljinat ile immobilize ettikleri *B. longum* KCTC 3128 ve HLC 3742 suşlarının kaplanmamış hücrelerinin yapay mide ortamında sırasıyla 30 ve 60 dakikada canlılığını kaybederken; kaplanmış hücrelerin canlılıklarını kaplamada kullanılan aljinat konsantrasyonuna bağlı olarak 2 ile 3 saatten daha uzun süre azalarak da olsa koruyabildiklerini tespit etmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmalarda *L. rhamnosus* KPb7 ve *L. acidophilus* KPb4b suşlarının aljinat+nişasta kapsüllerinde 180. dakikaya kadar bakteri canlılığını korurken aljinat ve manukol kapsüllerinde 120. dakika sonunda canlı bakteri sayısının kalmadığı tespit edilmiştir.

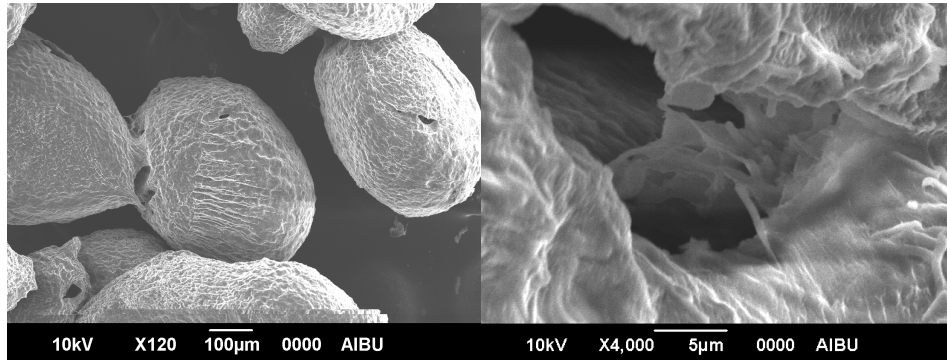
4.10. Mikrokapsüllerin Morfolojik Yapılarının Elektron Mikroskop Görüntüleri

L. acidophilus KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kültürlerinin 3 farklı kaplama materyali ile kaplanmış mikroküreciklerinin taramalı elektron mikroskopta çekilen morfolojileri Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da verilmiştir. Elektron mikrograflar incelendiğinde farklı kaplama materyallerinin farklı kapsül yüzeyleri oluşturduğu açıkça görülmektedir. Buna göre

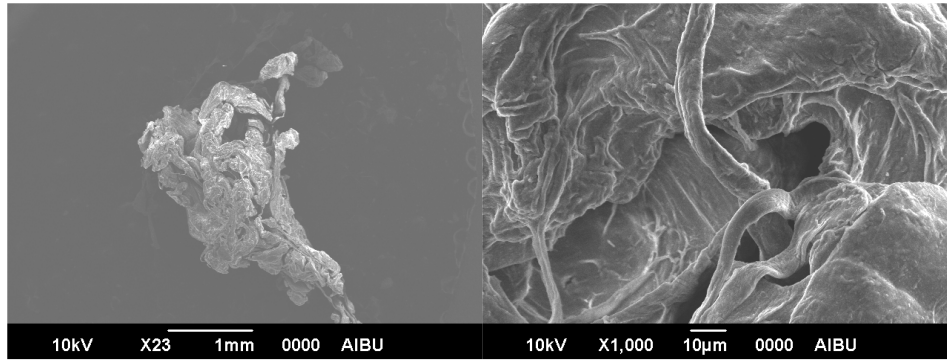
aljinat ve aljinat+nişasta kapsüllerinin yüzeyi birbirine benzediği ve düzgün olmayan, ağsı ve pürüzlü bir yapı gösterdiği, buna karşın manukol kapsüllerinin yüzeyinin oldukça düzgün ve pürüzsüz bir yüzey yapısına sahip olduğu görülmektedir. Kapsüllerin yüzey yapılarındaki farklılıkların kapsüllerin çeşitli fiziksel ve kimyasal etkilere karşı farklı davranışlar göstermesinde önemli olabileceği düşünülmektedir. Ancak yapılan çekimlerde 2 farklı probiyotik kültürü kullanılarak hazırlanan kapsüllerin görüntülerinin değişmediği, görüntünün sadece kaplama materyali farkından ortaya çıktığı tespit edilmiştir.



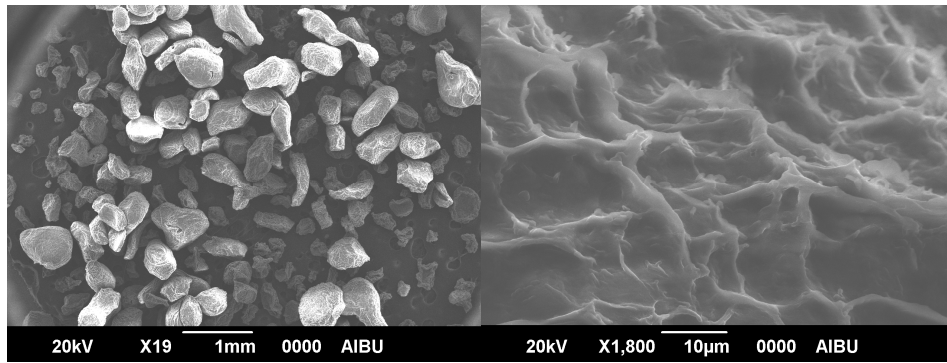
Şekil 4.21. *L. acidophilus* KPb4b aljinat kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü



