

**ENKAPSÜLASYON İŞLEMİNİN DONDURMA
DEPOLAMA PERİYODU BOYUNCA
PROBİYOTİK *Lactobacillus acidophilus*
STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Sedat SEDEFOĞLU

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Prof. Dr. Selahattin SERT
2014**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENKAPSÜLASYON İŞLEMİNİN DONDURMA DEPOLAMA
PERİYODU BOYUNCA PROBİYOTİK *Lactobacillus acidophilus*
STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Sedat SEDEFOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

ENKAPSÜLASYON İŞLEMİNİN DONDURMA DEPOLAMA PERİYODU
BOYUNCA PROBİYOTİK *Lactobacillus acidophilus* STABİLİTESİ ÜZERİNE
ETKİSİ

Prof. Dr. Selahattin SERT danışmanlığında, Sedat SEDEFOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 08/09/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Selahattin SERT

İmza :

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Bülent ÇETİN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 18 / 09 / 2014 tarih ve 37 / 1238 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENKAPSÜLASYON İŞLEMİNİN DONDURMA DEPOLAMA PERİYODU BOYUNCA PROBİYOTİK *Lactobacillus acidophilus* STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Sedat SEDEFOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Selahattin SERT

Bu çalışmada, probiyotik *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşu, %4 konsantrasyonlu aljinat süspansiyonunda immobilize edilmiş ve ekstrüzyon yöntemiyle enkapsüle edilerek dondurmaya ilave edilmiştir. 3 ay süresince -18°C’de depolanan probiyotik özellikteki dondurmada belirli aralıklarla (0, 30, 90 gün) alınan örneklerde laktik asit bakterilerinin canlılığını sürdürülebilme yeteneği karşılaştırılarak araştırılmıştır. Çalışmanın son aşamasında serbest ve enkapsüle bakterileri içeren dondurmalar, eğitimli 10 paneliste duyusal analiz olarak sunulmuş ve böylece kapsüllü bakterilerin kapsülsüz bakterilerden duyusal olarak farklılığı ve panelistler tarafından kabul edilebilirliği incelenmiştir.

Araştırma sonuçlarına göre -18°C’de 3 aylık depolama süresinin sonunda dondurmaya ilave edilen serbest ve enkapsüle *L.acidophilus* ATCC 4356’nın canlılıklarını korudukları, buna karşılık sayılarındaki azalışın aynı düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar enkapsülasyon işleminin dondurma depolama periyodu boyunca *L.acidophilus* ATCC 4356’nın stabilitesi üzerine etkisinin önemsiz seviyede olduğunu ortaya koymuştur ($p>0,05$). Öte yandan dondurmaların 90 günlük depolama periyodu boyunca, serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 sayılarının 10^7 kob/g’ın altına düşmemiş olması son üründe probiyotiklerin arzu edilen düzeyde canlılığını koruduğunu, dolayısıyla bakterinin terapotik ve koruyucu özelliklerini göstermesi açısından dondurmanın iyi bir probiyotik süt ürünü olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Serbest ve enkapsüle dondurmalara ait duyusal analiz sonuçlarında ise enkapsülasyonun dondurmanın yapı ve tekstüründe önemli seviyede etkiye yol açtığı ($p<0,05$) ve genel kabul düzeyi olarak serbest ve enkapsüle dondurmalarındaki farkın önemli seviyede olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte renk, görünüş, tat ve koku kriterleri bakımından serbest ve enkapsüle dondurmalarındaki farkın önemsiz seviyede olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$).

2014, 57 sayfa

Anahtar kelimeler: Probiyotik, enkapsülasyon, *Lactobacillus acidophilus*, ekstrüzyon metodu, dondurma

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECT OF ENCAPSULATION PROCESS ON STABILITY OF PROBIOTIC *Lactobacillus acidophilus* DURING ICE CREAM STORAGE

Sedat SEDEFOĞLU

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Selahattin SERT

In this research, the probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 were immobilized into 4%alginate suspension and then added into ice cream followed by encapsulation by extrusion. During a 3 month storage, samples were taken monthly (0, 30th and 90th days) from ice cream and the viability of lactic acid bacteria were determined comparatively. Finally, ice creams containing free and encapsulated bacteria were served to 10 trained panelists, and acceptance and similarities of ice creams with encapsulated bacteria and free bacteria were investigated.

The results indicated that at the end of the 3 month storage at -18°C, both encapsulated *L.acidophilus* ATCC 4356 and free bacteria survived in ice creams whereas their numbers decreased similarly. Results showed that encapsulation process during storage had an insignificant impact on the stability of *L.acidophilus* ATCC 4356 ($p>0.05$). On the other hand, during 90 days of storage, the numbers of both free and encapsulated *L. acidophilus* ATCC 4356 numbers did not reduce below 10^7 cob/g, which indicate that probiotics used may have the ability to survive at a desired level in the final product; therefore, this ice cream can be used as a probiotic dairy product because of the therapeutic and preservative properties of the bacteria. Sensory analysis showed that encapsulation has a significant level of effect upon texture and structure ($p<0.05$) and in terms of sensory acceptance, the difference between ice creams samples containing free and encapsulated bacteria was statistically significant ($p<0.05$). However, in terms of color, appearance, taste and odor, differences between ice cream samples containing free and encapsulated bacteria were insignificant ($p>0.05$).

2014, 57 pages

Keywords: Probiotic, encapsulation, *Lactobacillus acidophilus*, extrusion method, ice cream

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bilgi ve birikimleri ile beni yönlendiren, sadece akademik hayatta değil, sosyal hayatta da yol göstericiliğiyle örnek aldığım ve alacağım değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Selahattin SERT'e,

Önerileri ve bakış açısıyla her zaman ufukumuzu genişleten, bölümümüzde yaptığı çalışmalarla bizlere çok daha iyi çalışma imkânları hazırlayan Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Mükerrerem KAYA'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve önerilerini esirgemeyerek yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan, çalışmalarımın planlanması ve yürütülmesi süresince her türlü maddi ve manevi desteğini gördüğüm Utah State Üniversitesi Gıda Bilimleri Bölümünden Sayın Arş. Gör. Fatih ORTAKÇI'ya,

Yine çalışmalarım süresince her türlü ilgi ve yardımlarını gördüğüm, tecrübeleri ve emeği ile bana büyük destek olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mustafa GÜRSES ve Sayın Doç. Dr. Bülent ÇETİN'e,

Çalışmalarında bana yardımlarını hiç eksik etmeyen değerli arkadaşım Mehmet YÜKSEL'e,

Maddi ve manevi desteklerini sürekli hissettiğim sevgili aileme ve çalışmalarım süresince her zaman beni destekleyen çok değerli eşime en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Sedat SEDEFOĞLU

Ağustos, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Dondurma.....	31
3.1.2. Probiyotik bakteri suşları.....	31
3.1.3. Besiyerleri, dilüsyon sıvıları ve çözeltiler	31
3.1.4. Diğer kimyasal maddeler.....	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Deneme planı.....	32
3.2.2. Probiyotik suş ve geliştirilmesi	32
3.2.3. Probiyotik bakterilerin aljinat içerisine mikroenkapsülasyonu	33
3.2.4. Mikrokapsüllerin boyutlarının belirlenmesi	34
3.2.5. Mikrokapsül içerisindeki probiyotik bakteri düzeyinin belirlenmesi.....	35
3.2.6. Mikroenkapsüle ve serbest bakterileri içeren dondurmaların depolanması	35
3.2.7. Depolama periyodu boyunca dondurma örneklerinden <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın sayımı.....	36
3.2.8. Dondurma örneklerinde duyu analizi.....	36
3.2.9. İstatistiksel analizler	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	38
4.1. Mikrokapsüllerin Boyutlarının Belirlenmesi.....	38
4.2. Serbest ve Enkapsüle <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın Depolama Süresince Dondurmadaki Gelişimi	38

4.3. Duyusal Analiz	45
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR	53
EKLER.....	57
EK 1.....	57
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	American Type Culture Collection
B.	Bifidobacterium
Ca	Kalsiyum
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
dak	Dakika
g	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
IDF	International Dairy Federation
KO	Kareler Ortalaması
kob/g	Koloni Oluşturan Birim/Gram
L.	Lactobacillus
log	Logaritma
M	Molarite
m.o.	Mikroorganizma
ml	Mililitre
mm	Milimetre
N	Normalite
Na ₂ HPO ₄	Disodium hidrojen fosfat
NaH ₂ PO ₄	Monosodium dihidrojen fosfat
rpm	Dakikadaki devir sayısı
S.	Streptococcus
SD	Serbestlik Derecesi
sp	Species (tür)
subsp	Subspecies (suş)
TPS	Tamponlanmış Peptonlu Su
~	Yaklaşık olarak
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ekstrüzyon ve Emülsiyon teknikleriyle bakterilerin enkapsülasyonuna ait akış diyagramı	17
Şekil 3.1. Kalsiyum-aljinat mikrokürelerinin görünümü.....	34
Şekil 4.1. Deneme dondurmalarında <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın canlılık oranı üzerine depolama süresi x serbest/enkapsüle form interaksiyonunun etkisi	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kabul edilen mikroorganizmalar	3
Çizelge 1.2. Probiyotiklerin Sağlığa Yararları.....	6
Çizelge 1.3. Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon amacıyla kullanılan uygun kaplama materyalleri.....	12
Çizelge 1.4. Ekstrüzyon ve emülsiyon tekniklerinin olumlu ve olumsuz özellikleri	15
Çizelge 4.1. Serbest ve mikroenkapsüle edilmiş <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 içeren dondurmalarda depolama periyodunda yapılan sayımlar (log kob/g)	39
Çizelge 4.2. Deneme dondurma örneklerine ait depolama periyodunda elde edilen <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 sayıları (log kob/g)	39
Çizelge 4.3. Deneme dondurma örneklerine ait depolama periyodunda elde edilen <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 oranları (%)	40
Çizelge 4.4. Serbest ve enkapsüle edilmiş bakterileri içeren dondurmaların depolanmasında <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nıncanlı kalma oranlarına (%) ait varyans analiz sonuçları.....	40
Çizelge 4.5. Dondurmaların depolanmaları sırasında belirlenen serbest ve enkapsüle <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nıncanlılık oranlarına (%) ait ortalamaların One Way ANOVA varyans analizi	41
Çizelge 4.6. Serbest ve enkapsüle <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın canlı kalabilme oranları arasındaki One Way ANOVA varyans analizi.....	42
Çizelge 4.7. Depolama periyodunda belirlenen canlı <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 oranlarına ait ortalamaların One Way ANOVA varyans analizi	42
Çizelge 4.8. Depolama periyodunda belirlenen canlı <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 oranlarına ait ortalamaların Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	43
Çizelge 4.9. Depolama periyodunda belirlenen canlı <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 oranlarına ait ortalamaların Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	43
Çizelge 4.10. Serbest ve enkapsüle <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 içeren dondurmalara ait duyu analizi sonuçları	45
Çizelge 4.11. Serbest ve enkapsüle <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 içeren dondurmaların duyu analizi puanlarına ait varyans analiz sonuçları.....	46

Çizelge 4.12. Deneme dondurma örneklerinin yapı ve kıvam özelliklerine ait duyusal değerlendirme puan ortalamalarının One Way ANOVA varyans analizi sonuçları	46
Çizelge 4.13. Dondurma örneklerinin ortalama yapı ve kıvam değerlendirme puanları	47
Çizelge 4.14. Deneme dondurma örneklerinin toplam kabul edilebilirlik özelliklerine ait duyusal değerlendirme puan ortalamalarının One Way ANOVA varyans analizi sonuçları.....	47
Çizelge 4.15. Dondurma örneklerinin ortalama toplam kabul edilebilirlik değerlendirme puanları	48

1. GİRİŞ

Son yıllarda probiyotik ve prebiyotik terimleri sıkça işitilmeye başlanmış olup, bu konu bilim adamlarının da ilgisini daha çok çekmeye başlamıştır. Özellikle günümüzde patojenik bakterilerde artan antibiyotik direnci ve tüketicilerin ilaçlar yerine doğal ürünleri talep etmeleri, probiyotiklerle daha fazla ilgilenilmesini sağlamıştır.

Probiyotikler, yeterli miktarda verildiğinde, konakçıda sağlığa yararlı etki yapan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde birçok kaynaktan probiyotik bakterileri almaktayız. Bunların başlıcaları fermente besin maddeleri (fermente süt, yoğurt, peynir, fermente sebzeler, turşu vs.), insan ağız florası, intestinal orijinli ve paketlenmiş veya kapsüllenmiş tedavi edici ürünlerdir. Probiyotiklerin konakçıdaki etkileri, bağırsak pH'sını değiştirmek, antimikrobiyal ürünler üreterek patojen bakterilerin üremesini inhibe etmek, bağlanma bölgeleri ve besin maddeleri için patojen bakterilerle yarışmak, immunmodulator hücreleri uyarmak olarak sayılabilir (Kaleli 2007).

Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, bağırsak florasının düzensizliğiyle ortaya çıkan gastrointestinal sistemdeki (GİS) bozukluklara dayanarak yapılmaya başlanmıştır (Salminen *et al.* 1999). Sağlıklı bireylerde “yararlı” ve “zararlı” mikroorganizmalar denge halinde bulunmaktadır. Antibiyotik kullanımı, hastalık, yaşlılık, stres ve enfeksiyon gibi faktörler, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler bu dengeyi bozarak intestinal ekosistemi direkt veya dolaylı olarak etkileyebilmekte ve çeşitli enfeksiyonlara, immünoenflamatuar ve otoimmün hastalıklara olan yatkınlığın artmasına sebep olmaktadır (Çakır ve Çakmakçı 2004; Coşkun 2005). Örneğin; fırsatçı patojenler buldukları ortamda dominant duruma geçerek bağırsak, vajina, böbrek gibi önemli organlarda enfeksiyonlara neden olurlar. Bunun sonucunda özellikle antibiyotiklere oldukça duyarlı olan laktik asit bakterilerinin sayısı azaldığından bağırsak pH'sı değişmekte, buna bağlı olarak da ortama patojen mikroorganizmalar

hâkim olmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar probiyotik mikroorganizmaların bu dengeyi yeniden sağlayarak sağlığı olumlu yönde etkilediğini göstermektedir (Coşkun 2005).

Probiyotik kelimesi Yunanca'da 'probias' yani yaşam için olan anlamına gelmektedir. Probiyotiklerin tarihi insanlık tarihi ile başlamış ve bilinen fermente süt ürünleri, özellikle çocukların ve nekahat devresindeki hastaların tedavisinde kullanılmıştır. Yoğurt, peynir, kefir gibi fermente ürünleri kullananlarda bazı enfeksiyon hastalıklarının daha az görüldüğüne ilişkin gözlemler, bilim adamlarını tarihsel süreç içerisinde canlı mikroorganizmalar ile çalışmalar yapmaya yönlendirmiştir. Laktik asit bakterilerinin kullanımının konaktaki etkilerini araştıran Ilja Metchnikoff, probiyotik kavramını bilim dünyasına sunarak, bu alanda yaptığı araştırmalar sonucunda 1908 yılı Nobel ödülünü kazanmıştır. Metchnikoff, intestinal florada yüksek sayıda laktobasil bulunmasının insan sağlığı ve ömrü açısından önemli olduğunu bulmuştur. Aynı dönemde Tissier, bifidobakterlerin anne sütü ile beslenen bebeklerin bağırsak florasında baskın bir mikrobiyal flora olduğunu göstermiş ve bebeklerde görülen ishallerin yüksek dozda bifidobakter verilerek tedavi edilebileceğini iddia etmiştir (Gionchetti *et al.* 2000).

Probiyotik kelimesi bugün kullanıldığı anlamı ile ilk kez 1974 yılında Parker tarafından, hayvan yemlerinde yer alan ve konakçının intestinal mikroflora dengesinin gelişmesini teşvik eden maddeleri ve organizmaları tanımlamak için kullanılmıştır. Fakat bu tanımlama antibiyotikleri de kapsamaktadır (Salminen *et al.* 1999). 1989 yılında ise Fuller probiyotikleri "konakçının intestinal mikroflorasının gelişimini teşvik eden canlı mikrobiyal katkı maddeleri" olarak yeniden tanımlamıştır. Bu tanımlama Huis in't Veld tarafından, insanların veya hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketilmeleri sonucunda ağızda, gastrointestinal sistemde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığında iyileşmeye neden olan tek veya karışık canlı mikroorganizma kültürleri şeklinde genişletilmiştir (Klaenhammer and Kullen 1999).