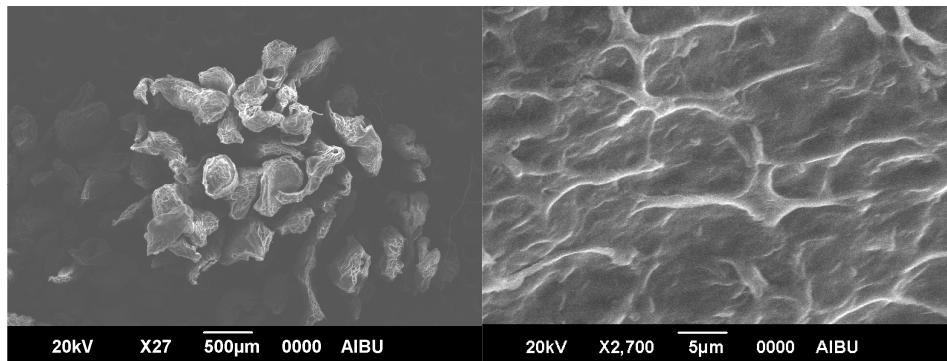
Şekil 4.22. *L. acidophilus* KPb4b aljinat+nişasta kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü



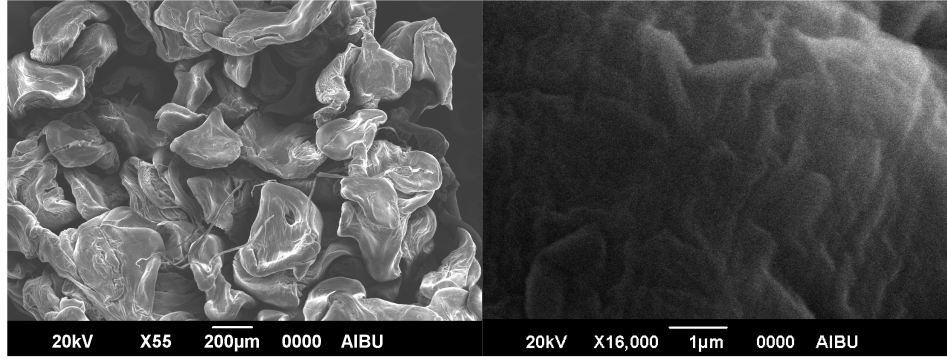
Şekil 4.23. *L. acidophilus* KPb4b manukol kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü



Şekil 4.24. *L. rhamnosus* KPb7 aljinat kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü



Şekil 4.25. *L. rhamnosus* KPb7 aljinat+nişasta kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü



Şekil 4.26. *L. rhamnosus* KPb7 manukol kapsüllerinin farklı büyütme oranlarındaki görüntüsü

Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan çekimlerde farklı kapsül yüzeylerinin farklı morfolojilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna göre en düzgün yüzeyin manukol kapsüllerinde olduğu, aljinat kapsüllerinin ise pürüzlü bir yüzeye sahip olduğu, mikroorganizmaların kapsül içerisinde rastgele tutuklandığı, kapsül içerisinde ve yüzeyinde olmak üzere çeşitli derinliklerde bulunduğu belirlenmiştir. Benzer kapsül görüntüleri Sultana ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada da gözlenmektedir.

Calleros ve ark. (2007) yaptıkları araştırmada *Lactobacillus casei* 81 LYO kültürünü %0.5 aljinat ve modifiye nişasta ile kapladıktan sonra yoğurt içerisinden +4°C’de 20 gün depolamışlardır. Süre sonunda çapları 0,89 mm ile 1,08 mm arasında değişen kapsülleri yoğurttan ayırarak, kapsüllerdeki bakteri sayısını belirlemişler ve aynı zamanda kapsüllerin görüntülerini taramalı elektron mikroskopta incelemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen farklı kaplama yöntemi nedeniyle daha büyük kapsüllerle çalışılmış, bunun sonucu olarak da elektron mikrografları bizim çalışmamızda çekilen görüntülerden daha farklı bulunmuştur.

4.11. Mikroenkapsüle Probiyotik İçeren Gıda Örneğinin Duyusal Analizi

L. acidophilus KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kültürlerinden hazırlanan mikrokapsüller kullanılarak ayrı ayrı vanilyalı pudingler hazırlanarak daha önceden konu hakkında bilgilendirilmiş 8'er panelist tarafından duyusal analiz yapılmıştır. Numuneler hazırlandıktan sonra başlangıçta ve 1 hafta buzdolabında saklandıktan sonra 8. gün duyusal analizler yapılmıştır. Analizlerde kontrol olarak mikroorganizma katılmamış gıda örnekleri kullanılmıştır. Duyusal analiz için hazırlanan gıda örneklerinin pH değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Duyusal analizi yapılan puding örneklerinin pH değerleri