Fermente süt ürünlerinin üretiminde yüzyıllardır kullanılmış olan bakteri türleri çoğunlukla probiyotik *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* suşlarından oluşmaktadır. Çizelge 1.1'de yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalar gösterilmektedir. Farklı gruplara ait birçok mikroorganizmalar (maya gibi) probiyotik olarak kullanılsa da, özellikle laktobasiller ve bifidobakteriler probiyotik olarak kullanılan bakterilerin başında gelmektedir (Heyman and Ménard 2002).

Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kabul edilen mikroorganizmalar (Holzapfel *et al.* 2001)

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Bifidobacterium</i> türleri	Diğer laktik asit bakterileri	Laktik asit olmayan m.o.'lar
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ³ , <i>L. gallinarum</i> ¹ , <i>L. gasseri</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> ⁴ , <i>B. longum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹ , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ³ , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> ³ , <i>Sporolactobacillus inulinus</i> ¹ , <i>Streptococcus thermophilus</i> ³	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> ^{1,2} , <i>Escherichia coli</i> nissle suşu, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^{1,2} , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ² , <i>Saccharomyces boulardii</i> ²

¹ Hayvan beslenmesinde uygulanır.

² Farmasötik preparatlar ağırlıklı olarak uygulanır.

³ Probiyotik olduğuna dair yeterli bilgi mevcut değildir.

⁴ *B. animalis* ile eşanlamlı

Probiyotiklerin, bulunduğu konakçıdaki diğer mikroorganizmalara karşı güçlü bir etkileri vardır ve konakçıya yararları olduğu kesin olarak kabul edilmiştir. Ancak bir mikroorganizmanın probiyotik olabilmesi için belirli kriterlere sahip olması gerekmektedir. Bu kriterler;

- * İnsanların kullanımına yönelik hazırlanan ürünlerde kullanılan mikroorganizmalar, gelişmiş teknikler kullanılarak tanımlanmış güvenilir suşlar olmalıdır, yan etki oluşturmamalıdır. Örneğin bağırsakta kanamaya neden olmamalı veya bağırsak doğal geçirgenliğini bozmamalıdır.
- * Önemli metabolik aktivitelere sahip olmalıdır (vitamin sentezleme, disakkaridaz ve laktaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu gibi)
- * Toksik metabolitler üretmemeli, genetik açıdan stabil olmalıdır.
- * Mide-bağırsak sisteminde probiyotik etkinin oluşabilmesi için kullanılan suşlar mide asitliğine ve safra tuzlarına karşı dirençli olmalı, zor koşullarda da canlılığını sürdürebilmelidir. Bu durum, özellikle ağızdan yapılan uygulamalarda mikroorganizmanın canlı kalması, metabolik aktivitesini devam ettirebilmesi ve tutunabilmesi açısından önemlidir.
- * Patojenlerle yarışmalı, rekabet sonucunda probiyotik suşların bağırsak epiteline patojenlerden önce tutunabilmesi veya agregasyon oluşturabilmesi gerekmektedir.
- * Kullanılan suşun teknolojik özellikleri probiyotik ürün üretimine uygun olmalı, ürün içerisinde uzun süre canlılığını koruyabilmeli, üründe istenmeyen oluşumlara neden olacak maddeler üretmemelidir. Bunun yanı sıra ürettiği bazı antimikrobiyal metabolitlerle ortamdaki patojen veya kontaminant bakterileri inhibe edebilmelidir.
- * Bununla birlikte probiyotik mikroorganizmaların beklenen faydalı etkiyi sağlayabilmeleri için, 10^6 - 10^7 kob/ml veya daha fazla sayıda vücuda alınmaları ve içinde buldukları gıdaların üretimi ve raf ömrü süresince canlı kalabilmeleri gerekmektedir (Gismondo and Drago 1999; Yılsay ve Kurdal 2000; Talwalkar *et al.* 2001; Çakir 2003; Karthikeyan *et al.* 2014).

Probiyotiklerin nasıl etki ettiğini anlamak için gastrointestinal sistemin mikrobiyolojisi, fizyolojisi ve sindirim işlemi hakkında bilgi sahibi olmak gerekir. Doğumda bebeğin bağırsakları sterildir, ancak doğumdan hemen sonra çevrede bulunan mikroorganizmalar ile hızlı bir şekilde kolonize olur. Florayı oluşturacak bakterilerin başlıca kaynakları anne doğum kanalında bulunan mikroorganizmalar ile bebeğin yakın çevresinde ve bu çevrede temas ettiği kişilerde olan mikroorganizmalardır. Doğum şekli, hijyen, antibiyotik ve diğer bazı ilaçların kullanımı da gastrointestinal sistemde

kolonizasyonu etkiler. Doğum kanalından geçmediklerinden sezaryenle doğan bebeklerde flora gelişimi geç olur ve daha çok çevreden alınan mikroorganizmaları içerir. Bu nedenle de normal flora bakterilerinin kazanılması güçtür, dolayısıyla sezaryenle doğan bebekler gastrointestinal ve immünolojik bozukluklara daha yatkındırlar (Coşkun 2006). Anne sütüyle beslenen bebeklerde *Bifidobacterium*'lar hakim olurken, mama ile beslenenlerde *Enterobacteriaceae*, *Bacterioides*, *Clostridium*'lar, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus*'ları içeren kompleks bakteriyel flora hakimdir (Limdi *et al.* 2006).

Gastrointestinal sistem vücudun içi ile dışı arasında köprüdür. Son zamanlardaki araştırmalar bağırsak mikroflorası ile konak arasında karşılıklı etkileşme olduğunu göstermiştir. Özellikle bağırsak bariyerini sağlamlaştırmada ve epiteliyal değişimde bakterilerin önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. İntestinal mikrofloranın konakçı için faydaları, kolona ulaşan karbonhidrat ve proteinlerin fermentasyonu ile enerji eldesi, vitamin sentezi (vitamin K ve B), kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi, intestinal lümen pH'sını düşürerek antipatojenik etki, mukozal permeabiliteyi azaltarak mukozal bariyerin sürdürülmesi, mukus üretiminin artması, bağırsak hücreleri arasındaki bağlantıların güçlendirilmesi, bağırsak mukoza reseptörlerine bağlanmada patojen bakterilerle yarışarak onların bağlanmasını engelleme, konakçı immünitesini uyarma olarak sıralanabilir. Tüm bu koruyucu sistemler "kolonizasyon direnci" olarak adlandırılır (Kurt 2012).

Probiyotiklerin etki mekanizmaları için özellikle üç mekanizma önerilmektedir: (Yağcı 2007).

1) Patojen ve zararlı bakterilerin sayılarını azaltmak

- a. Antimikrobiyal bileşikler üretmeleri
- b. Besin elementleri için rekabet etmeleri
- c. Kolonizasyon bölgeleri için rekabet etmeleri

2) Mikrobiyal metabolizmayı (enzimatik aktiviteyi) değiştirmek

- Sindirim sistemini düzenleyen enzimlerin üretimi (örneğin; laktaz)
- Amonyak, amin veya toksik enzimlerin üretiminin azalması
- Bağırsak duvarının fonksiyonlarının iyileştirilmesi

3) Bağışıklık sistemini iyileştirmek

- Antikor düzeyinin artması
- Makrofaj aktivitesinin artması.

Çizelge 1.2’de probiyotiklerin sağlık açısından yararları özet olarak sunulmuştur.

Çizelge 1.2. Probiyotiklerin Sağlığa Yararları (Gorbach 2002)

Kanıtlanmış faydalar
Akut rotavirüs ishali ve gastroenteridisin önleme ve tedavisinde Antibiyotik ile ilişkili bağırsak sistem yan etkilerinin ve ishalin tedavisinde
Önemli delilleri sunulmuş fakat ilave kanıta ihtiyaç duyulanlar
Gıda alerjisi ve atopik egzema <i>Clostridium difficile</i> enfeksiyonlarının tedavi edilmesi ve önlenmesi Günlük bakım merkezlerindeki çocuklarda oluşabilen akut solunum yolu enfeksiyonlarını önlemek Vajinit (vajina iltihabı) tedavisi ve önlenmesi (Candida ve bakteriyel vajinosis) Seyahat diyaresinin önlenmesi
Umut verici alanlarda devam eden araştırmalar
Chron hastalığı, ülseratif kolit ve poşutis Alerjik rahatsızlıkların önlenmesi (örneğin astım) Sistik fibröz (bağırsak rahatsızlığı belirtileri ve solunum olayları) Çocuklarda diş çürümelerinin önlenmesi Kabızlığın hafifletilmesi Hassas bağırsak sendromu tedavisinde Yoğun bakım ünitelerinde fırsatçı patojenlerin kolonizasyonunu önlemek Bağışıklık sistemine yardımcı olmak üzere oral aşıların güçlendirilmesinde <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonlarının önlenmesi

Çizelge 1.2. (devam)

Gelecekte araştırmaların yapılacağı alanlar
Kolon kanserinin önlenmesi (sadece hayvanlardan elde edilen verilerle)
Mesane kanseri tedavisi
Romatoid artrit (eklem iltihabının) tedavisi
Cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve HIV
Genetiği değiştirilmiş suşların elde edilmesi (örneğin vitaminler, insülin, lisin, bakteriyal ya da viral immunojenleri üreten genler eklemek)

Daha önce de ifade edildiği üzere, istenen probiyotik özelliklere sahip ve klinik olarak etkisi kanıtlanmış suşlar genellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait türlerdir (Karthikeyan *et al.* 2014). *L. acidophilus* probiyotik bakteri olarak gıda formülasyonlarında oldukça yaygın olarak kullanılan *Lactobacillus* türlerinden bir tanesidir. *L. acidophilus*, karbonhidrat metabolizmaları sonucunda başlıca son ürün olarak laktik asit oluşturan, çoğunlukla zorunlu homofermentatif bir bakteridir. Ancak birkaç fakültatif heterofermentatif suşları vardır. İnsan ve hayvanların doğal gastrointestinal sistem içerisinde, insan ağız florası ve vajinada ve kefir gibi bazı geleneksel fermente süt ürünlerinde yaygın olarak bulunur. Uçları yuvarlak, çubuk şekilli, Gram-pozitif ve mikroaerofilik bakterilerdir. Hareketsizdirler ve spor oluşturmazlar. Gelişme ortamlarında tek, çift veya kısa zincirler halinde bulunup boyutları 0,6-0,9 µm genişliğinde 1,5-6,0 µm uzunluğundadır. Mikroaerofilik bakteriler olmaları nedeniyle katı besiyeri üzerinde yüzey gelişimleri genellikle anaerobik ortam ya da oksijen basıncı düşürülmüş ortam sağlanarak geliştirilir. Enerji ve karbon kaynağı olarak karbohidratlar dışında nükleotidleri, amino asitleri ve vitaminleri de kullanırlar. 45°C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilmelerine rağmen optimum gelişme sıcaklığı 35-40°C arasındadır. Optimum gelişme pH aralığı 5.5-6.0'dır. Düşük amino asit ve peptid içeriğinden dolayı, soya sütü veya süt içerisinde yavaş gelişim gösterirler. Ayrıca, birçok *L. acidophilus* suşunun düşük pH nedeniyle fermente süt içinde gelişimleri iyi değildir (Donkor 2007).

Probiyotik mikroorganizmaların kullanımı özellikle süt ve süt ürünleri olmak üzere çeşitli fermente gıda ürünlerinde oldukça yaygındır. Bu mikroorganizmaları içeren

yiyecek ve içeceklerin tüketimi de dünya çapında büyüyen bir eğilim göstermektedir. Her ne kadar fermente süt ürünleri, probiyotiklerin insanlara taşınmasında uygun ortam sağlayabilen gıda maddeleri olarak bilinse de diğer gıdaların da probiyotik taşıyıcıları olarak potansiyelleri incelenmiştir. Probiyotik gıdalar arasında tüketiciler tarafından en çok tanınan ürün yoğurt olmakla birlikte mayonez, soya sütü, et, bebek mamaları, dondurma, meyve suları ve bitkisel içecekler gibi ürünlerin formülasyonlarında da probiyotik mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Granato *et al.* 2010). Bununla birlikte genişleyen probiyotik ürün sınıfı içinde, çok az sayıda araştırmacı ve süt işletmesi, yüksek sayıda probiyotik kültür içeren dondurma çeşitlerinin üretimi konusunda çalışmışlardır.

Dondurma, besin değerinin yüksek olması ve sindiriminin kolaylığı yanında sevilen tat ve aroması ile ferahlatıcı niteliği sayesinde tüketimi oldukça fazla olan ve toplumun hemen her kesimi tarafından sevilerek tüketilen bir süt ürünüdür. Ayrıca, dondurmanın yoğurt gibi probiyotik bakterilerin canlılıklarını ve gelişimlerini olumsuz etkileyecek düşük pH'ya sahip olmaması da bu ürünü probiyotik bakterilerin kullanımı için cazip hale getirmektedir. Probiyotik bakterilerin canlılık düzeylerinin dondurmada yüksek oranda korunduğu ve bu nedenle de dondurma gibi soğukta muhafaza edilen ve soğuk tüketilen bir süt ürününün probiyotik bakterilerin vücuda canlı olarak alımı için uygun bir araç olabileceğine işaret edilmektedir (Hekmat and McMahon 1992; Jurkiewicz *et al.* 2011). Ancak dondurma işleminin canlı bakteri sayısında 0,5 - 1 log birimlik kayba neden olabileceği de belirtilmektedir. Ayrıca, depolama sırasındaki (6-12 aylık) sıcaklık dalgalanmalarının üründe buz kristallerinin oluşmasına neden olduğu ve bunun da bakteri hücrelerinin canlılıklarında azalmalar meydana gelmesine neden olduğu belirtilmektedir (Davidson *et al.* 2000). Bununla birlikte dondurma miksinin karşılaştırılması esnasında uygulanan mekanik etkinin bakteri hücrelerinde hasara neden olabileceğine de değinilmektedir. Aynı şekilde dondurma üretimi sırasında dondurma karışımına istenen overrun değerini vermek amacıyla belli miktarda uygulanan havanın, ürünlerdeki oksijen düzeyini artırdığı ve bu nedenle anaerobik ve mikroaerofilik karakterdeki probiyotik bakteriler için inhibe edici etki oluşturabileceği de bildirilmektedir (Şener 2009). Özellikle Bifidobakteriler, anaerobik bir bakteri türü

olmaları nedeniyle yüksek oksijen içeriğinde, gelişimleri ve canlılıkları etkilenebilmektedir (Shah 2000).

Yakın zamana kadar tüketiciler, sınırlı dondurma çeşitleri arasında tercih yapmak zorunda iken, endüstriyel dondurmanın gelişmesiyle birlikte farklı tatlarda ürünler raflarda yerini almıştır (Şimşek vd 2006). Gerçek manada dondurma üretimi tüm dünya için yeni bir kavram olmanın yanında, kısa zamanda çok hızlı bir gelişme göstermiştir. Besleyici, lezzetli, keyif ve mutluluk veren bir ürün olan dondurmanın bu denli hızlı büyümesinde dondurma endüstrisinin hijyenik proses anlayışı, yüksek kalite bilinci ve tüketici beklentilerine göre hizmet etme anlayışı ile çalışması ve buna bağlı olarak her geçen gün farklı görünüş, tat, şekil ve yapıdaki ürünleri tüketime sunmasının etkisi büyüktür (Kaçar ve Şahan 2004)

Probiyotik mikroorganizmaları içeren gıdaların sağlığa yararlı etkilerinin ortaya çıkması ve gelişen dünyada bu tarz gıdaların popülaritesinin ve kabul edilebilirliğinin insanların bilinçlenmelerine bağlı olarak artmasıyla birlikte gıda endüstrisinin de probiyotiklere olan ilgisi oldukça hızlı bir artış göstermektedir. Ancak probiyotik mikroorganizma içeren gıdaların geliştirilmesini ve üretimini kısıtlayan bir takım engeller vardır (Anal and Singh 2007). Bunlar; gıdanın işlenmesinden kaynaklanan engeller (yüksek sıcaklık, kurutma, dondurma, yüksek basınç, asidik veya alkali ortam), tüketiminden sonra metabolizmadan kaynaklanan engeller (sindirim sistemi enzimleri, yüksek asidik ortam ve safra tuzları) ve mikroorganizmanın kendisinden kaynaklanan engellerdir (anaerobik gelişme koşulları ve zengin besin maddeleri gereksinimi, oksijen, sıcaklık, pH, inhibitörler ve rekabetçi mikroorganizmalardan kaynaklanan stres koşulları) (Desmond *et al.* 2004). Günümüzde probiyotik bakterilerin canlı kalmasının önündeki bu engelleri ortadan kaldırmak veya en aza indirmek amacıyla, uygun bakteri suşu seçimi, gıda üretim proseslerinin modifikasyonu, depolama koşullarının iyileştirilmesi ve kontrol edilmesi ile uygun ambalaj seçimi gibi bazı önlemler alınmakla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda mikroenkapsülasyon tekniği üzerinde durulan bir yöntem haline gelmiş ve büyük bir önem kazanmıştır.

Mikroenkapsülasyon, hücre hasarını ve hücre kaybını azaltmak amacıyla hücrelerin uygun bir taşıyıcı destek materyali içine hapsedilme işlemidir (Krasaekoopt *et al.* 2003). Amaç, 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 (Çakır 2006).

Mikroenkapsülasyon tekniği, gıda endüstrisinde çok farklı amaçlar için kullanılabilir. Bu amaçlar;

- Kapsülleme; kaplanacak ana materyalin dış etkenlere karşı korunması (nem, sıcaklık, hava ve ışık gibi),
- Buharlaştırma yoluyla aroma maddelerinin dış ortama transfer olma hızının engellenmesi-azaltılması ve böylece fiziksel özelliklerin daha iyi korunmasının sağlanması,
- Kapanacak materyalin tat ve kokusunu maskeleyen
- Kapanacak materyalin küçük miktarlarda kullanımının gerekli olduğu durumlarda seyreltilmesi ve ilave edileceği malzemede üniform bir dağılım elde edilebilmesi,
- Ürünün zamanla veya belli bir noktada yavaş yavaş çalışmasının sağlanması,
- Kapanacak maddeler arasında meydana gelebilecek arzu edilmeyen etkileşimlerin önlenmesi ve karışım içinde birbirleriyle reaksiyon halinde olan bileşenler için ayrı ayrı kullanılabilmesi olarak ifade edilmektedir (Desai and Park 2005).

Mikroenkapsülasyon amacıyla, püskürterek soğutma, püskürterek dondurma veya püskürterek kurutma, ekstrüzyon kaplama, akışkan yataklı kaplama, lipozom tutuklama, liyofilizasyon, koazervasyon/faz ayrımı, santrifüj ile suyun uzaklaştırılması, ko-kristalizasyon ve inklüzyon kompleksi oluşturma (inclusion complexation) gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bu yöntemler ayrı ayrı veya birlikte kullanılabilir gibi çeşitli modifikasyonlarla da kullanılabilir (Poshadri and Kuna 2010). Bu yöntemler içerisinde kalsiyum-aljinat jel kapsülü oluşumu esasına dayalı ekstrüzyon

kaplama, günümüzde en çok araştırılan mikroenkapsülasyon tekniğidir. Gıdalar için uygun kaplama sistemleri tatlandırıcılar, baharatlar ve vitaminler gibi bazı ürünlerin saklanması için formüle edilmiştir. Söz konusu kapsülasyon işlemlerinde jelatin, karragenan, nişasta, selüloz türevleri, pektin, akasya zamkı, yağlar, yağ asitleri, balmumu, polietilen glikol ve peyniraltı suyu gibi gıdaların bileşiminde güvenle kullanılabilen maddeler de kaplama materyali olarak kullanılabilir (Çakır 2006; Poshadri and Kuna 2010).

Kaplama malzemesinin bileşimi son ürünün fonksiyonel özelliklerinin temel belirleyicisidir. İdeal bir kaplama malzemesi, aşağıdaki özellikleri sergilemelidir:

1. Yüksek konsantrasyonda reolojik özellikleri iyi olmalı ve kapsülleme sırasında kolay işlenebilir olmalıdır.
2. Aktif maddeyi disperse veya emülsiyon haline getirme yeteneği olmalı, emülsiyon stabilitesi yüksek olmalıdır.
3. Kapsüllenecek madde ile gerek işleme sırasında gerekse de uzun süreli depolama süresince reaksiyona girmemelidir.
4. İşleme veya depolama sırasında yapısı içerisindeki etken malzemeyi tutma ve sızdırmama yeteneğinde olmalıdır.
5. Gıda endüstrisinde kullanılan çözücüler içerisinde iyi bir şekilde çözünmelidir.
6. Ucuz olmalı, gıdalarda kullanıma uygun olmalıdır.

Tek bir kaplama malzemesinin yukarıda sıralanan tüm kriterleri karşılaması oldukça zordur. Bu yüzden kaplama malzemeleri uygulamada kullanılırken oksijen tutucu maddeler, antioksidanlar, şelat ajanları, yüzey aktif maddeler ve bunların kombinasyonlarıyla birlikte kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bunların özelliklerini değiştirmek üzere varolan kaplama malzemelerinin kimyasal modifikasyonları da kabul edilmektedir (modifiye selüloz gibi). Bu modifiye edilmiş kaplama malzemeleri tek başına kullanılan bir kaplama malzemelerine göre daha iyi fiziksel ve mekanik özellikler göstermektedir (Desai and Park 2005).

Çizelge 1.3'te gıda endüstrisinde enkapsülasyon amacıyla kullanılan kaplama materyallerine bazı örnekler gösterilmektedir (Wandrey *et al.* 2009).

Çizelge 1.3. Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon amacıyla kullanılan uygun kaplama materyalleri (Wandrey *et al.* 2009)

Kaynak	Karbonhidrat polimerleri	Proteinler	Yağlar/Lipidler
Bitki kökenliler	Nişasta ve türevleri, selüloz ve türevleri, akasya zamkı, gum karaya, bitki özleri (galaktomannanlar, çözümlü soya), polisakkaritler	Gluten (mısır), izolatlar (soya ve bezelye)	Yağ asitleri/alkoller Gliseritler, balmumu, fosfolipitler
Deniz kökenliler	Karragenan, aljinat	-	-
Mikrobiyal/Hayvan kökenliler	Ksantan gam, jellan gam, dekstran, kitosan	Kazeinler, serum proteinleri (albumin)	Yağ asitleri/alkoller Gliseritler, balmumu, fosfolipitler

Aljinatlar kahverengi deniz yosununun hücre duvarından elde edilen, L-guluronik asit ve D-mannuronik asit olmak üzere iki monomerik birimlerden oluşan hidrofilik karakterli lineer bir kopolimerdir. Aljinik asit, aljinatların serbest formu olup, ticari üretiminde ara üründür. Aljinik asit sınırlı dayanıklılığa sahiptir ve su tutma kapasitesi yüksek, suda çözünme yeteneği olan Na, K, NH₄, Mg ve Ca-aljinat tuzları şeklinde ticari olarak satılan formlara dönüşebilir (ISP 2006; İşleyen 2010). Sodyum, potasyum ve amonyum tuzları suda iyi, kalsiyum tuzu ise suda az çözünür. Aljinatların tamamı jel oluşturamazlar fakat soğuk suda, kalsiyum iyonlarının varlığında ortamda geri dönüşümsüz jel oluşturabilmektedirler (Şener 2009).

Aljinatlar biyoteknolojik uygulamalarda tutuklama ve kaplama materyali olarak kullanımının dışında gıda sektöründe de yaygın olarak kullanılmaktadır. Dondurma

üretiminde uzun yıllardır kullanılan aljinat bazlı stabilizatörler, kristal oluşumunu düzenleyerek pürüzsüz bir yapı sağlamaktadır. Bu stabilizatörlerin birçoğu polifosfatlarla işleme tabi tutulmuş aljinat veya propilen glikol aljinattır. Dondurmanın dışında eritme peyniri, ekşi krema, çikolatalı süt gibi süt ürünlerinde kıvam arttırıcı olarak; pastacılıkta, krema veya sosların stabilizasyonunda, gazsız içeceklerde (propilen glikol aljinat), tatlılarda, salata soslarında ve konserve ürünlerde de aljinatlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Öte yandan aljinatın film oluşturma ve su tutma özelliğinden faydalanılarak krema ve sosların ambalaja yapışması, çatlaması ve depolama sırasında kuruması engellenebilmektedir (Göksungur ve Güvenç 2002). Bununla birlikte iyi bir oksijen geçiş engeli oluşturmaları nedeniyle gıdalarda yağ oksidasyonunu geciktirerek aroma, yapı ve hamur yapışmasını iyileştirici etkisinden de yararlanılmaktadır (Şener 2009).

Aljinatlar mikrobiyal hücrelerin mikroenkapsülasyonunda başarıyla kullanılmaktadır. Aljinatın gerek tek başına gerekse de diğer kaplama materyalleriyle bir arada kullanıldığı birçok enkapsülasyon uygulamalarında hücrelerin canlılıklarının önemli seviyede daha iyi korunduğu bildirilmiştir (Sheu *et al.* 1993; Guerin *et al.* 2003; Chandramouli *et al.* 2004; Mandal *et al.* 2006; Muthukumarasamy and Holley 2006; Liserre *et al.* 2007; Tsen *et al.* 2007; Homayouni *et al.* 2008; Kim *et al.* 2008; Annan *et al.* 2008; Shafiei *et al.* 2012; Karthikeyan *et al.* 2014)

Aljinat kapsüllerinin mikroenkapsülasyon uygulamalarında yaygın olarak kullanılmasında sahip olduğu bazı avantajlar etkilidir. Bunlar; kolayca bakteri hücrelerinin etrafında jel matrisi oluşturmaları, vücut için toksik özellik taşıyamaması, gıda için güvenilir ve biyolojik açıdan uyumlu olması, ucuz olması, iyi performans gösterebilmesi için ılımlı proses koşullarına (sıcaklık gibi) gerek duymaması, kolay hazırlanabilir ve uygulanabilir olması, bağırsaklarda uygun bir şekilde çözünebilir ve tutuklanmış hücrelerin salınımına izin verebilir olmasıdır. Bu avantajlarının yanı sıra aljinatların kullanımını kısıtlayan bazı sebepler de söz konusudur. Bu sebepler; asidik çevre koşullarına karşı duyarlı olması ve laktik asit içeren ortamlarda mekanik

dayanımının zayıf oluşudur. Ayrıca aljinat jeli kalsiyum iyonları varlığında oluştuğundan, fosfatlar, laktatlar ve sitratlar gibi kalsiyum iyonunu absorbe eden tek değerli iyonlar veya şelat oluşturan ajanlara maruz kaldığında yapı bütünlüğünün bozulması, nemin ve diğer sıvıların nispeten hızlı difüzyonu ve bu sebeple olumsuz çevresel faktörlere karşı koruyucu özelliğinin azalması, zayıf ölçeklendirme özelliğinden dolayı gözenekli boncuk yüzeylerin oluşması ve endüstriyel uygulamalarda büyük ölçekli üretimlerde maliyetin kısmen de olsa yüksek oluşu aljinatların kullanımını kısıtlayan diğer sebepler olarak sıralanabilir (Mortazavian *et al.* 2007).

Daha önce de ifade edildiği üzere mikroenkapsülasyon amacıyla kullanılan yöntemler ekstrüzyon-emülsiyon, püskürterek soğutma, püskürterek dondurma veya püskürterek kurutma, akışkan yataklı kaplama, lipozom tutuklama, liyofilizasyon, koazervasyon/faz ayrımı, santrifüj ile suyun uzaklaştırılması, ko-kristalizasyon ve inklüzyon kompleksi oluşturma (inclusion complexation olarak sıralanmıştı).Püskürterek kurutma, nispeten ucuz bir yöntemdir ve büyük miktarlardaki çözeltiler bu teknikle işlenebileceği için tavsiye edilmiştir. Bununla birlikte laboratuvar ortamlarında daha kolay gerçekleştirildikleri için probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda ekstrüzyon (damlatma metodu) ve emülsiyon (ikili-faz sistemi) yöntemlerine daha çok başvurulmaktadır. Hem ekstrüzyon hem de emülsiyon yöntemi probiyotik bakterilerin canlılıklarını %80-95 oranında korumaktadır (Krasaekoopt *et al.* 2003; Mortazavian *et al.* 2007; Şener 2009).

Çizelge 1.4. Ekstrüzyon ve emülsiyon tekniklerinin olumlu ve olumsuz özellikleri (Krasaekoopt *et al.* 2003)

	Ekstrüzyon	Emülsiyon
Teknolojik fizibilite	Ölçeklendirilmesi zor	Ölçeklendirilmesi kolay
Maliyet	Düşük	Yüksek
Kolaylık	Kolay	Zor
Mikroorganizmaların canlı kalma durumları	%80-95	%80-95
Kapsül boyutları	2-5 mm	25 µm-2 mm

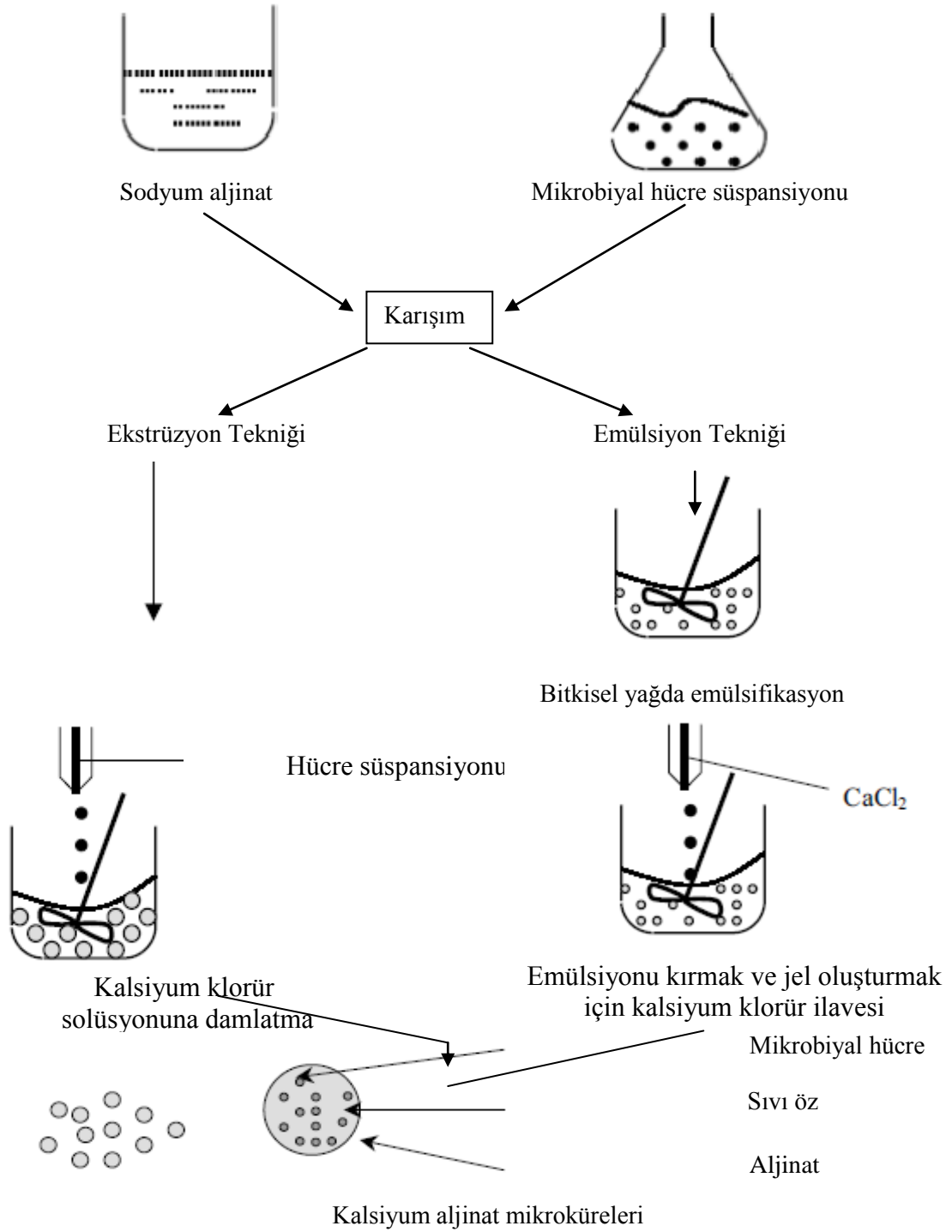
Ekstrüzyon yöntemi; hidrokolloid (aljinat gibi) kapsüllerin hazırlanmasında en eski ve en yaygın kullanılan bir yöntemdir. Ekstrüzyon yöntemi basit ve düşük maliyetli bir yöntem olmasının yanında genellikle bu yöntemde hücre yaralanması minimum düzeydedir ve probiyotik hücrelerin canlılığı nispeten yüksek oranda korunmaktadır. Biyouyumluluk ve esneklik bu yöntemin diğer bazı özelliklerindedir. Ancak bu yöntemin en önemli dezavantajı, fizibilite özelliklerinden dolayı yavaş mikrokapsül oluşumu ve bu yüzden büyük ölçekli üretim için fazla kullanılamaz olmasıdır. Diğer bir deyişle ölçeklendirilebilirliği zordur. Genellikle bu yöntemde oluşturulan boncukların çapı (2-5 mm) emülsiyon metodunda elde edilen boncuklardan daha büyüktür. Boncuk büyüklüğü ve şekli, iğnenin çapı, aljinat çözeltisinin yoğunluğu ve serbest düşme mesafesine bağlı olarak değişmektedir. Aljinat konsantrasyonu ve dolayısıyla viskozite arttıkça boncukların boyutu azalmaktadır (Krasaekoopt *et al.* 2003; Mortazavian *et al.* 2007).