Gıda Örneği	Örnekte Bulunan Kapsül	pH Değeri		pH Farkı
		Depolama Öncesi	Depolama Sonrası	
Vanilyalı Puding	KPb4b+Alj.	6.70	6.42	0.28
	KPb4b+Man.	6.25	6.01	0.25
	KPb4b+A/N	6.46	6.11	0.35
	Kontrol	6.85	6.70	0.15
Vanilyalı Puding	KPb7+Alj.	6.66	6.33	0.33
	KPb7+Man.	6.04	5.75	0.29
	KPb7+A/N	6.56	6.26	0.30
	Kontrol	6.94	6.49	0.45

Bir gıda maddesinin depolama öncesi ve sonrası pH değerlerindeki değişim biyolojik stabilitesinin belirlenmesinde önemlidir. Yukarıdaki sonuçlar incelendiğinde depolama öncesi ve sonrasındaki pH değişimleri açısından *L. acidophilus* KPb4b kültürü ile yapılan pudinglerde en yüksek değişiklik 0,35 pH birimi ile aljinat+nişasta ile kaplanan mikroküreciklerde; en düşük değişiklik ise 0,15 pH birimi ile kaplanmamış kültür içeren kontrol grubu pudinglerinde görülmüştür. *L. rhamnosus* KPb7 kültürü ile yapılan pudinglerde ise en yüksek değişiklik 0,45 pH birimi ile kaplanmamış kültür içeren kontrol grubu pudinglerinde; en düşük

değişiklik ise 0,29 pH birimi ile manukol ile kaplanan puding örneklerinde görülmüştür. Tüm sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde pH'da meydana gelen değişim 0,5 birimin altında kaldığı için üretilen pudinglerin, pH açısından biyolojik stabilitelerini korudukları görülmektedir. Tadım panellerinden elde edilen başlangıç ve 1. hafta sonrası duyu analizi sonuçları Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Puding numunelerinin depolama öncesi duyu analizi sonuçları

	Örnekte Bulunan Kapsül	Koku	Kıvam	Renk	Görünüş	Tat	Ağızda Bıraktığı His	Genel Beğeni
<i>L. acidophilus</i>	KPb4b+A	4.4±0.92	3.5±1.07	4.3±0.71	2.8±0.46	3.6±1.06	3.9±0.83	3.5±1.20
	KPb4b+M	4.5±0.71	4.8±0.00	3.9±1.41	3.9±0.00	4.1±0.71	4.3±0.71	4.3±0.71
	KPb4b+A/N	4.3±0.71	3.6±0.71	4.4±0.00	3.4±0.71	3.8±0.00	3.9±0.71	3.6±0.71
	Kontrol	4.5±0.71	4.3±0.00	4.5±1.41	4.0±2.12	4.5±0.00	4.8±0.00	4.6±0.00
<i>L. rhamnosus</i>	KPb7+A	3.5±0.93	2.6±0.52	3.8±1.04	3.4±1.06	3.4±0.74	3.4±0.74	3.5±0.76
	KPb7+M	2.8±1.41	2.1±0.00	2.9±0.71	2.5±0.00	1.0±0.00	1.0±0.00	1.0±0.00
	KPb7+A/N	4.0±0.00	3.0±0.00	3.9±0.71	3.8±0.00	4.3±0.71	3.8±1.41	3.8±0.71
	Kontrol	3.9±0.00	2.8±0.00	3.5±2.12	3.4±1.41	4.3±0.71	4.0±0.00	4.1±0.71

Depolama öncesi puding örneklerinin duyu analizi sonuçları incelendiğinde genel beğeni açısından en yüksek puanı kontrol numunelerinin aldığı görülmektedir. Bunun nedeni panelistlere sorulduğunda probiyotik kapsül içeren numunelerde hissettikleri tuzluluk tadı olduğunu belirtmişlerdir. Kontrol olarak sunulan numunelerin de herkesin alışkın olduğu puding tadı olduğu dikkate alındığında alınan sonuçlar normal kabul edilebilir. Panelistlere sorulduğunda puding örneklerinde bazı panelistlerin kapsüllerden kaynaklanan partiküler yapıyı hissettikleri tespit edilmiştir.

Mikroenkapsüle *L. acidophilus* KPb4b içeren numunelerden genel beğeni açısından en yüksek puanı 4.3 ile Manukol kapsülleri ile üretilen pudingler alırken en düşük puanı 3.5 ile aljinat kapsülleri ile üretilen pudingler almıştır. Mikroenkapsüle

L. rhamnosus KPb7 kültürü ile üretilen pudingler genel beğeni açısından incelendiğinde en yüksek puanı 3.8 ile yine aljinat+nişasta kapsülleri ile üretilen pudingler almış bunu sırasıyla aljinat (3.5 puan) kapsülleri ile üretilen pudingler ve manukol (1.0 puan) kapsülleri ile üretilen pudingler takip etmiştir.

Çizelge 4.8. Puding numunelerinin depolama sonrası duyu analizi sonuçları

	Örnekte Bulunan Kapsül	Koku	Kıvam	Renk	Görünüş	Tat	Ağızda Bıraktığı His	Genel Beğeni
<i>L. acidophilus</i>	KPb4b+A	4.1±1.13	3.1±1.13	3.8±0.71	2.5±0.93	3.3±1.16	3.5±1.20	3.1±1.13
	KPb4b+M	4.0±0.00	3.4±0.00	3.6±0.00	3.0±0.00	3.4±0.00	3.4±0.71	3.3±0.00
	KPb4b+A/N	4.0±0.71	2.9±0.71	3.9±0.71	3.0±0.71	3.3±0.71	3.1±0.00	3.0±0.00
	Kontrol	4.4±0.00	4.3±0.00	4.5±0.00	4.3±0.00	4.5±0.00	4.8±0.00	4.6±0.00
<i>L. rhamnosus</i>	KPb7+A	3.1±1.25	2.3±1.28	3.3±1.04	2.8±1.49	3.0±1.07	3.0±1.31	2.9±1.36
	KPb7+M	2.8±1.41	1.3±0.00	2.4±0.00	2.1±0.71	1.4±0.00	1.4±0.00	1.5±0.71
	KPb7+A/N	3.3±0.71	2.4±0.00	3.1±0.00	2.8±1.41	3.0±0.71	2.9±0.71	2.5±0.71
	Kontrol	3.4±0.71	2.5±1.41	3.3±1.41	2.6±1.41	3.9±0.71	3.6±0.71	3.3±1.41

Puding ile yapılan duyu analizi denemelerinde ticari olarak bu ürünlerde raf ömrü olarak belirlenen 1 haftalık periyot esas alınarak +5°C’de yapılan depolama sonrasında numuneler aynı koşullarda tekrar aynı panelistler tarafından duyu analize alınmıştır. Depolama sonrasında mikroenkapsüle *L. acidophilus* KPb4b içeren puding örneklerinde genel beğeni açısından en yüksek puanı 4.6 ile kontrol örneği almış bunu sırasıyla 3.3 puan ile manukol kapsülleri ile üretilen pudingler, 3.1 puan ile aljinat kapsülleri ile üretilen pudingler ve 3.0 puan ile aljinat+nişasta kapsülleri ile üretilen pudingler takip etmiştir. Depolama sonrasında mikroenkapsüle *L. rhamnosus* KPb7 kültürü ile üretilen puding örneklerinde ise genel beğeni açısından en yüksek puanı 3.3 puan ile kontrol örneği almış olup bunu sırasıyla 2.9 puan ile aljinat kapsülleri ile üretilen pudingler, 2.5 puan ile aljinat+nişasta kapsülleri

ile üretilen pudingler ve 1.5 puan ile manukol kapsülleri ile üretilen pudingler izlemiştir.

Depolama öncesi ve sonrası değerler açısından karşılaştırıldığında ise mikroenkapsüle *L. acidophilus* KPb4b içeren puding örneklerinde kontrol haricinde, en yüksek beğeni kazanan numune manukol içeren numunelerdir. *L. rhamnosus* KPb7 içeren puding örneklerinde ise aljinat ve aljinat+nişasta mikrokapsülleri içeren örnekler en yüksek beğeniye kazanmışlardır.

4.12. Sonuçların İstatistiksel Analizi

Araştırmada üzerinde çalışılan her iki mikroorganizmanın farklı sıcaklıklarda depolama stabilitesi yapay mide ve ince bağırsak ortamlarındaki canlılıklarının karşılaştırılması amacıyla normallik testi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Normallik testi sonuçları

Parametre	Shapiro-Wilk Testi Sonucu		
	Statistic	df	Sign
YMO <i>L. acidophilus</i> KPb4b	0,94	16	0,394 normal
YMO <i>L. rhamnosus</i> KPb7	0,91	16	0,149 normal
YMO <i>L. acidophilus</i> KPb4b; <i>L. rhamnosus</i> KPb7	0,91	16	0,149 normal
YİBO <i>L. acidophilus</i> KPb4b	0,87	16	0,031 normal değil
YİBO <i>L. rhamnosus</i> KPb7	0,90	16	0,093 normal
YİBO <i>L. acidophilus</i> KPb4b; <i>L. rhamnosus</i> KPb7	0,90	16	0,093 normal
DS <i>L. acidophilus</i> KPb4b	0,87	16	0,025 normal değil
DS <i>L. rhamnosus</i> KPb7	0,79	16	0,002 normal değil
DS <i>L. acidophilus</i> KPb4b; <i>L. rhamnosus</i> KPb7	0,79	16	0,002 normal değil

YMO: Yapay Mide Ortamı, YİBO: Yapay İnce Bağırsak Ortamı, DS: Depolama Stabilitesi df: Serbestlik derecesi
Sign: Önem

Veri sayısına uygun olarak normallik durumuna Shapiro-Wilks Testi ile bakılmış, buna göre Sign değeri 0,05'ten büyük olanlar normal, 0,05'ten küçük olanlar ise normal dağılmamaktadır (normal değil) şeklinde verilmiştir.

Yapay mide ortamında *L. rhamnosus* KPb7 grupları arasında farklılık olup olmadığı anova ile analiz edilmiş; Sign değeri (0,481) 0,05'ten büyük çıktığı için *L. rhamnosus* KPb7 grupları arasında fark olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde yapay mide ortamında *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında farklılık olup olmadığı anova ile analiz edilmiş; Sign değeri (0,167) 0,05'ten büyük çıktığı için *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında fark olmadığı belirlenmiştir.