Kalsiyum aljinat kullanılarak ekstrüzyon yöntemi ile enkapsülasyon metodunda boncukları oluşturmak için hücre süspansiyonu sodyum aljinat çözeltisi ile karıştırılır ve bu karışım çok değerlikli katyon (CaCl_2 şeklinde genellikle Ca^{+2}) ihtiva eden çözelti

içine şırınga iğnesi aracılığıyla damlatılır. Böylece iyonik olarak çapraz bağlanmış aljinat, 3 boyutlu kafes içerisinde hücreleri hapsederek aljinat jel küreleri oluşturur. (Krasaekoopt *et al.* 2003).

Emülsiyon yönteminde ise, az miktarda kültür-sodyum aljinat karışımı (kesikli faz), yüksek miktardaki soya fasulyesi yağı, ayçiçeği yağı, kanola yağı ya da mısır yağı gibi bir bitkisel yağa (kesiksiz-sürekli faz) damlalar şeklinde ilave edilerek karıştırılır. Karışım, su-yağ emülsiyonu oluşturmak üzere homojenize edilir. Daha sonra emülsiyonu kırmak ve kalsiyum aljinat jeli oluşturarak mikroorganizmaların bu jel içerisinde tutuklamak üzere CaCl_2 ilave edilir. Böylece suda çözünür polimer, yağ faz içinde küçük jel parçacıkları oluşturmak üzere çözünmez forma dönüşerek Ca-aljinat boncukları oluşur (sodyum iyonları kalsiyum iyonları ile çapraz bağlanma sonucu yer değiştirir). Boncuklar daha sonra filtreleme işlemi ile toplanır. Boncuk büyüklüğü karıştırma hızı ile kontrol edilir ve 25 μm ile 2 mm arasında değişebilmektedir. (Krasaekoopt *et al.* 2003). Bu yöntemde su ve yağ fazlarının yüzey gerilimini azaltmak ve böylece daha iyi emülsiyon oluşturmak amacıyla emülsifier kullanılarak, daha küçük çapa sahip boncukların oluşumu sağlanmaktadır. Bu amaçla %0.2'lik konsantrasyonda Tween-80 en iyi seçenek olarak tavsiye edilmiştir (Mortazavian *et al.* 2007).

Şekil 1.1'de bakterilerin emülsiyon ve ekstrüzyon teknikleri ile mikroenkapsülasyonunun akış diyagramı verilmiştir.



Şekil 1.1. Ekstrüzyon ve Emülsiyon teknikleriyle bakterilerin enkapsülasyonuna ait akış diyagramı (Krasaekoopt *et al.* 2003)

Bu tez çalışmasında probiyotik özellikleri bilinen ve bu özelliğinden en fazla yararlanan bakterilerden olan *L. acidophilus* ATCC 4356 suşu, enjektör (şırınga) kullanılarak ekstrüzyon yöntemi ile kaplanmıştır. Kaplama materyali olarak sodyum aljinat kullanılmış; enkapsüle ve serbest kültürler dondurmaya ilave edilerek -18°C'deki depolama stabiliteleri araştırılmıştır. Ayrıca enkapsüle edilen probiyotik bakteri hücreleri ve serbest bakteri hücrelerinin dondurmada kullanıldığında ürünün duyuşal özellikleri üzerine etkileri değerlendirilerek, aljinat içerisine enkapsüle edilen probiyotiklerin dondurma üretiminde kullanılabilirliğı tartışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Mikroenkapsülasyon tekniği ile ilgili olarak özellikle 1980'li yılların sonlarından itibaren yapılan araştırmalarda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Genel olarak bu çalışmaların neticesinde, özellikle peynir teknolojisi ile diğer süt ürünlerinde (yoğurt, dondurma) kalite kriterlerini ortaya koyan tat ve aroma maddelerinin belli düzeyde korunabilmeleri ve probiyotik bakterilerin gelişimleri için söz konusu tekniğin önemli bir konuma sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte mikroenkapsüle edilen hücrelerin serbest bakteri hücrelerine göre asit ve safraya daha dirençli oldukları, dondurma işlemlerinde ise süreye bağlı olarak farklılık arz ettiği gözlemlenmiştir.

Sheu *et al.* (1993) tarafından yapılan bir çalışmada, %3'lük kalsiyum aljinat tanecikleri içerisine tutuklanan *Lactobacillus bulgaricus* hücrelerinin dondurulmuş sütlü tatlılarda canlı kalma yetenekleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enkapsüle edilen hücrelerin canlılık oranları %90 iken, serbest hücrelerde bu oran %40 olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla canlı hücrelerdeki kayıp, kalsiyum aljinat taneleri içinde hücrelerin tutuklanmasıyla belirgin bir biçimde azalmıştır. Bununla birlikte %6 gliserol ilavesinin, tutuklamanın koruyucu etkisini daha da artırdığı tespit edilmiştir. Öte yandan çapı 30 µm'den büyük olan hücrelerin, ortalama 15 µm olanlara göre daha fazla canlı kaldıkları belirlenmiştir.

Sultana *et al.* (2000) aljinat-nişasta karışımı ile kapladıkları probiyotik kültürlerin gastrointestinal şartlardaki ve yoğurttaki canlılık düzeylerini incelemiştir. Araştırmacılar, kalsiyum aljinat ile enkapsülasyonda emülsiyon tekniğini uygulayarak kaplama materyali bileşiminde dirençli mısır nişastasını kullanmışlardır. 500 µm ve 150 µm çelik elekler kullanılarak elde edilen kapsüllerde bulunan *Lactobacillus acidophilus* 2409 bakterisinin gastrointestinal şartlarda pH 2.0'da 3 saat sonunda 5,0 log kob/ml, pH 3.0 ve pH 4.0'da ise 2 log kob/ml azaldığını, aynı bakterinin %1 safra tuzu konsantrasyonunda 6 saatlik süre sonunda ise 1,0 log kob/ml azaldığını tespit

etmişlerdir. Öte yandan *B. infantis* 1912 bakterisi gastrointestinal şartlarda pH 2.0'da 3 saat sonunda 3,0 log kob/ml azalmışken, pH 3.0 ve pH 4.0'da ve %1 safra tuzu konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte kaplamada dirençli nişasta ve gliserol ilavesinin nişasta ve aljinatın jelleşmesinde sinerjistik etki göstererek *L. casei* bakterisine donma sıcaklıklarında (-20°C) ilave koruma sağlamada yardımcı olabileceği fakat enkapsülasyon işleminin, yüksek asit ve safra tuzu koşullarında bakterilerin canlılığını korumada önemli bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada serbest ve enkapsüle kültürler yoğurda ilave edilmiş ve depolama süresince canlılığı incelenmiştir. 8 haftalık depolama periyodu sonunda enkapsüle bakterilerin canlılıklarında 0,5 log kob/g, serbest bakterilerde ise 1 log kob/g azalma olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla hem serbest hem de enkapsüle kültürlerin canlılığında önemli seviyede bir azalma olmadığı görülmüştür.

Guerin *et al.* (2003) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, probiyotik *Bifidobacterium bifidum* bakterileri aljinat, pektin ve peyniraltı suyu proteininden oluşan bir karışım jel ile kaplanarak serbest ve enkapsüle bakterilerin canlılıkları üzerinde yapay mide şartlarının ve safra tuzlarının etkisi incelenmiştir. Laboratuvar koşullarında yapılan deneme sonuçlarına göre enkapsüle hücreler yapay mide şartlarında (pH 2.5) 1 saatlik sürenin sonunda yaklaşık 1 log azalma gösterirken serbest hücreler 4.75 log birim azalmıştır. 2 saat sonunda ise serbest hücreler tamamen canlılıklarını kaybetmiş, enkapsüle hücreler ise yaklaşık 2 log birim azalarak canlılıklarını koruyabilmişlerdir. Araştırmacılar hücrelerin, membran kaplamalı protein-polisakkarit jel ile hücreleri kapsüllemenin probiyotik bakterilerin sindirim sisteminden geçişi sırasında canlılıklarını daha uzun süre muhafaza ettiklerini belirtmişlerdir.

Chandramouli *et al.* (2004) mikroenkapsülasyon işlem parametrelerinin etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, *L. acidophilus* CSCC 2400 bakterisini kalsiyum aljinat kullanılarak mikroenkapsüle etmiş ve yapay mide koşullarında (pH 2) ve yüksek safra konsantrasyonunda (%1.0 safra) canlılığını test etmişlerdir. Ayrıca farklı boyutlarda kapsül (200, 450, 1000 µm), farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat (%0.75, %1,

%1.5, %1.8 ve %2) ve farklı konsantrasyonlarda kalsiyum klorürün (0.1, 0.2, 1.0 M) kapsüllenmiş bakteri canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Laboratuvar sonuçlarına göre mikrokapsül içerisindeki hücrelerin canlılığı, kapsül boyutu ve jel konsantrasyonu arttıkça artmıştır. Enkapsülasyon sırasında hücre yoğunluğunun artması, yapay mide ortamında 3 saatlik inkübasyon sonrasında canlı bakteri sayısını da arttırmıştır. Sonuçta mikroenkapsüle edilen hücrelerin, serbest bakteri hücrelerine göre asit ve safraya daha dirençli oldukları gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile ayrıca, aljinatın probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu için uygun, güvenli ve koruyucu bir taşıyıcı araç olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir.

Picot and Lacroix (2004) tutuklama materyali olarak süt yağı ve denatüre peynir altı suyu proteinlerini kullanarak *Bifidobacterium breve* R070 (BB R070) ve *Bifidobacterium longum* R023 (BL R023) bakterilerini püskürterek kurutma yöntemi ile enkapsülasyon işlemine tabi tutmuşlardır. Araştırmacılar, serbest ve enkapsüle edilen suşları düşük pH'ya sahip yoğurt içerisinde 28 günlük depolamaya bırakmış ve ardından gastrointestinal şartlarda bekleterek depolama sırasındaki canlılıklarını ve in vitro şartlarda sindirime dayanıklılıklarını incelemişlerdir. Sonuçta enkapsüle edilen *Bifidobacterium breve* R070 (BB R070) suşunun canlılıklarının, serbest suşlara kıyasla daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Dolayısıyla araştırmacılar, suda çözünmeyen peyniraltı suyu protein kaynaklı mikrokapsüllerde bifidobakterlerin immobilizasyonunun, yüksek asit ortamında toleranslarını artırdığı ve bu yaklaşımın insan sindirim sistemine probiyotik kültürlerin verilmesinde potansiyel fayda sağlayabileceğini belirtmişlerdir.

Reid *et al.* (2005) yaptıkları çalışmalarda, peyniraltı suyu proteinlerini kaplama materyali olarak kullanarak ekstrüzyon yöntemiyle probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirmiş ve yaklaşık 3 mm boyutlarında boncuklar elde etmişlerdir. Kapsülasyon veriminin %96 olduğu bu işlem sonucunda, boncuklardaki bakteri düzeyi 8.0×10^8 kob/g olarak belirlenmiştir. Daha sonra kapsüllenen hücreler 90 dakika süreyle dinamik bir gastrointestinal sistem şartlarına bırakılmıştır. Sonuçta

kapsüllemenin bakteriye hem asit, hem de safra koşullarına karşı koruma sağladığı görülmüştür.

Mandal *et al.* (2006) mikroenkapsüle edilmiş *Lactobacillus casei* NCDC-298 türünün canlılığı ve stres ortamlarına dirençleri üzerine farklı aljinat konsantrasyonlarının (%2, %3 ve %4) etkisini inceledikleri çalışmalarında, *L. casei* NCDC-298 suşunu düşük pH (1.5), yüksek tuz konsantrasyonu, safra (%1 veya %2) ve ısıl işleme (55, 60 veya 65°C'de) 20 dakika süreyle maruz bırakmışlardır. İnkübasyon sonucunda serbest hücreler ile karşılaştırıldığında kapsüllenmiş *L. casei* suşunun canlılığının, düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonunda safra ve ısıl işlem koşullarına karşı daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte kolonik pH çözeltisi içerisindeki enkapsüle hücrelerin canlılığı, -salınımları etkilenmeksizin- artan aljinat konsantrasyonları ile orantılı olarak artmıştır. Dolayısıyla aljinat konsantrasyonu arttıkça bakteri canlılığının da arttığı gözlemlenmiştir.

Probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, ekstrüzyon ve emülsiyon teknolojisi kullanılarak aljinat ile mikroenkapsüle edilen *Lactobacillus reuteri* bakterisi fermente kuru sosis hamuruna ilave edilmiş ve kurumaya bırakılarak duysal ve mikrobiyolojik kalitesi değerlendirilmiştir (Muthukumarasamy and Holley 2006). 26°C'de 72 saatlik fermentasyonun ardından, 25 gün süreyle 13°C'de kurumaya bırakılan enkapsüle edilmiş bakterilerin yer aldığı sosisteki *L. reuteri* sayısında $\leq 0,5$ log birimlik azalış meydana gelmişken, serbest bakterilerin yer aldığı sosisteki *L. reuteri* sayısında 2,6 log birimlik bir azalış meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca duysal özellikler bakımından kontrol örneği ile mikroenkapsüle probiyotik bakteri katılmış sosis arasında önemli farklılıkların olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışma, sağlık üzerinde olumlu özellikleri olan probiyotiklerin, fermente et ürünlerinde de kullanılabilceğini göstermiştir.

Liserra *et al.* (2007) mikroenkapsülasyon işleminin, bakterilerin yapay gastrointestinal ortam şartlarında canlı kalma özelliklerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, *B.*

animalis subsp. *lactis*'in aljinat ve aljinat-kitozan karışımı içerisinde enkapsülasyonunu gerçekleştirmiştir. Serbest ve enkapsüle bakteriler, pH 1,5-7,5 aralığını kapsayan yapay mide-bağırsak sıvısı ortamında incelenmiştir. Araştırma sonucuna göre, pH 1.5'te 30 dakika süreyle inkübe edilen serbest hücrelerin canlılık düzeyleri 2 log kob/g ve altına düşmüş, enkapsüle hücrelerde ise bu oran yaklaşık 4.5-5.5 log kob/g düzeyinde kalmıştır. Aynı şekilde pH 7.5'te 245 dakikalık inkübasyon süresi sonunda serbest hücreler 2 log kob/g'ın altına düşmüş, enkapsüle hücreler yaklaşık 4.5 log kob/g düzeyinde kalmıştır. Sonuç olarak enkapsülasyon işleminin, yapay gastrointestinal ortam şartlarında (pH:1.5-7.5) bakteri hücrelerinin direncini arttırdığı, kitozan kullanılarak gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işleminde ise korumanın önemli ölçüde geliştirilebileceği belirtilmiştir. Öte yandan pH 1.5'te fakat pepsin enziminin varlığında gerçekleştirilen inkübasyon sonucunda serbest *B.animalis* bakterisinin canlılık değerlerinin 30 dakikalık sürenin sonunda yaklaşık 5 log kob/g düzeyinde olduğu görülmüştür. Bu durum yağsız sütten elde edilen kültürlerde mevcut olan süt proteinleri üzerindeki enzim aktivitesi ile birlikte, peptitler ve amino asitler gibi besin maddelerinin varlığı ile açıklanmış; buna ilave olarak canlılığın iyileşmesinin, protein hidrolizinin tamponlama etkisinden dolayı da olabileceği belirtilmiştir.