Yapay mide ortamında *L. rhamnosus* KPb7 ve *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında farklılık olup olmadığı *t* testi ile analiz edilmiştir. Buna göre Sign değeri (0,854) 0,05'ten büyük çıktığı için *L. rhamnosus* KPb7 ve *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında fark olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Yapay mide ortamında *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 grupları arasındaki farklılık testleri

<i>L. acidophilus</i> KPb4b Grupları (Serbest Hücre A, AN, M) Arasındaki Fark (F)	<i>L. rhamnosus</i> KPb7 Grupları (Serbest Hücre, A, AN, M) Arasındaki Fark (F)	<i>L. acidophilus</i> KPb4b ve <i>L. rhamnosus</i> KPb7 Arasındaki Fark (<i>t</i>)
1,921	0,854	0,034*

*: P<0,05 seviyesinde önemli; (F): Anova varyans analizi F değerleri; (*t*): Bağımsız *t* testi varyans analizi *t* değerleri ; A: Aljinat mikrokapsülleri; AN: Aljinat+nişasta mikrokapsülleri; M: Manukol mikrokapsülleri

Yapay ince bağırsak ortamında *L. rhamnosus* KPb7 ve *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında farklılık olup olmadığı *t* testi ile analiz edilmiştir. Sign değeri (0,034) 0,05'ten küçük çıktığı için *L. rhamnosus* KPb7 ve *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında fark olduğu belirlenmiştir.

Yapay ince bağırsak ortamında *L. rhamnosus* KPb7 grupları arasında farklılık olup olmadığı anova ile analiz edilmiştir. Sign değeri (0,000) 0,05'ten küçük çıktığı için *L. rhamnosus* KPb7 grupları arasında fark olduğu belirlenmiştir. Hangi grubun diğerlerinden farklı olduğunu belirlemek için grup varyansları homojen olduğundan (sign=0,000<0,05) Scheffe testi kullanılmıştır.

Yapay ince bağırsak ortamında *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında farklılık olup olmadığı Kruskal-Wallis Testi ile analiz edilmiştir. Sign değeri (0,024) 0,05'ten küçük çıktığı için *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında fark olduğu belirlenmiştir. Hangi grubun diğerlerinden farklı olduğunu belirlemek için Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.11, Çizelge 4.12, ve Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.11. Yapay ince bağırsak ortamı varyans analiz sonuçları

<i>L. acidophilus</i> KPb4b Grupları Arasındaki Fark (Chi-square)	<i>L. rhamnosus</i> KPb7 Grupları Arasındaki Fark (F)	<i>L. acidophilus</i> KPb4b ve <i>L. rhamnosus</i> KPb7 Arasındaki Fark (t)
9,419*	14,499*	-2,266

*: P<0,05 seviyesinde önemli; (F): Anova varyans analizi F değerleri; (t): Bağımsız t testi varyans analizi t değerleri ; Chi-square: Kruskal-Wallis varyans analizi chi-square değerleri

Çizelge 4.12. Yapay ince bağırsak ortamı *L. acidophilus* KPb4b gruplar arası farklılıklar

	A-M	A-AN	M-AN	KPb4b-A	KPb4b-AN	KP4b-M
Mann-Whitney U Testi (Z)	-0,577	-1,443	-0,289	-2,309*	-2,309*	-2,309*

*: P<0,05 seviyesinde önemli; Z: Mann-Whitney U Testi Z değerleri; A: Aljinat mikrokapsülleri, AN: Aljinat+nişasta mikrokapsülleri, M: Manukol mikrokapsülleri

Çizelge 4.13. Yapay ince bağırsak ortamı *L. rhamnosus* KPb7 gruplar arası farklılıklar.

	A-M	A-AN	M-AN	KPb7-A	KPb7-AN	KPb7-M
Scheffe Testi (J)	1,238	2,975*	1,738	2,818	5,793*	4,055*

*: P<0,05 seviyesinde önemli; J: Scheffe testi J değerleri; A: Aljinat mikrokapsülleri, AN: Aljinat+nişasta mikrokapsülleri, M: Manukol mikrokapsülleri

Depolama stabilitesi açısından *L. rhamnosus* KPb7 grupları arasında farklılık olup olmadığı Kruskal-Wallis Testi ile analiz edilmiştir. Sign değeri (0,840) 0,05'ten büyük çıktığı için *L. rhamnosus* KPb7 grupları arasında fark olmadığı belirlenmiştir.

Depolama stabilitesi açısından *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında farklılık olup olmadığı Kruskal-Wallis Testi ile analiz edilmiştir. Sign değeri (0,001) 0,05'ten küçük çıktığı için *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında fark olduğu belirlenmiştir. Hangi grubun diğerlerinden farklı olduğunu belirlemek için ise Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır.

Depolama stabilitesi açısından *L. rhamnosus* KPb7 ve *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında farklılık olup olmadığı Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiş; Sign değeri (0,000) 0,05'ten küçük çıktığı için *L. rhamnosus* KPb7 ve *L. acidophilus* KPb4b grupları arasında fark olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. Depolama stabilitesi varyans analizleri

<i>L. acidophilus</i> KPb4b Grupları Arasındaki Fark (Chi-square)	<i>L. rhamnosus</i> KPb7 rupleri Arasındaki Fark (chi-square)	<i>L. rhamnosus</i> KPb7 ve <i>L. acidophilus</i> KPb4b Arasındaki Fark (Z)
0,840	16,888*	-3,999*

*: P<0,05 seviyesinde önemli; Chi-square: Kruskal-Wallis varyans analizi chi-square değerleri; Z: Mann-Whitney U Testi Z değerleri

Çizelge 4.15. Depolama stabilitesi *L. acidophilus* KPb4b gruplar arası farklılıklar

Haftalar	1-2	1-3	1-4	2-3	2-4	3-4
Mann- Whitney U Testi (Z)	-1,706	-2,017*	-3,302*	-1,721	-3,302*	-3,021*

*: P<0,05 seviyesinde önemli; Z: Mann- Whitney U Testi Z değerleri

5. SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar özetle aşağıda sıralanmıştır:

Ülkemiz üstün nitelikli yeni potansiyel probiyotik suşların izolasyonu açısından çok zengin bir coğrafyada bulunmaktadır. Probiyotik özellikler açısından var olan ticari kültürlerle alternatif yerel suşların izolasyonu, tanısı ve probiyotik gıda üretiminde kullanım olanaklarının araştırıldığı bu çalışmada *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kültürlerinin probiyotik gıda üretiminde kullanım potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir.

Mikroenkapsülasyonda farklı kaplama materyalleri ve farklı probiyotik kültürlerin kaplanması çalışmalarında her bir mikroorganizma kültürü ayrı ayrı ele alınmalı ve türe, hatta suşa özgü kaplama materyali ve yöntemi geliştirilmelidir. Bu amaç için uygun yöntem ve kaplama materyali kombinasyonu çok önemlidir. Hangi kaplama materyalinin hangi miktarda ve karışımda kullanılacağı denemelerle ortaya konulmalıdır.

Literatürde yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu analitik saflıkta kaplama materyalleri kullanılarak *in vitro* koşullarda yapılmış çalışmalardır. Bu açıdan bakıldığında bu araştırmada gıda endüstrisi için önerilebilecek kaplama materyalinin gıda saflığında kullanılabilen, ucuz ve kolay temin edilebilen materyaller arasından seçilmesi gerektiği dikkate alınarak manukol kaplama materyali olarak özellikle denemeye dâhil edilmiştir.

Kaplama materyali olarak depolama stabilitesi açısından değerlendirildiğinde aljinat+nişasta karışımından elde edilen emülsiyonun tek başına aljinat ve manukol (gıda saflığındaki aljinat) ile elde edilenden daha uygun bir kaplama materyali olduğu tespit edilmiştir.

Kaplama materyalinin mikroküreciklerin sıcaklık, düşük pH, yapay mide ve bağırsak ortamlarındaki özellikleri üzerine önemli etkisi olduğu ve kapsülün morfolojik görünümünü etkilediği belirlenmiştir.

Mikroenkapsülasyon genellikle hassas, zor gelişen veya oksijen toleransı düşük olan kültürler için uygun bir koruma yöntemidir. Doğal kaynaklardan izole edilen suşların genel olarak gıda üretim proseslerinde karşılaşılan olumsuz koşullara direnci geliştirilmiş ticari suşlardan daha yüksektir. Ancak bu suşların canlılık kayıplarının en aza indirilmesi ve katılacağı gıdanın fiziksel, kimyasal ve duyuşal özelliklerini değiştirmeden, raf ömrü süresince canlılığını koruyabilmesi mikroenkapsülasyon ile mümkün olmaktadır.

Bu araştırmada seçilen *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 kültürlerinin %1,5 manukol ve %1,5 aljinat+%0,5 nişasta karışımı ile kaplanarak model gıda olarak belirlenen puding ortamında kullanıldığında genel beğeni açısından kontrol grubuna yakın puanlar aldığı görülmüştür.

Bundan sonra yapılacak başka çalışmalarla probiyotik nitelikleri belirlenmiş ve kesin tanıları yapılmış bu mikroorganizmalardan elde edilen mikrokapsüllerin çeşitli gıda ortamlarında kullanılabilme potansiyelinin araştırılması gerekmektedir.

6. 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.

Armbrecht, J. 2002. Probiotics and possible health benefits, <http://www.bact.wisc.edu/ScienceEd/probioticsandpossibl.html>. (Erişim tarihi 22 Mayıs 2010).

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

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.

Bilgiçli, N. ve Türker, S. 2004. Tarhanada sindirilebilir protein ve kül miktarı üzerine maya, malt unu ve fitaz katkılarının etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18 (33): 90-97.

Borza, A.D. 2007. Encapsulation of Bifidobacterium adolescentis 15703T in gelatin-maltodextrin microspheres to improve survival during gastrointestinal transition. Master of Science Thesis, Dalhousie University, Canada, p. 126.

Brazel, C.S. 1999. Microencapsulation: Offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World*, 44: 388–393.

- 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.
- Cantergiani, E. 2009. Polysaccharides for microencapsulation, COST865 Summer School on Bioencapsulation. *Course Notes*, Anzere, Switzerland, p. 194.
- Capela P., Hay T.K.C. and Shah N.P. 2007. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Research International*, 40: 1261–1269.
- Cardarelli, H.R., Buriti, F.C. A., Castro, I.A. and Saad, S.M.I. 2008. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 41: 1037–1046.
- 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>. (Erişim tarihi 11 Şubat 2010).
- 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 Microbiological Methods*, 56: 27-35.
- Champagne, C.P. and Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 184-190.
- Chen, K.N., Chen, M.J, Liu, J.R, Lin, C.W. and Chiu, H.Y. 2005. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation, *Journal of Food Science*, 70: 260-266.
- Crittenden, R., Weerakkody R., Sanguansri L. and Augustin M.A. 2006. Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied And Environmental Microbiology*, 72: 2280-2282.