Ding and Shah (2007) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 8 farklı probiyotik bakteri türünün aljinat kullanılarak enkapsülasyonu gerçekleştirilmiş ve asit, safra tuzu ve ısı toleransları incelenmiştir. Bu çalışmada serbest ve enkapsüle hücreler HCl kullanılarak pH değeri 2.0 olarak ayarlanmış MRS broth besiyerinde 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda serbest bakteri sayıları yaklaşık 3-4 log kob/ml'ye düşerken, bu sayı enkapsüle bakterilerde yaklaşık 6-7 log kob/ml düzeyinde kalmıştır. Dolayısıyla enkapsüle bakterilerin asit ortamda (pH 2.0), serbest bakterilerden daha yüksek düzeyde canlı kaldıkları gözlenmiştir ($p<0,05$). Aynı şekilde 8 saat safra tuzuna maruz bırakılarak safra toleransının incelendiği çalışmada serbest bakterilerde 6.51 log kob/ml'lik bir azalma meydana gelmiş, mikroenkapsüle bakterilerde ise 3.36 log kob/ml düzeyinde kayıp görülmüştür. Serbest ve enkapsüle bakteriler 65°C'de 30 dakikalık bir ısı işleme maruz bırakıldığında kapsüllenen bakterilerde ortalama 4,17 log

kob/ml'lik bir azalma gözlenirken, serbest bakteriler 6,74 log kob/ml'lik kayıp ile hayatta kalmışlardır. Sonuçta, genel olarak mikroenkapsülasyon işleminin, asidik koşullar, safra tuzları ve hafif bir ısıleme maruz bırakıldığında probiyotik bakterilerin yaşama şansını arttırdığı ifade edilmiştir.

Capela *et al.* (2007) probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu konusunda yaptıkları çalışmalarında *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* ve *B. longum* suşlarını homojenizasyon yöntemi kullanılarak kalsiyum aljinat ile kaplamış ve enkapsülasyon işlemi esnasında kalsiyum aljinat boncuklarının boyutunu azaltmak üzere homojenizasyon teknikleri araştırılarak bunun mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada Ultra-Turrax tezgah tipi homojenizatör, Avestin pistonlu homojenizatör ve Silverson mikser tipi olmak üzere üç farklı homojenizatör ve homojenizasyon tekniği kullanılmıştır. En küçük boncuk büyüklüğü 13500 rpm'de 4 dk. ile Ultra-Turrax tezgah tipi homojenizatörde elde edilmiştir (39,2 µm). Silverson karıştırıcısı kullanılarak her bir organizmanın canlılığında önemli bir azalma olmuştur (<%5.5). Ancak Ultra-Turrax ve Avestin homojenizer kullanıldığında sırasıyla %64.4 ve %47.7 oranında canlı kalma yüzdeleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak Silverson mikseri kullanılarak gerçekleştirilen homojenizasyon işlemi probiyotik nüfus üzerinde olumsuz bir etki oluşturmuş, Ultra-Turrax ve Avestin homojenizer kullanımında ise bakteriler herhangi bir olumsuz yönde etkilenmemiştir.

Tsen *et al.* (2007) tarafından yapılan bir diğer çalışmada düşük sıcaklıklara hassas bir bakteri olan *L. reuteri*'nin dondurma ve dondurulmuş depolama işleminin olumsuz koşullarına karşı direncini artırmada mikroenkapsülasyon işleminin etkisi incelenmiştir. Araştırmacılar, kaplama materyali olarak kalsiyum aljinat ve γ -karegenan kullanmak suretiyle *L. reuteri* suşunu mikroenkapsüle etmişler ve elde edilen mikroenkapsüle hücreleri -20, -40, -60 ve -80°C olan farklı dondurma sıcaklıklarına maruz bırakarak -40 ile -80°C'de 12 hafta süreyle depolamışlardır. Araştırma sonuçlarına göre mikroenkapsüle hücrelerin hem dondurma işlemlerinde hem de dondurma sıcaklıklarında depolama sırasında daha iyi canlılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Öte

yandan kalsiyum aljinatın tutuklama etkisinin χ -karegenandan daha iyi olduğu sonucu da bu araştırma neticesinde elde edilmiştir.

Kim *et al.* (2008) *L. acidophilus* ATCC 43121'in ekstrüzyon metodu kullanarak aljinat içerisine mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmalarında, enkapsülasyon işleminin yapay gastrointestinal ortam şartlarında *L. acidophilus* ATCC 43121'in canlılığı ve sıcaklığa direnç özelliklerini değerlendirilmişlerdir. Bunun yanında *L. acidophilus* ATCC 43121'in kolesterol asimilasyonu ve bağırsak mukozasına tutunma (intestinal adhezyon) gibi sağlığa yararlı özellikleri üzerine mikroenkapsülasyon işleminin etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda pH 1,2 ve pH 1,5'lik yapay mide suyu ortamında serbest hücrelerin tamamen öldüğu gözlenmiş, buna karşılık enkapsüle hücrelerin sayısında 3 log kob/ml düzeyinde bir azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca enkapsüle hücrelerin serbest hücrelere göre, ısıl işlem uygulamasına belirgin bir şekilde daha fazla direnç gösterdiği görülmüştür. Öte yandan serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 43121'in kolesterol asimilasyonundaki azalmaları sırasıyla %35.98 ve %32.84 olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla enkapsülasyon işlemi kan kolesterol seviyesinin düşürülmesini olumsuz yönde etkilememiştir. Bununla birlikte enkapsülasyon işleminin, hücrelerin bağırsak epitel yüzeyine tutunma özelliğini de önemli ölçüde etkilemediği bildirilmiştir ($p>0.05$).

Özer *et al.* (2008) emülsiyon ve ekstrüzyon teknikleriyle mikroenkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 ve *Bifidobacterium bifidum* BB-12 probiyotik mikroorganizmalarını kaşar peynirine ilave ederek hem üretim sürecinde hem de takip eden 90 günlük depolama süresince yaşayabilirliğini inceleyerek mikrobiyolojik, biyokimyasal ve duyuasal özelliklerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, ürün üretim sürecinde 2 dakika boyunca 52°C'de haşlama işlemine tabi tutmuşlardır. Haşlama işleminin sonunda serbest *B. bifidum* BB-12 sayısında ~2,5 log kob/g düşüş gözlenmiş, enkapsüle BB-12'de yaklaşık 0,5 log birimlik hafif bir azalış tespit edilmiştir. 90 günlük olgunlaşma periyodunun sonunda ise serbest BB-12 sayısı toplamda ~7 log kob/g azalmışken, enkapsüle BB-12 sayısında yaklaşık 2 log kob/g düşüş meydana gelmiştir. Aynı şekilde

olgunlaşmanın sonunda (90 günün sonunda) serbest LA-5 yaklaşık 3,5 log kob/g azalmış, enkapsüle LA-5 ise yaklaşık 2 log birimlik bir azalış göstermiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar, kullanılan mikroenkapsülasyon teknikleri ile kaşar peynirinin temel kimyasal bileşiminin etkilenmediğini göstermiştir. Sonuç olarak enkapsülasyon işlemi görmüş *B. bifidum* BB-12 ve *L. acidophilus* LA-5 suşları, haşlanma ve peynir içerisinde 90 gün boyunca depolanma sırasında tatmin edici düzeyde canlılık sergilemiş ve metabolik aktivite göstermiştir. Bu sebeple mikrokapsül haline getirilmiş probiyotikler ile muamelede kaşar peynirinin uygun bir probiyotik taşıyıcısı olabileceği ifade edilmiştir.

Enkapsülasyon işleminin yapay gastrointestinal ortam şartlarına karşı direnç özelliğine etkilerinin incelendiği bir diğer çalışma Annan *et al.* (2008) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada *Bifidobacterium adolescentis* 15703T hücreleri, aljinat ile kaplanmış jelatin mikrokürelerinin içerisine enkapsüle edilmiştir. Kapsüller, yapay gastrointestinal ortam şartlarında (pH:2.0) 1 saatlik inkübasyondan sonra yapay bağırsak ortamında (pH:7.4) 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından aljinat ile kaplanmış jelatin mikroküreciklerinin bakteri düzeyi sırasıyla 7.6 ve 7.4 log kob/ml olarak ölçülmüştür. Bununla birlikte serbest bakteri düzeyi ile aljinat ile kaplanmamış jelatin kapsüller içerisindeki bakteri düzeyleri sırasıyla 6.4 ve 6.7 log kob/ml olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışma ile, jelatin mikrokürelerin aljinat ile kaplanmasının, olumsuz çevresel koşullara maruz kalma sırasında probiyotik bifidobakteriyi koruyarak canlı bakteri düzeyini artıran yeni bir mikroenkapsülasyon yöntemi olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Homayouni *et al.* (2008) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise mikroenkapsülasyon işleminin dondurma içerisine ilave edilen iki probiyotik bakteri (*Lactobacillus casei* (Lc-01) ve *Bifidobacterium lactis* (Bb-12)) üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla serbest ve enkapsüle probiyotik kültürler %1 dirençli nişasta içeren dondurmalara ilave edilerek -20°C'de 180 gün süreyle muhafaza edilmiş ve ürünün depolanması süresince canlılıkları izlenmiştir. Hazırlanan dondurma karışımı içindeki serbest *L. casei* ve

B.lactis'in canlı hücre sayıları depolamanın ilk gününde sırasıyla 5.1×10^9 ve 4.1×10^9 kob/ml iken -20°C 'de 180 gün depolamanın ardından 4.2×10^6 ve 1.1×10^7 kob/ml'ye düşmüştür. Probiyotik bakteriler kalsiyum aljinat ile mikroenkapsüle edildikten sonra aynı sıcaklık ve sürede depolamada bakteri canlılıkları izlenmiş ve bir önceki değerlerin %30 üzerinde yüksek çıkmıştır. Genel olarak bu çalışmada elde edilen sonuçlar, enkapsülasyon işleminin, uzun bir raf ömrü boyunca dondurmada probiyotik bakterilerin hayatta kalma oranlarının artırılmasında alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte dondurma ve dondurulmuş tatlılar gibi süt ürünlerinin, insan bağırsağı içerisine probiyotik bakterilerin verilmesi için uygun bir taşıyıcı olarak hizmet edebileceği belirtilmiştir.

Gbassi *et al.* (2009) tarafından bazı *L. plantarum* türlerinin (*L. plantarum* 299v, *L. plantarum* 800 ve *L. plantarum* CIP A159) mikroenkapsülasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada ise, kaplama malzemesi olarak aljinat ile birlikte kapsüllenmeyi geliştirmek amacıyla peyniraltı suyu proteinleri kullanılmıştır. İnaktivasyon deneylerinin, yapay mide sıvısı ve bağırsak sıvısı içinde gerçekleştirildiği söz konusu çalışmada, ayrıca bakterilerin aljinat yapısı üzerindeki salınımı incelenmiş, sonuçta dondurularak kurutulan boncukların enine kesitleri, aljinat ağı boyunca bakterilerin rastgele dağılımını ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar, enkapsüle *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) bakterilerini yapay mide sıvısı içerisinde 37°C 'de 60 dakika inkübasyona bırakmış, sonuçta peyniraltı suyu proteinleri ve aljinat ile kaplanmış *L. plantarum* 299v, *L. plantarum* CIP A159 ve *L. plantarum* 800 bakterileri (sırasıyla 7.76 ± 0.12 , 6.67 ± 0.08 ve $5.81 \pm 0.25 \log_{10}$ kob/g) kaplanmamış bakterilere kıyasla (sırasıyla 2.19 ± 0.09 , 1.89 ± 0.09 ve $1.65 \pm 0.10 \log_{10}$ kob/g) daha iyi canlılık göstermiştir ($p < 0.05$). Aynı şekilde mikrokapsüller yapay mide sıvısı muamelesinden sonra yapay bağırsak sıvısı koşullarına tabi tutulmuş (37°C 'de 180 dakika), sadece kaplanmış boncukların canlı bakteri hücreleri ihtiva ettiği tespit edilmiştir (örneğin Lp299v için $2.74 \pm 0.06 \log$ kob/g). Bu çalışma peynir altı suyu proteinleri ile kaplamanın, aljinat taneleri içindeki bakterilerin yaşama şansını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Buna ilave olarak

araştırmacılar, peyniraltı suyu proteinlerinin bakteri yüklü aljinat boncuklarının kaplanmasında uygun, ucuz ve verimli olduğunu ifade etmişlerdir.

Özer *et al.* (2009) beyaz peynir üzerinde yapılan bir çalışmalarında, κ-karragenan kullanmak suretiyle emülsiyon tekniği ile ve aljinat kullanarak ekstrüksiyon tekniği ile mikroenkapsüle edilen probiyotik *Bifidobacterium bifidum* BB-12 ve *Lactobacillus acidophilus* LA-5 suşlarını, salamura beyaz peynire katarak canlılıkları incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, her iki mikroenkapsülasyon tekniği probiyotik bakterilerin sayılarını, terapötik minimumdan ($>10^7$ kob/g) daha yüksek düzeyde tutmada etkili olmuştur. Serbest hücrelerin kullanıldığı kontrol peynirde probiyotik bakterilerin sayısı yaklaşık 3 log azalmışken, enkapsüle hücreleri içeren peynirlerde bu düşüş daha sınırlı kalmıştır (yaklaşık 1 log). Ayrıca asetaldehit ve diasetil gibi tat ve aroma bileşenleri ile orta ve uzun zincirli serbest yağ asidi içeriklerinin enkapsüle kültür içeren peynirlerde kontrol peynirlere göre çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Heidebach *et al.* (2009) *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 ve *Bifidobacterium lactis* Bb12 probiyotik bakterilerini rennet ile enzimatik kaynaklı jelleşme vasıtasıyla süt protein matrisleri içinde enkapsüle ederek elde edilen mikrokapsülleri düşük pH'da (pH:2,5) inkübe etmişlerdir. Enkapsüle *Lactobacillus paracasei* ve *Bifidobacterium lactis*'e ait canlı hücre sayısı, pH 2.5'de 90 dakika inkübe edildikten sonra serbest hücrelere kıyasla sırasıyla 0.8 ve 2.8 log kob/g daha yüksek olmuştur. Bu durum, kapsüllerin protein matrisi içindeki proteinlerin tamponlama kapasitesinin neden olduğu daha yüksek bir lokal pH sebebiyle, düşük pH'ya sahip yapay mide koşullarında hücreleri koruduğu şeklinde açıklanmıştır. Öte yandan bu çalışma, rennet enzimi ile yağsız süt konsantrelerinin neden olduğu jelleşmenin probiyotik hücrelerin mikroenkapsülasyonunda özellikle bitki-polimer çözeltilerinin iyonotropik jelleşmesine dayalı mevcut teknolojilere uygun bir alternatif olabileceğini ortaya koymuştur.