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

Çakır, İ. ve Çakmakçı M.L. 2004. Probiyotikler tanımı etki mekanizması seçim ve güvenilirlik kriterleri. *Gıda*, 29: 427-434.

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

Çakır, İ. 2003. *Lactobacillus ve Bifidobakterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi*, (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, s. 84.

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.

Davidson, R.H., Duncan, S.E., Hackney, C.R., Eigel, W.N. and Boling, J.W. 2002. Probiotic cultures survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *Journal of Dairy Science*, 83: 666-673.

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*, 72: 9.

Doleyres, Y. and Lacroix, C. 2009. Cell immobilization for the dairy industry, <http://www.nisco.ch/download/27.pdf>. (Erişim tarihi 12 Mart 2010)

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

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

Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. and Joly, B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research In Microbiology*, 152: 167-173.

Fukushima Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A. and Mitsuoka, T. 1988. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal Of Food Microbiology*, 42: 39-44.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal, *Journal Of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.

Fuller, R. 1999. Probiotics for farm animals, *Probiotics A Critical Review*, ed: Tannock G.W. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. p. 164.

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.

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

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.

Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity, *American Journal of Clinical Nutrition*, 39: 756-761.

Gomes, A.M.P. and Malcata, F.X. 1999. *Bifidobacterium* ssp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 139-157.

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

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

Holzapfel, W.H. and Schillinger, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35: 109-116.

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.

Hou, R.C.W., Lin, M.Y., Wang, M.M.C. and Tzen, J.T.C. 2003. Increase of Viability of Entrapped Cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* in Artificial Sesame Oil Emulsions. *Journal of Dairy Science*, 86: 424-428.

IPW. 2004. International Probiotic Workshop, Workshop Summary, www.probiotics-amsterdam.org/workshop/index.php. (Erişim tarihi 21 Ocak 2010).

ISP. 2006. Alginates in foods, Technical User Guide, ISP (International Specialty Products), p. 28.

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.

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

Kaur, I.P., Chopra, K. and Saini, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15: 1-9.

- Kim, S.J., Cho, S.Y., Kim, S.H., Song, O.J., Shin, S., Cha, D.S. and Park, H.J. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4312. *LWT - Food Science and Technology*, 41: 493–500.
- Klaenhammer, T.R. 1998. Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: Genetic mandate. *International Dairy Journal* 8: 497-505.
- Klokk, T.I. and Melvik, J.E. 2002. Controlling the size of alginate gel beads by use of a high electrostatic potential. *Journal of Microencapsulation*, 19: 415-424.
- 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*. ed: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D., Vol. 3, Academic Pres, pp: 1783-1789.
- 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.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H.C. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT and conventionally treated milk during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 39: 177-183.
- Lakkis, J.M. 2007. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. *Controlled Release Technologies in Food systems*, pp: 83-100.
- Laurens-Hattingh, A. and Viljoen, B.C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11: 1-17.
- Lee, K.Y. and Heo, T.R. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 869-873.
- Lee, J.S., Cha, D.S. and Park, H.J. 2004. Survival of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in Chitosan-Coated Calcium Alginate Microparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7300-7305.

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

Li, B.Z., Wang, L.J., Li, D., Chiu, Y.L., Zhang, Z.J., Shi, J., Chen, X.D. and Mao, Z.H. 2009. Physical properties and loading capacity of starch-based microparticles crosslinked with trisodium trimetaphosphate. *Journal of Food Engineering*, 93 (3): 255-260.

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.

Lian, W.C., Hsiao, H.C. and Chou, C.C. 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 293– 301.

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.

Mattila-Sandholm, T., Mättö, J. and Saarela, M. 1999. Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9: 25-35.

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

Mitsuoka, T. 1996. Intestinal flora and human health. *Asia Pacific Journal Of Clinical Nutrition*, 1: 2-9.

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.

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

Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. and Vilani, F. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotic, *Meat Science*, 67: 309-317.

Plessas, S., Trantallidi, M., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Nigam, P. and Koutinas, A.A. 2007. Immobilization of kefir and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making, *Food Chemistry*, 105: 187-194.

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

Reid, A.A., Vuilleumard, J.C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E. and Champagne, C.P. 2005. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca^{2+} -induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model, *Journal of Microencapsulation*, 22: 603-619.

Reid, G. 2000. *In vitro* testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM as a possible probiotic for the urogenital tract. *International Dairy Journal* 10: 415-419.

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

Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. 2005. A Review: Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic food. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1410-1417.

Roy, D., Ward, P., Vincent, D. and Mondou, F. 2000. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. *Current Microbiology*, 40: 40-46.

Roy, D., Sirois, S. and Vincent, D. 2001. Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Current Microbiology*, 42: 282-289.

Sabikhi, L., Babu, R., Thompson, D.K. and Kapila, S. 2008. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food Bioprocess Technology*, 3: 586-593

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.

Salminen, S., vonWright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., deVos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. and Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 93-106.

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

Shah, N.P. 2000. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, 83: 894–907.

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

Sendra, E., Fayos, P., Lario, Y., Lopez, J.F., Barbera, E.S. and Alvarez, J.A.P. 2008. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology*, 25: 13-21.