Jurkiewicz *et al.* (2011) dondurmada -18°C 'de 180 günlük bir depolama süresi boyunca kalsiyum aljinat ile enkapsüle edilen *Lactobacillus acidophilus* NCFM ve *Bifidobacterium lactis* BI-04 bakterilerinin canlılığı üzerine aljinat kapsüller içerisine ilave edilen prebiyotiklerin (dirençli nişasta ve akasya zamkı) etkisini değerlendirmişlerdir. Söz konusu çalışmada enkapsülasyon işleminin probiyotik kültürlerin canlılığı üzerine önemli ölçüde etki etmediği görülmüştür ($p>0.05$). Dolayısıyla enkapsülasyon işleminin ve prebiyotik ilavesinin, -18°C 'de 180 gün depolama sonunda bakterilerin canlılıkları üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Emülsiyon metodu kullanılarak mikroenkapsülasyon işleminin uygulandığı bir diğer çalışmada ise, aljinat ve dirençli nişasta ile kaplanan probiyotik *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 bakterisinin yapay gastrointestinal şartlarda canlılığı incelenmiştir (Shafiei *et al.* 2012). Buna göre serbest ve enkapsüle *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 bakterisi %0,6'lık safra tuzu çözeltisi (pH 8.25), yapay mide suyu (pH 1.55) ve susuz safra tuzu ortamında (pH 7.43) 37°C 'de 120 dak inkübasyona bırakılmış ve daha sonra MRS agarda 37°C 'de 72 saatlik inkübasyon süresince her 30 dakikada bir canlılıkları araştırılmıştır. Söz konusu ortamlarda enkapsüle bakterilerin sayısı sırasıyla 6.48 ve 7.23 log kob/ml iken serbest bakterilerin sayısı 4.6 log kob/ml olarak tespit edilmiştir ki bu sayı kolona ulaşarak probiyotik işlevi yerine getirebilmek için yeterli değildir. Yapılan istatistiksel testler, kapsüllü bakterilerin canlılığının, serbest bakterilere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir ($p<0.05$). Sonuçta bu çalışmada kalsiyum aljinat ve dirençli nişasta ile *L. plantarum* bakterisinin mikrokapsüllendirilmesinin olumsuz gastrointestinal şartlara karşı bu bakterileri etkili bir şekilde koruyabileceği sonucuna varılmıştır.

Enkapsülasyon işleminin uygulandığı bir diğer çalışma Karthikeyan *et al.* (2014) tarafından gerçekleştirilmiş, *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) ve *Lactobacillus casei* (NCDC-298) bakterilerinin mikroenkapsülasyon tekniği kullanılarak dondurmadaki hayatta kalma oranı incelenmiştir. Araştırmacılar serbest ve enkapsüle probiyotik

bakterileri ihtiva eden dondurmaları -23°C 'de 180 günlük depolamaya tabi tutmuş ve bakterilerin canlılıklarını izlemiştir. Hazırlanan dondurma karışımındaki serbest *L. acidophilus* (LA-5) ve *L. casei* (NCDC-298) bakterilerine ait canlı hücre sayısı ilk gün sırasıyla 5.1×10^9 kob/ml ve 4.3×10^9 kob/ml iken -23°C 'de 90 gün depolama sonunda sayıları sırasıyla 2.3×10^8 kob/ml ve 5.3×10^8 kob/ml'ye düşmüştür. Her iki probiyotik bakterilerin canlılıklarının, kalsiyum aljinat ve peynir altı suyu proteini ile birlikte kapsülendikten sonra, aynı şartlarda 90 günlük depolama sonundaki canlı hücre sayıları ise sırasıyla 5.5×10^8 kob/ml ve 2.4×10^9 kob/ml olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla 90 günlük bir depolamanın sonunda kapsüllemenin *L. acidophilus* (LA-5) için çok önemli bir etkisi olmamış, *L. casei* (NCDC-298) için ise yaklaşık 1 log birimlik bir etkisinin olduğu görülmüştür. Fakat aynı şartlardaki 180 günlük depolama süresi sonunda serbest *L. acidophilus* (LA-5) ve *L. casei* (NCDC-298) bakterilerine ait canlı hücre sayıları sırasıyla 4.1×10^6 kob/ml ve 1.9×10^7 kob/ml iken, enkapsüle bakterilere ait canlı hücre sayılarının 2.3×10^8 kob/ml ve 1.5×10^9 kob/ml olduğu görülmüştür. Sonuç olarak araştırmacılar bu çalışma ile mikrokapsüllemenin, uzun bir raf ömrü boyunca dondurmadaki probiyotik bakterilerin hayatta kalma oranını artırabileceğini belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Dondurma

Bu çalışmada kullanılan dondurma, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Pilot Süt Fabrika'sından temin edilmiştir.

3.1.2. Probiyotik bakteri suşları

Bu çalışmada mikroenkapsülasyona tabi tutulacak probiyotik bakteri suşu olarak *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 kullanılmıştır. *Lactobacillus acidophilus* ATCC (American Type Culture Collection-Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu) 4356 bakteri suşu Microbiologics firmasından orijinal paketi içinde liyofilize formda temin edilmiştir.

3.1.3. Besiyerleri, dilüsyon sıvıları ve çözeltiler

Çalışmada bakteri suşlarının aktiveleştirilmesinde ve mikrobiyolojik sayımların gerçekleştirilmesinde MRSbroth (Merck) besiyeri kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik analizlerde dilüsyonların hazırlanmasında Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck) kullanılmıştır.

3.1.4. Diğer kimyasal maddeler

Mikroorganizmaların kaplanmasında sodyum aljinat (Sigma), tampon çözelti hazırlanmasında $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneme planı

Araştırma serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurma örneklerinden olmak üzere iki farklı muamele ve 0, 30 ve 90 günlük 3 farklı depolama süresi ile üç tekerrürlü olarak 2x3x3 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre kurulmuş ve yürütülmüştür.

3.2.2. Probiyotik suş ve geliştirilmesi

Kaplama işlemi uygulanacak *L. acidophilus* ATCC 4356 suşu öncelikle 9 ml MRS Broth besiyerine inoküle edilmiş ve ardından 37°C'de 48 saat anaerobik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bu tüpten 2 ml alınarak yeni bir 9 ml'lik MRS Broth besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat anaerobik inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra inkübasyondan çıkarılan tüp vortekslenerek 500 ml'lik MRS Broth besiyerine aktarılmış ve yeniden 37°C'de 24 saat anaerobik ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından elde edilen bakteri süspansiyonu 50 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktararak 5000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet üzerine 9 ml steril peptonlu su ilave edilerek vortekslenmiş ve pelletin peptonlu su içerisinde iyice çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu sıvı, içerisinde sadece pellet bulunan diğer 9 tüpe sırasıyla aktararak vorteks işlemi uygulanmış ve çözünmenin daha iyi bir şekilde olabilmesi için her aktarım esnasında üzerine 2-3 ml steril peptonlu su ilave edilmiştir. En nihayetinde toplamda 34 ml bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Bu süspansiyondan 1 ml alınarak TPS içinde 10^{-6} düzeyine kadar seyreltildikten sonra her bir dilusyondan yayma yöntemiyle MRS agara (Oxoid) ekim yapılmıştır. Anaerobik koşullarda 37°C'de 48 saat inkübasyonun ardından *L. acidophilus* ATCC 4356 suşu $\sim 10^9$ kob/ml'ye çoğaltılmıştır. Böylece ileride yapılacak olan işlemlerde inkübasyon sonundaki sayıları belirlemek üzere başlangıçtaki yaklaşık m.o. sayısı tespit edilmiştir (Ortakçı 2010).

3.2.3. Probiyotik bakterilerin aljinat içerisine mikroenkapsülasyonu

Aljinat mikrokapsülleri, modifiye edilmiş kapsülleme yöntemi kullanılarak elde edilmiştir (Krasaekoopt *et al.* 2003; Ortakçı 2010). Buna göre 20 ml $\sim 10^9$ kob/ml'ye çoğaltılmış olan *L. acidophilus* ATCC 4356 kültür konsantratu, %2,5 sodyum aljinat içeren 80 ml steril aljinat solüsyonuna manyetik karıştırıcı kullanılarak yaklaşık 10 dakika süreyle yavaş yavaş ilave edilmiş ve immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde bakterilerin aljinat içerisine iyice dağılması sağlanmıştır. Elde ettiğimiz aljinat-bakteri süspansiyonu, aljinatın jel içerisinde küresel boncuk oluşturmasını sağlayan 500 ml 0.2 M CaCl_2 çözeltisi içerisine, steril 21 G şırınga yardımıyla, aradaki mesafe 30 cm olacak şekilde damla damla aktararak ekstrüde edilmiştir. Damlacıkların CaCl_2 çözeltisi içerisine damlatılmasıyla birlikte aljinat, çapraz iyonik bağlanma sonucu 3 boyutlu kafes yapı içerisinde hücreleri hapsederek enkapsülasyonu gerçekleştirmekte ve jel küreler (mikrokapsüller) oluşmaktadır (Karthikeyan *et al.* 2014). Oluşan kalsiyum-aljinat mikrokapsülleri ilave olarak 30 dakika süreyle CaCl_2 çözeltisi içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırılarak kapsüllerin daha sert ve sağlam bir form kazanması sağlanmış ve daha sonra kapsüller steril saf suyla yıkanmıştır (Ortakçı 2010). Son olarak CaCl_2 çözeltisi içerisindeki mikrokapsülleri elde etmek üzere Whatmann # 4 filtre kâğıdı kullanmak suretiyle süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Filtre edilen mikrokapsüller aynı gün dondurmaya katılmak üzere 4°C'de steril petri kutusunda muhafaza edilmiştir. Ekstrüzyon tekniği kullanılarak elde edilen kalsiyum aljinat mikrokapsülleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kalsiyum-aljinat mikrokürelerinin görünüşleri

3.2.4. Mikrokapsüllerin boyutlarının belirlenmesi

Mikrokapsüllerin boyutlarının belirlenmesi amacıyla 25 ml'lik dereceli silindir kullanılmıştır. 50 adet kapsül, içerisinde 10 ml saf su bulunan silindire ilave edilerek hacim artışı not edilmiş, daha sonra 1 adet kapsülün hacminden yola çıkılarak küre hacim formülünden çap hesaplanmıştır. Böylece bir kapsülün ortalama boyutu belirlenmiştir.

3.2.5. Mikrokapsül içerisindeki probiyotik bakteri düzeyinin belirlenmesi

Kuru formdaki aljinat mikrokapsüller içerisindeki bakteri düzeyini belirlemek amacıyla 1 g mikrokapsül 99 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH 7.0) içerisine aktarılmış ve 10 dakika süresince stomacher cihazında homojenize edilmiştir. Böylece hem yeniden bir iyon değişimi ve sekuesteran etki sağlanarak, hem de stomacher cihazının mekanik etki özelliğiyle kapsülleri degrade edici etkisinden yararlanarak kapsüllerin açılması ve bakteri hücrelerinin tampon ortamında serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Bunu takiben uygun seri dilüsyonlar hazırlanmış ve MRS agar besiyeri kullanılarak yayma plak yöntemi ile canlı hücre sayımları belirlenmiştir (Ortakçı 2010). Sonuçların ortalamaları, numunenin gramı başına koloni oluşturan birimin logaritması alınarak (log kob/g) ifade edilmiştir.

3.2.6. Mikroenkapsüle ve serbest bakterileri içeren dondurmaların depolanması

Mikroenkapsüle bakteri içeren dondurmaların hazırlanmasında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Pilot Süt Fabrikasından temin edilen dondurma kullanılmıştır. 50 ml'lik steril plastik tüplere 18'er g konulan dondurmalar oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek kısmen erimeleri sağlanmış ve içerisine 10^8 kob/g düzeyinde canlı kültür içeren kapsüllerden 2 g katılıp homojen bir karışım meydana getirilmiştir. Mikroenkapsüle bakterileri içeren dondurmalar 90 gün süreyle -18°C 'de depolamaya tabi tutulmuş ve 0, 30 ve 90 gün sonunda *L. acidophilus* ATCC 4356 sayımı gerçekleştirilmiştir.

Serbest bakteri içeren dondurmaların hazırlanmasında da yine 50 ml'lik steril plastik tüplere 9'ar g dondurma konulmuş ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletmek suretiyle kısmen erimeleri sağlanarak üzerine 1 ml bakteri süspansiyonundan ilave edilmiştir. Aynı şekilde serbest bakterileri içeren dondurmalar da 90 gün süreyle -18°C 'de depolamaya tabi tutulmuş ve 0, 30 ve 90 gün sonunda *L. acidophilus* ATCC 4356 sayımı gerçekleştirilmiştir. Böylece -18°C 'de muhafaza edilen dondurmalarda

depolama periyodu boyunca serbest ve mikroenkapsüle bakterilerin canlılıklarındaki değişimler tespit edilmeye çalışılmıştır.

3.2.7. Depolama periyodu boyunca dondurma örneklerinden *L. acidophilus* ATCC 4356'nın sayımı

Depolama boyunca örneklerdeki canlı bakteri düzeylerinde meydana gelebilecek değişimleri belirlemek amacıyla 0, 30 ve 90. günlerde mikrobiyolojik sayımlar gerçekleştirilmiştir. Buna göre, serbest formdaki probiyotik bakterileri içeren örnekler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek kısmen erimeleri sağlanmış ve peptonlu su kullanılarak 10^{-1} 'lik ilk dilüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra stomacher torbasına konularak 5 dakika homojenize edilmiş ve ardından uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

Sayım amacıyla,enkapsüle formdaki probiyotik bakterileri içerenörneklerin mikrokapsül içeriğinin ortamda serbest hale geçmesi için fosfat tamponu kullanılarak 10^{-1} 'lik ilk dilüsyonları hazırlanmış,ardından stomacher cihazında homojenize edilerek peptonlu su ile uygun seri dilüsyonlar hazırlanmıştır.

Daha sonra yayma plak yöntemiyle her bir dilüsyondan MRS agar (Oxoid) besiyeri kullanılarak anaerobik koşullarda (37°C 'de 48 saat) canlı bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Dondurma örneklerinde duyuşal analiz

Dondurmalar oda sıcaklığında 20 dakika bekletilerek kısmen erimeleri sağlanmış ve 25'er gramlık porsiyonlara bölünerek içerisine 10^8 kob/g düzeyinde canlı kültür içeren kapsüllerden 1/100 oranında katılıp homojen bir karışım sağlanmıştır. Daha sonra 1 gün süreyle -18°C 'de depolamaya tabi tutulmuş ve ardından duyuşal analizleri

yapılmıştır. Analizlerde kontrol olarak serbest mikroorganizma katılmış dondurma kullanılmıştır.

Duyusal analizler, Türk Standartları Enstitüsü “TS 4265 Süt Esaslı Dondurma” standardı esas alınarak hazırlanan duyuşal değerlendirme puan cetveli (**EK 1**) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 10 farklı panelist tarafından gerçekleştirilen bu değerlendirmeler, **EK 1**'de verilen “Dondurma rnekleri için duyuşal muayene değerlendirme puanları” çizelgesinde bulunan kriterler ve puanlar dahilinde yapılmıştır. Değerlendirmede renk, görünüş, yapı, kıvam, tat ve koku kriterleri dikkate alınmıştır.

3.2.9. İstatistiksel analizler

Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 17.0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Varyanslar arasındaki farklılığın önem kontrolü One Way ANOVA varyans analizi kullanılarak saptanmış, önemli bulunan ana varyasyon kaynaklarına ait ortalamalar ise Tukey oklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Mikrokapsüllerin Boyutlarının Belirlenmesi

L. acidophilus ATCC 4356 suşunun %2,5'lik sodyum aljinat ile kaplanmasında elde edilen kapsüllerin boyutlarının belirlenmesi amacıyla 50 adet kapsül, içerisinde 10 ml saf su bulunan 25 ml'lik dereceli silindire ilave edilmiş, sonuçta 0,5 ml'lik hacim artışı olmuştur. Buna göre 1 adet kapsülün yaklaşık hacmi 0,01 ml olarak tespit edilmiştir.

$$\text{Kürenin hacmi (V)} = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad 0,01 = \frac{4}{3} \times 3,14 \times r^3 \quad r^3 = 0,00238$$

$$r = 0,133 \text{ cm} \quad R = 2r \rightarrow R = 2 \times 0,133 = 0,266 \text{ cm}$$

Yaklaşık 2660 µm (2,66 mm) çap boyutuna sahip kapsül elde edilmiştir. Şüphesiz, kullanılan destek materyalinin çeşidi, konsantrasyonu, şırınga ve reaktörün birbirine olan uzaklığı ve şırınga başlığının çapı oluşan kürelerin boyutunu direkt olarak etkileyen en önemli parametrelerdir. Sheu *et al.* (1993) büyük kapsüllerin dondurmanın tekstüründe pürüzlülüğe ve kabalığa neden olabileceğini, çok küçük kapsüllerin de probiyotik bakterileri yeterli şekilde koruyamayabileceğini bildirmiştir.

4.2. Serbest ve Enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356'nın Depolama Süresince Dondurmadaki Gelişimi

Depolama stabilitesinin belirlenmesinde serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurma örnekleri -18°C'de depolanmıştır. Depolamanın başlangıcında (0. gün), 30. ve 90. günlerde olmak üzere 3 farklı depolama süresi ile yapılan sayımlarla, kaplama işleminin mikroorganizmanın canlılığı üzerine etkisi belirlenmiştir. Başlangıçta serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 sayıları sırasıyla 8,55

ve 8,32 log kob/g iken depolama sonunda sırasıyla 7,60 ve 7,44 log kob/g'a düştüğü gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.1. Serbest ve mikroenkapsüle edilmiş *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurmalarda depolama periyodunda yapılan sayımlar (log kob/g)

Dondurma Örnekleri	Depolama (gün)	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 sayısı (log kob/g)		
		1. Tekerrür	2. Tekerrür	3. Tekerrür
Serbest	0	8,62	8,46	8,58
	30	8,49	8,43	8,57
	90	7,50	7,39	7,93
Mikroenkapsüle	0	8,23	8,37	8,36
	30	8,20	8,32	8,33
	90	7,44	7,32	7,57

Deneme dondurma örneklerine ait depolama periyodunda elde edilen *L. acidophilus* ATCC 4356 sayıları (log kob/g) Çizelge 4.2'de canlılık oranları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Deneme dondurma örneklerine ait depolama periyodunda elde edilen *L. acidophilus* ATCC 4356 sayıları (log kob/g)

Dondurma Örnekleri	Depolama Süresi (Gün)		
	0	30	90
Serbest	8,55±0,083	8,49±0,070	7,60±0,285
Mikroenkapsüle	8,32±0,078	8,28±0,072	7,44±0,125

Çizelge 4.3. Deneme dondurma örneklerine ait depolama periyodunda elde edilen *L. acidophilus* ATCC 4356 oranları (%)

Dondurma Örnekleri	Depolama Süresi (Gün)		
	0	30	90
Serbest	100,00±0,00	99,33±0,74	88,92±3,03
Mikroenkapsüle	100,00±0,00	99,55±0,13	89,46±1,74

Serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurmalara ait depolama periyodunda *L. acidophilus* ATCC 4356 sayılarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Serbest ve enkapsüle edilmiş bakterileri içeren dondurmaların depolanmasında *L. acidophilus* ATCC 4356'nıncanlı kalma oranlarına (%) ait varyans analiz sonuçları

Ana varyasyon Kaynakları	SD	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356oranı (%)		
		KO	F	Anlamlılık
Bakteri (B)***	1	0,291	0,136	0,718
Depolama (D)	2	222,151	103,915	0,00**
Bakteri*Depolama BxD	2	0,112	0,052	0,949
Hata	12	0,589		

(*) Bakteri formu ve depolama süresinin m.o. oranı üzerindeki ortak etkisi

(**) $p < 0,01$ Düzeyinde önemli

(***) Bakteri, serbest ve enkapsüle m.o.'ları ifade etmektedir.

Tablonun bakteri satırındaki anlamlılık değeri ($p=0,718$, $p>0,05$), bakterilerin enkapsüle edilip edilmemesiyle canlı m.o. oranı arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ortaya koymaktadır.

Tablonun depolama satırındaki anlamlılık değeri ise, serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurmalarda, depolamanın bakterilerin canlılık oranları üzerine çok önemli etki ettiğini göstermektedir ($p<0,01$).

Bakteri*Depolama değerlerine baktığımızda, bakteri formunun ve depolama süresinin canlı m.o. oranı üzerindeki ortak etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir ($p=0,949$, $p>0,05$). Bu bulgular ışığında serbest ve enkapsüle bakteri içeren dondurmaların canlı m.o. oranları, bakteri formuna bağlı olarak farklılık göstermezken, depolama süresine bağlı olarak farklılık göstermektedir denilebilir.

Deneme dondurmaların depolanması esnasında belirlenen serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356'nin canlılık oranlarına ait One Way ANOVA varyans analizi Çizelge 4.5'te verilmiştir. Böylelikle farklı bakteri formlarına sahip dondurmaların canlı m.o. oranları arasında fark olup olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Dondurmaların depolanmaları sırasında belirlenen serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356'nin canlılık oranlarına (%) ait ortalamaların One Way ANOVA varyans analizi

Mikroorganizma	N	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 canlı kalma oranı (%)	
		Ortalama	Standart Sapma
Serbest	9	96,08	5,60 a
Enkapsüle	9	96,34	5,23 a

*Farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0,05$)

Buna göre göre serbest *L. acidophilus* ATCC 4356 depolama periyodunda ortalama %96,08 oranında canlılığını sürdürebilmişken enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 ortalama %96,34 oranında canlı kalabilmiştir.

Yukarıdaki tabloya bakıldığında, enkapsüle bakteri içeren dondurma örneklerindeki canlı m.o. oranlarının serbest bakteri içeren dondurma örneklerindeki canlı m.o.

oranlarından çok az farkla fazla olduğu görülmektedir. Ancak bu farklılıkların rastlantısal mı yoksa herhangi bir etki sonucu olup olmadığını belirleyebilmek için ANOVA tablosunu incelememiz gerekir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356'nın canlı kalabilme oranları arasındaki One Way ANOVA varyans analizi

<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 canlı kalma oranı (%)	SD	KO	F	Anlamlılık
Gruplar arasında	1	0,291	0,10	0,922
Gruplar içinde	16	29,386		
Toplam	17			

ANOVA tablosunun Anlamlılık(p) sütunundaki değerin 0,922 olduğu görülmektedir. Söz konusu değer 0,05'den büyük olduğu için serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356'nın 90 günlük depolamanın sonunda canlı kalabilme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını söyleyebiliriz ($p > 0,05$).

Deneme dondurmalarından depolama periyodunda belirlenen canlı m.o. oranlarına ait ortalamaların One Way ANOVA varyans analizi Çizelge 4.7'de, Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları ise Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9'da verilmiştir. Böylelikle farklı depolama sürelerindeki dondurmaların canlı m.o. oranları arasında farklılıklar değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.7. Depolama periyodunda belirlenen canlı *L. acidophilus* ATCC 4356 oranlarına ait ortalamaların One Way ANOVA varyans analizi

Depolama	N	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 canlı kalma oranı (%)	
		Ortalama	Standart Sapma
0. gün	6	100	0,00 a
30. gün	6	99,44	0,49 a
90. gün	6	89,19	2,23 b

Farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p < 0,05$)

Çizelge 4.8. Depolama periyodunda belirlenen canlı *L. acidophilus* ATCC 4356 oranlarına ait ortalamaların Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

***L. acidophilus* ATCC 4356 canlı kalma oranı (%)**

depolama (gün)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
90	6	89,1950	
30	6		99,4467
0	6		100,0000
Anlamlılık		1,000	,752

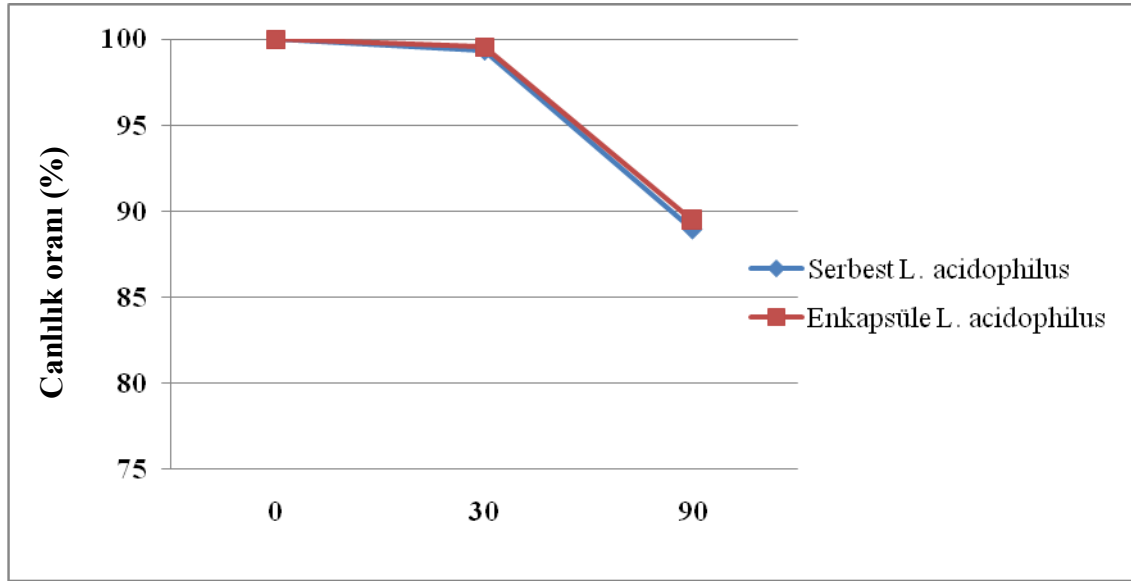
Çizelge 4.9. Depolama periyodunda belirlenen canlı *L. acidophilus* ATCC 4356 oranlarına ait ortalamaların Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

(I) depolama (gün)	(J) depolama (gün)	Ortalamalar arasındaki fark (I-J)	Standart hata	Anlamlılık
0	30	,55333	,76259	,752
	90	10,80500*	,76259	,000
30	0	-,55333	,76259	,752
	90	10,25167*	,76259	,000
90	0	-10,80500*	,76259	,000
	30	-10,25167*	,76259	,000

(*) Ortalamalar arasındaki fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

Görüldüğü üzere her iki tip dondurma esas alındığında depolama süresine bağlı olarak canlı m.o. oranlarında bir azalma söz konusudur (Çizelge 4.7). Bununla birlikte Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9'daki anlamlılık sütunundaki değerlerden, 0. gün ile 30. gün depolama süresinin canlı m.o. oranları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$), 90. gündeki canlı m.o. oranlarındaki değişimin ise $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olduğu anlaşılmaktadır.

Deneme dondurmalarında *L. acidophilus* ATCC 4356'nın canlılık oranı (%) üzerine depolama süresi x serbest/enkapsüle form interaksiyonunun etkisi Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Deneme dondurmalarında *L. acidophilus* ATCC 4356'nın canlılık oranı üzerine depolama süresi x serbest/enkapsüle form interaksiyonunun etkisi

Sonuçların genel bir değerlendirmesi yapıldığında; soğuk depolamanın dondurma örneklerindeki canlı bakteri sayılarında azalmaya neden olduğu ve 3 aylık soğuk depolama boyunca mikroenkapsüle ve serbest formdaki bakterileri içeren dondurma örneklerindeki canlı bakteri düzeylerinde önemli bir değişiklik olduğu, buna karşılık serbest ve enkapsüle örnekler arasında önemli bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar Homayouni *et al.* (2008); Jurkiewicz *et al.* (2011) ve Karthikeyan *et al.* (2014) tarafından da elde edilmiş, 90 günlük depolama süresi sonunda dondurmalarındaki serbest ve enkapsüle *Lactobacillus casei* Lc-01, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Bifidobacterium lactis* BI-04, *L. acidophilus* (LA-5) bakterilerinin canlılıklarında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte Homayouni *et al.* (2008) ve Karthikeyan *et al.* (2014)'nın çalışmalarında, sözkonusu enkapsüle mikroorganizmalar, 180 günlük depolama süresi sonunda serbest mikroorganizmalara göre çok daha yüksek oranda canlılıklarını sürdürmüşlerdir. Dolayısıyla mikroenkapsüllemenin etkisinin, 120

günden daha uzun bir depolama süresinin sonunda gerçekleştiğini söylemek mümkün olacaktır.

4.3. Duyusal Analiz

Serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurmalara ait renk ve görünüş, yapı ve kıvam, tat ve koku ile toplam kabul edilebilirlik duyuşal değerlendirme sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Çizelgelerde belirtilen puanlar, 10 farklı panelistin 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilen duyuşal analizde 1-5 puan aralığında yapılan değerlendirmelerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. Serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurmalara ait duyuşal analizsonuçları

Dondurma Örnekleri	Renk ve Görünüş	Yapı ve Kıvam	Tat ve Koku	Toplam Kabul Edilebilirlik
Enkapsüle	4,06±0,82	3,63±0,96	3,97±0,80	3,72±0,85
Serbest	4,43±0,70	4,11±0,71	4,24±0,68	4,22±0,62

Çizelge 4.11'de de görüldüğü üzere, yapılan istatistiksel analiz sonucunda serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurma örneklerinin, yapı ve kıvam ile toplam kabul edilebilirlik özellikleri üzerinde önemli seviyede ($p<0,05$) farklılık arz ettiği; renk ve görünüş ile tat ve koku parametreleri arasındaki farkın ise istatistiksel açıdan önemsiz olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.11. Serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurmaların duyu analizi puanlarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Renk ve Görünüş				Yapı ve Kıvam			
	SD	KO	F	Anlamlılık	SD	KO	F	Anlamlılık
Dondurma Örnekleri	1	2,017	3,417	0,070	1	3,408	4,732	0,034*
Varyasyon Kaynakları	Tat ve Koku				Toplam Kabul Edilebilirlik			
	SD	KO	F	Anlamlılık	SD	KO	F	Anlamlılık
Dondurma Örnekleri	1	1,093	1,964	0,166	1	3,750	6,703	0,012*

*p<0,05 seviyesinde önemli

Deneme dondurma örneklerinin yapı ve kıvam özelliklerine ait duyu analizi puan ortalamalarının One Way ANOVA varyans analizi sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Deneme dondurma örneklerinin yapı ve kıvam özelliklerine ait duyu analizi puan ortalamalarının One Way ANOVA varyans analizi sonuçları

Dondurma örnekleri	N	Yapı ve Kıvam	
		Ortalama	Standart Sapma
Serbest	30	4,11	0,71 a
Enkapsüle	30	3,63	0,96 b

Farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistik olarak birbirinden farklıdır (p<0,05).

Yapılan duyu analizi sonuçlarına göre enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurma örnekleri yapı ve kıvam özellikleri bakımından genel olarak daha düşük puanlarla değerlendirilmiştir. Buna karşılık bazı panelistlerin enkapsüle bakteri içeren dondurma örneklerine ait yapı ve kıvam puanları “iyi” olarak değerlendirilen 4.0 ve üzerinde olmuştur (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Dondurma örneklerinin ortalama yapı ve kıvam değerlendirme puanları

Dondurma Tipi	Panelist No	Yapı ve Kıvam
		Ortalama Puan
Serbest	1	5,0 ± 0,0
	2	4,0 ± 1,0
	3	4,0 ± 0,0
	4	4,3 ± 0,5
	5	3,6 ± 0,5
	6	4,6 ± 0,5
	7	3,8 ± 0,7
	8	3,6 ± 1,1
	9	4,0 ± 1,0
	10	3,9 ± 0,1
Mikroenkapsüle	1	5,0 ± 0,0
	2	3,0 ± 1,0
	3	3,0 ± 0,0
	4	3,3 ± 0,5
	5	4,6 ± 0,5
	6	4,3 ± 0,5
	7	4,0 ± 0,5
	8	3,0 ± 1,0
	9	2,3 ± 0,5
	10	3,6 ± 0,1

Deneme dondurma örneklerinin genel kabul edilebilirlik özelliklerine ait duyuşal değerlendirme puan ortalamalarının One Way ANOVA varyans analizi sonuçları Çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Deneme dondurma örneklerinin toplam kabul edilebilirlik özelliklerine ait duyuşal değerlendirme puan ortalamalarının One Way ANOVA varyans analizi sonuçları

Dondurma örnekleri	N	Toplam Kabul Edilebilirlik	
		Ortalama	Standart Sapma
Serbest	30	4,22	0,62 a
Enkapsüle	30	3,72	0,85 b

Farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p < 0,05$).