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.

Talwalkar, A. 2003. Studies on the Oxygen Toxicity of Probiotic Bacteria with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp., (PhD. Thesis), Centre for Advanced Food Research, University of Western Sydney.

Talwalkar, A. and Kailasapathy, K. 2004. A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 117-124.

Tannock, G.W. 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R and D. *Tibtech*, 15: 270-274.

Temiz, H. ve Hurşit, K. 2005. İnek ve soya sütü karışımların duyuusal özelliklerine peynir suyu ve karbonat kullanımının etkisi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (1): 1-5.

Uysal, P.Ç., Karagül-Yüceer, Y. ve Pala, A. 2005. Farklı Keçi Irkı Sütlerinden Üretilen Probiyotik Ayranın Karakteristik Özellikleri. *Akademik Gıda*, 18: 43-46.

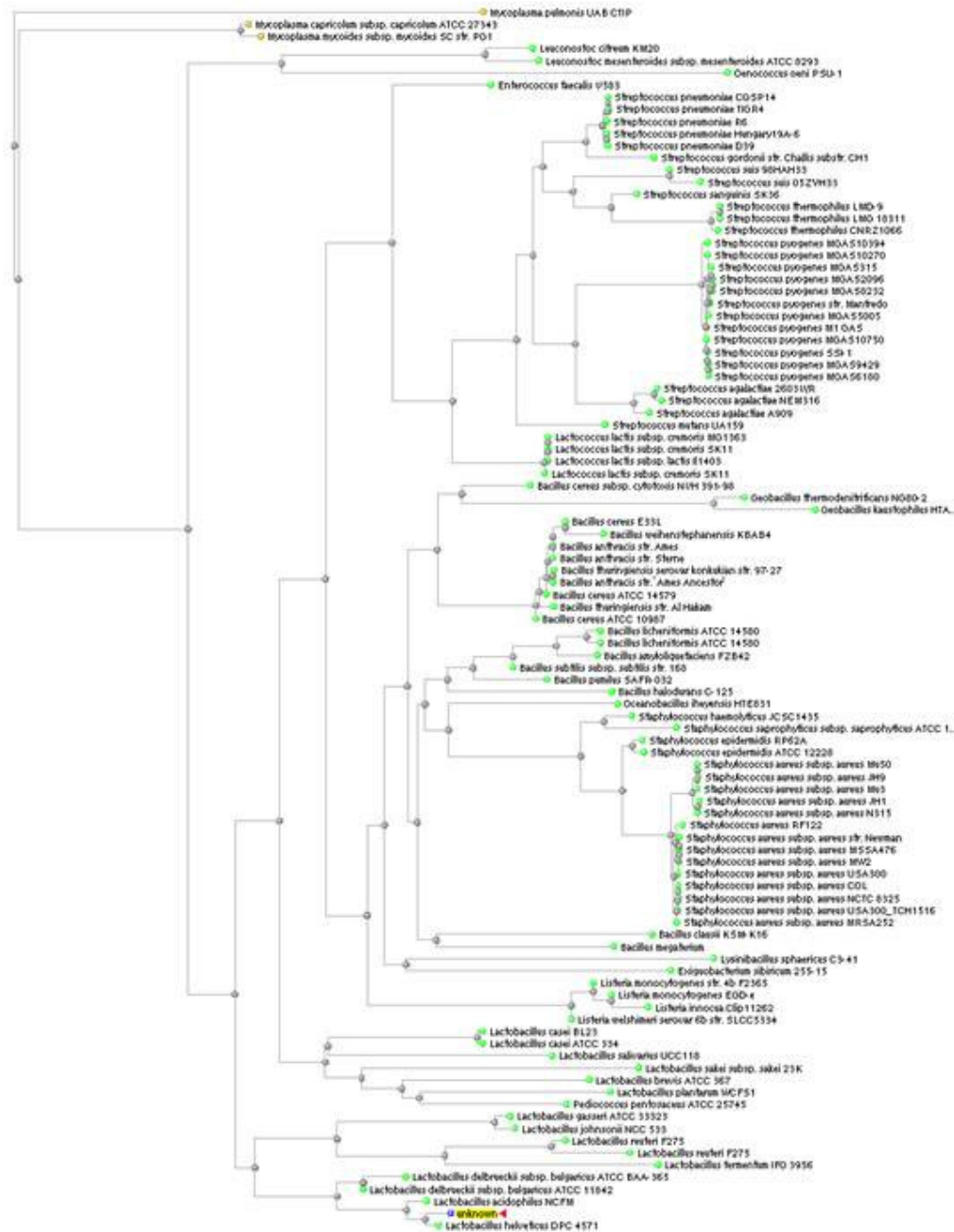
Weissbrodt, J. 2009. Food & feed applications, spray drying, COST865 Summer School on Bioencapsulation *Course Notes*, Anzere, Switzerland, p. 194.

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

Zhou, J.S., Shu, Q., Rutherford, K.J., Prasad, J., Birtles, M.J., Gopal, P.K. and Gill, H.S. 2000. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/ c mice. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 87-96.

7. EKLER

EK 1. *L. acidophilus* KPb4b Suşunun Moleküler Tanı Sonuç Dendogramı



EK 2. *L. rhamnosus* KPb7 Suşunun Moleküler Tanı Sonuç Dendrogramı