Yapılan duyuşal analiz sonuçlarına göre enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 içeren dondurma örnekleri toplam kabul edilebilirlik özellikleri bakımından genel olarak daha düşük puanlarla değerlendirilmiştir (Çizelge 4.15). İstatistiksel analiz sonucunda da dondurma örneklerinin toplam kabul edilebilirlik özellikleri üzerinde örnekler arasındaki farkın, önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çizelge 4.15. Dondurma örneklerinin ortalama toplam kabul edilebilirlik değerlendirme puanları

Dondurma Tipi	Panelist No	Toplam Kabul Edilebilirlik
		Ortalama Puan
Serbest	1	5,0 ± 0,0
	2	4,1 ± 0,5
	3	4,0 ± 0,0
	4	5,0 ± 0,0
	5	4,3 ± 0,5
	6	4,3 ± 0,7
	7	3,9 ± 0,4
	8	3,6 ± 0,5
	9	4,0 ± 1,0
	10	3,8 ± 0,1
Mikroenkapsüle	1	5,0 ± 0,0
	2	3,6 ± 0,2
	3	4,0 ± 0,0
	4	3,3 ± 0,5
	5	4,6 ± 0,5
	6	4,0 ± 0,0
	7	3,8 ± 0,5
	8	2,6 ± 0,5
	9	2,3 ± 0,5
	10	3,7 ± 0,0

Enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356'nın kullanıldığı dondurma örneklerine eklenen kapsüllerin duyuşal yönden etkisini değerlendirmek amacıyla, panelistlerden özellikle tat ve koku ile yapı ve kıvam değerlendirmeleri sırasında dondurma örneklerinin ağızda

herhangi bir pürüzlü yapı veya olumsuz bir his uyandırıp uyandırmadığına dikkat etmeleri istenmiştir. Yapılan duyuşal değerlendirmelerde bazı panelistler tarafından dūşölen özel notlarda, çeşitli dondurma örneklere için “tekstürel yapısı, bilinen dondurma özelliğinde değil”, “homojen olmayan bir yapı”, “belirgin bir boncuğumsu kümelenme”, “iyi erimemiş nişasta benzeri bir yapı” ifadeleri yer almıştır. Bu bağlamda panelistlerin, enkapsüle probiyotik bakteri ilave edilen dondurmaları, geleneksel dondurma tüketim alışkanlıklarından farklı olarak değerlendirdiği söylenebilir. Bazı örneklere de homojen olmayan bir yapıdan söz edilmesini, kapsöllerin dondurma içerisinde iyi bir şekilde karışmaması ve bunun sonucunda belli bir bölgede kapsöllerin toplanması ile açıklamak mümkündür. Öte yandan kapsöller dondurmalara ilave edilmeden önce bir süre saf suda bekletilmesine rağmen, kapsöllerin eldesinde CaCl_2 çözeltisi kullanıldığından dolayı çok hafif derecede bir tuzluluk tadına sahip olduğu da ifade edilmiştir. Kapsöllerin ağızda meydana getirdiği “yabancı madde” hissi dışında renk, görünüş ve koku açısından herhangi bir olumsuzluk ifade edilmemiştir. Tüm bunların dışında, bazı panelistler tarafından dondurma içerisindeki kapsöller ilgi çekici bulunarak ağızda güzel bir his uyandırdığı ifade edilmiş ve toplam kabul edilebilirlik puanlamaları “iyi-tüketebilirim” olarak değerlendirilen 4.0 ve üzerinde olmuştur. Buna ilaveten kapsöllerin, çikolatalı veya farklı meyve aromalı soslarla kaplanmasıyla daha cezbedici bir görünüm oluşabileceği şeklinde fikirler de ileri sürölmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada; destek materyali olarak aljinat kullanılarak gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işleminin, probiyotik *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özellikleri üzerine etkileri ve mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin dondurma üretiminde kullanılabilirliği değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Araştırmada ortaya çıkan veriler ve konuyla ilgili literatür bilgilerinin değerlendirilmesiyle elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. Çalışma kapsamında, serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 probiyotik bakteri suşu içeren dondurmaların soğuk depolama süresince canlı bakteri sayılarında anlamlı bir azalma belirlenmiş, ancak örnekler arasında önemli bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Hem serbest hem de enkapsüle *L. Acidophilus* ATCC 4356 probiyotik bakteri suşunun, 90 günlük depolama süresi sonundayaklaşık %89 oranında canlılığını sürdürebilmesi, enkapsülasyon işleminin bakteriye ilave bir koruyucu etki sağlamadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır. Örnekler arasında önemli bir farkın olmaması; gerek probiyotik *L. acidophilus* ATCC 4356 bakteri suşunun karakteristik özelliği olarak soğuğa karşı direnç göstermesi, gerekse de dondurmanın süt proteinleri (%3,4), yağ (%6,7) ve laktoz gibi süt bileşenlerini yoğun şekilde içermesi ve bu sayede probiyotik bakterileri koruması hatta çevreleyerek bir nevi kapsüllemesi neticesinde gerçekleşebileceği, buna ilave olarak pH değerinin probiyotik mikroorganizmaların yaşaması için uygun olmasından (pH:5.5-6.5) kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu bağlamda gelecekte yapılacak çalışmalarda hayvan modelleri kullanımının yanı sıra başlangıç hücre sayıları, boncuk büyüklüğü, kaplama materyali seçimi ve konsantrasyonu ile taşıyıcı gıda maddesi seçimi gibi diğer parametreler incelenerek bağırsak bakterileri üzerinde mikrokapsüllemenin etkisini izlemek gerekmektedir.

Diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi probiyotik bakterilerin de canlılık ve gelişimleri sıcaklık ve çevresel koşullardan etkilenmektedir. Dondurma üretiminde de söz konusu bakterilerin hücre duvarları hasar görmekte, depolama sırasındaki (özellikle 4. aydan itibaren) sıcaklık dalgalanmaları üründe buz kristallerinin oluşmasına neden olarak bakteri hücrelerinin membran kırılmasını artırmaktadır. Ayrıca hücre içerisinde oluşan buz nedeniyle de hasarlar meydana gelmektedir. Dolayısıyla depolama süresince bakteri canlılıklarında azalma söz konusu olmaktadır. Bu nedenle probiyotik dondurma üretiminde miksin bakterilerle aşılmasından sonra hızlı bir şekilde dondurulması ve depolama sırasında etkili sıcaklık kontrolü, son üründe probiyotiklerin arzu edilen düzeyde canlılığını koruması, bakterinin sağlığa yararlı etkilerini göstermesi açısından son derece önemlidir.

2. Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF), sağlık etkisinden yararlanabilmek için probiyotik bakterilerin gıdanın tüketimi sırasında en az 10^7 kob/g olarak sunulması gerektiğini önermiştir (Karthikeyan *et al.* 2014). Dondurmaların 90 günlük depolama periyodu boyunca, serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* ATCC 4356 sayılarının 10^7 kob/g'ın altına düşmemiş olması son üründe probiyotiklerin arzu edilen düzeyde canlılığını koruduğunu, dolayısıyla bakterinin terapotik ve koruyucu özelliklerini göstermesi açısından dondurmanın iyi bir probiyotik süt ürünü olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

3. Dondurma örneklerinin panelistler tarafından duyusal özellikleri yönüyle (renk, görünüş, yapı, kıvam, tat, koku ve toplam kabul edilebilirlik) değerlendirilmesi sonucunda mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin eklendiği dondurma örneklerinin ağızda pürüzlü bir yapı dolayısıyla olumsuz bir his uyandırdığı ifade edilmiş; bu durum, söz konusu ürünlerde yapı ve tekstürün damak tadına uygun şekilde geliştirilmesi gerektiği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Panelistler tarafından renk, görünüş ve koku açısından herhangi bir olumsuzluk ifade edilmemiş; kapsüllerin, geleneksel dondurma tüketim alışkanlıklarından farklı olarak ağızda meydana getirdiği “yabancı madde” hissi dolayısıyla toplam kabul edilebilirliği düşük kalmıştır. Panelistlere duyusal

muayene öncesinde kapsüllerin içeriği hakkında bilgi verilmesi, dondurmalar üzerinde ilk gözlem esnasında oluşabilecek olumsuz izlenimi kırmış, bilinçli tüketime bağlı olarak kabul edilebilirlik artmıştır. Hayatımızın her anında bakterilerle iç içe yaşamamıza karşın, herhangi bir üründe -yararlı dahi olsa- bakterilerin kapsüller içerisine hapsedilmiş olması ve bu kapsüllerin net olarak görülmesi, tüketicilerde ister istemez bir çekince oluşturmuştur. Dolayısıyla bundan sonra yapılacak başka çalışmalarla probiyotik kültürlerle desteklenen dondurmalar ile ilgili eğitici kampanyaların düzenlenmesi ve tüketicilere bu ürünlerin yararını benimsetecek çalışmalara ağırlık verilmesi gerekmektedir. Bu manada gıda endüstrisinde bu amaca yönelik projeler yapılıp uygulama alanları oluşturularak laboratuvar çalışması halindeki birçok çalışmanın pratikte uygulanabilme imkânı sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Adhikari, K., Mustapha A. and Grün I.U., 2003. Survival and Metabolic Activity of Microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Stirred Yogurt. *Journal of Food Science*, 68(1), 275-280
- Anal A. K. and Singh H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 240-251.
- Annan, N.T., Borza A.D. and Hansen L. T., 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, 41(2), 184-193.
- 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.
- Chandramouli, V., Kailasapathy K., Peiris P. and Jones 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
- Coşkun, T., 2005. Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*; 48: 69-84
- Coşkun, T., 2006. Pro-, Pre ve Sinbiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 49: 128-148
- Çakır, İ. ve Çakmakçı M. L., 2004. Probiyotikler: Tanımı, Etki Mekanizması, Seçim ve Güvenilirlik Kriterleri, *Gıda*, 29 (6), 427-434.
- Çakır, İ., 2006. Mikroenkapsülasyon Tekniğinin Probiyotik Gıda Üretiminde Kullanımı. *Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, 24-26 Mayıs, Poster Bildiriler Kongre Kitabı*, 693-696.
- Davidson, R. H., Duncan S. E., Hackney C. R., Eigel W. N. and Boling J. W., 2000. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yoğurt characteristics. *Journal Dairy Science*, 83, 666-673.
- Desai, K. 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), 446-450.
- Donkor, O. N., 2007. Influence of probiotic organisms on release of bioactive compounds in yoghurt and soy yoghurt. *Victoria University, School of Molecular Sciences, Faculty of Health, Engineering and Science, PhD Thesis, 2007.*
- 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.

- Gismondo, M.R. and Drago L., 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobiol Agents*, 12, 287-292.
- Gorbach, S. L., 2002. Probiotics in the third millennium. *Digestive and Liver Disease*, 34, 52-57.
- Göksungur, Y. ve Güvenç U., 2002. Kalsiyum Aljinatta Hücre İmmobilizasyonu ve Biyoteknolojideki Uygulamaları. *Gıda*, 27 (6), 511-518.
- Granato, D., Branco G. F., Nazzaro F., Cruz A.G. and Faria J. A. F., 2010. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, Volume 9, Issue 3, pages 292–302.
- Guerin, D., Vuilleumard J. C. and Subirade M., 2003. Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. *Journal of Food Protection* 66: 2076–2084.
- Heidebach, T., Först P. and Kulozik U., 2009. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids* 23: 1670–1677.
- Hekmat, S. and McMahon D.J., 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as probiotic food. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1415–1422.
- Heyman, M. and Ménard S., 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59: 001–15
- Holzapfel, W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. and Schillinger U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.*; Vol. 73 no.2 365s-373s. Review.
- 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 symbiotic ice-cream. *Food Chemistry* 111(1): 50–55.
- ISP. 2006. Alginates in foods, Technical User Guide, ISP (International Specialty Products), p. 28.
- İşleyen M. F., 2010. Mikroenkapsülasyon Tekniğinin *L. acidophilus* KPb4b ve *L. rhamnosus* KPb7 Probiyotik Kültürlerinin Stabilitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Bolu, Türkiye, 93s.
- Jurkiewicz, C., Boscarioli M. P. M., Ferreira R. G., Ribeiro E. P., Prieto W. H., Kunigk L., 2011. Microencapsulation of Probiotic Bacteria with Alginate and Prebiotic and Evaluation of Survival in Ice Cream. *Maua Institute of Technology, São Caetano do Sul, Brazil*.
- Kaçar, A. ve Şahan, N., 2004. Yağ ikame maddeleri kullanılarak üretilen enerjisi azaltılmış dondurmaların kimyasal özellikleri. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. (8), 7-13.
- Kaleli İ., 2007. Probiyotiklerin Etki Mekanizması. *ANKEM Dergisi*; 21(Ek 2):238-242
- Karthikeyan N., Elango A., Kumaresan G., Gopalakrishnamurthy T.R. and Raghunath B.V., 2014. Enhancement of Probiotic Viability in Ice Cream By Microencapsulation. *International Journal of Science, Environment and Technology*, Vol. 3, No 1, 339 – 347.
- Kim, Se-Jin., Cho S.Y., Kim S.H., Song Ok-Ja., Shin S., Cha D.S. and Park H.J., 2008.

- Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. LWT, 41, 493–500.
- Klaenhammer, R. and Kullen J. M., 1999. Selection and design of probiotics. International Journal of Food Microbiology, 50, 45-57.
- Krasaekoopt, W., Bhandari B. and Deeth H., 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal, 13, 3-13.
- Kurt A., 2012. Probiyotik kullanımının preterm yenidoğanların yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlemi sırasında oluşabilecek dirençli mikroorganizma kolonizasyonuna etkisi. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Neonatoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye, 54s.
- Limdi, J. K., O'Neill C. and McLaughlin J., 2006. Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology?, World J Gastroenterol;12(34):5447-57.
- Liserre, A. M., Ré M. I. and Franco B. D. G. M., 2007, Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. Food Biotechnology, 21(1), 1-16.
- Mandal, S., Puniya A. K. and Singh K., 2006. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. International Dairy Journal, 16(10), 1190-1195.
- 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), 1-18.
- Muthukumarasamy, P. and Holley R.A., 2006. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. International Journal of Food Microbiology, 111: 164–169.
- Ortakçı, F., 2010. Probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonla sağlığa yararlı etkilerinin artırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Erzurum, Türkiye, 50s.
- Özer, B., Kırmacı 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
- Özer, B., Uzun Y. S. and Kırmacı H. A., 2008. Effect of Microencapsulation Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 During Kasar Cheese Ripening. International Journal of Dairy Technology, 61 (3), 237-244.
- Picot, A. and Lacroix C., 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Dairy Journal 14: 505-515.
- Poshadri, A and Kuna A., 2010. Microencapsulation Technology: A review, Journal of Research. ANGRAU, 38 (1), 86 – 102.
- Reid, A. A., Vuilleumard J. C., Britten M., Arcand Y., Farnworth E. and Champagne C. P., 2005. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. Journal of Microencapsulation, 22(6), 603-619.

- Salminen, S., Ouwehand A., Benno Y. and Lee K., 1999. Probiotics: How should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*, 10, 107-110.
- Shafiei, Y., Razavilar V., Javadi A., Mirzaei H., 2012. Survivability of free and microencapsulated *Lactobacillus plantarum* with alginate and resistant starch in simulated gastrointestinal conditions. *J Food Agricult Environ* 10(3&4):207–212
- Shah, N. P., 2000. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 83, 894-907
- Sheu, T. Y., Marshall R. T. and Heymann H., 1993. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76 (7), 1902-1907.
- 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.
- Şener A., 2009. Serbest ve Mikroenkapsüle Probiyotik Bakterilerin Ticari Dondurma Üretiminde Kullanılabilirliği Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, 139s.
- Şimsek, O., Tuncay İ. ve Bilgin, B., 2006. Endüstriyel dondurma üretiminde farklı stabilizör kullanımının dondurma kalitesine etkisi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3 (1)
- Talwalkar, A., Kailasapathy K., Peiris P. and Arumugaswamy R., 2001. Application of RBGR- a simple way for screening of oxygen tolerance in probiotic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 245-248.
- Tsen, J., Huang H., Lin Y. and King V. A., 2007. Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. *Journal of Microbiological Methods*, 70(3), 561-564.
- Wandrey C., Bartkowiak A. and Harding S.E., 2009. Materials for Encapsulation In: Zuidam N.J., Nedovic, V.A. (Eds.) *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*, Springer: Dordrecht, The Netherlands; p. 31-100.
- Yağcı, R. V., 2007. Probiyotikler Prebiyotikler Sağlıkta ve Hastalıkta. *Ankem Dergisi*; 21(Ek 2):243-245
- Yılsay, T. Ö. ve Kurdal E., 2000. Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı. Tekirdağ, 279-286.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimlerini sırasıyla, Beyoğlu Piripaşa İlköğretim Okulu ve İstanbul Kasımpaşa Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden mezun oldu. Lisans eğitiminin ardından aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığı'nda Gıda Teknolojisi Öğretmeni olarak göreve başladı. 2011 yılı Şubat ayında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Oltu Mesleki Eğitim Merkezinde Gıda Teknolojisi Öğretmeni olarak görev yapmakta olup evli ve bir çocuk babasıdır.