

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Lactobacillus acidophilus KPb4b SUŞUNUN FARKLI
YÖNTEMLERLE MİKROENKAPSÜLASYONU VE BU
YÖNTEMLERİN BAKTERİ CANLILIĞI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN YANIT YÜZEY YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

M. FATİH İŞLEYEN

BOLU, EYLÜL - 2018

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



Lactobacillus acidophilus KPb4b SUŞUNUN FARKLI
YÖNTEMLERLE MİKROENKAPSÜLASYONU VE BU
YÖNTEMLERİN BAKTERİ CANLILIĞI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN YANIT YÜZEY YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

M. FATİH İŞLEYEN

BOLU, EYLÜL - 2018



Eşime ve Oğluma,

KABUL VE ONAY SAYFASI

Muhammet Fatih İŞLEYEN tarafından hazırlanan “*Lactobacillus acidophilus* KPb4b Suşunun Farklı Yöntemlerle Mikroenkapsülasyonu ve Bu Yöntemlerin Bakteri Canlılığı Üzerine Etkilerinin Yanıt Yüze Yöntemi ile Belirlenmesi” adlı tez çalışması Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda 04/09/2018 tarihinde BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Danışman
Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

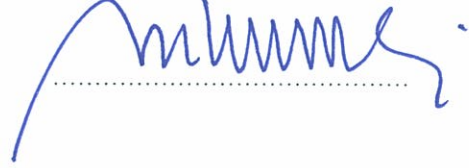
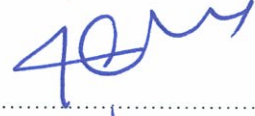
Üye
Prof. Dr. Ömer ZORBA
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Prof. Dr. Mehmet AKBULUT
Selçuk Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR
Sakarya Üniversitesi

Üye
Dr. Öğr. Üyesi İlker Turan AKOĞLU
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

İmza



Mezuniyet Tarihi :

Doç. Dr. Ömer ÖZYURT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

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

M. Fatih İŞLEYEN

ÖZET

***Lactobacillus acidophilus* KPb4b SUŞUNUN FARKLI YÖNTEMLERLE
MİKROENKAPSÜLASYONU VE BU YÖNTEMLERİN BAKTERİ
CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN YANIT YÜZEY YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ
DOKTORA TEZİ
M. FATİH İŞLEYEN
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)**

BOLU, EYLÜL - 2018

Bu çalışmada, daha önceki araştırmalarımız sonucu elde edilen bilgiler ışığında Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan, potansiyel probiyotik özellikleri belirlenmiş ve moleküler genetik yöntemlerle kesin tanısı yapılmış *Lactobacillus acidophilus* KPb4b suşu kullanılmıştır. Çalışma kapsamında bu potansiyel suşun emülsiyon tekniği, elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi ve çift tabaka kaplama (elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi ile birinci kaplama üzerine kitosan ile ikinci tabaka kaplama) yöntemi ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonunda yanıt yüzey yöntemi kullanılarak mikroorganizma canlılığının korunmasında kullanılabilir uygun parametreler belirlenmeye çalışılmıştır.

Araştırma sonuçlarına göre, analiz başlangıç ve sonundaki canlı mikroorganizma sayısı arasındaki fark değerlerinin düşük olması bakterinin analiz koşullarına dayanımının yüksek olduğunu göstermiştir.

Araştırma sonuçlarına göre aljinat konsantrasyonunun etkisinin ($P<0,01$) düzeyinde çok önemli olduğu, ayrıca bu faktörlerden aljinat konsantrasyonu ve kitosan konsantrasyonunun interaksiyon etkisinin de ($P<0,01$) düzeyinde çok önemli olduğu tespit edilmiştir.

Araştırma sonuçlarına göre elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi ile kaplama ve çift tabaka (Elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi + kitosan) ile kaplama yöntemlerinde mikroenkapsül boyutlarına, aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin çok önemli düzeyde ($P<0,01$) etki ettiği sonucuna varılmıştır ve ayrıca emülsiyon tekniğinde aljinat konsantrasyonunun önemli düzeyde ($P<0,05$) etkili olduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Lactobacillus acidophilus*, kitosan mikroenkapsülasyon, yüzey yanıt yöntemi.

ABSTRACT

MICROENCAPSULATION OF *Lactobacillus acidophilus* KPb4b STRAIN BY DIFFERENT METHODS AND DETERMINATION OF THEIR EFFECTS ON BACTERIAL VIABILITY BY RESPONSE SURFACE

METHODOLOGY

PHD THESIS

M.FATİH İŞLEYEN

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF
NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)

BOLU, SEPTEMBER 2018

In this study, in the light of information obtained from previous researches, *Lactobacillus acidophilus* KPb4b strains, the potential probiotic properties of which were identified in the culture collection of Food Microbiology Research Laboratories Department of Faculty of Engineering and Architecture of Bolu Abant İzzet Baysal University and confirmed by molecular genetic methods, were used. In the scope of this study, microencapsulation was carried out by the emulsion technique of potential strain, electrostatic vibration / dripping method and double layer coating (second layer coating with chitosan on the first coating performed by the electrostatic vibration / dripping method). At the end of the study, it was tried to determine the appropriate parameters to be used to protect the viability of microorganism by using the response surface methodology.

According to the results of the study, the difference in the number of viable microorganisms at the beginning and at the end of the analysis was low, indicating that the resistance of the bacteria to the analysis conditions was high.

According to the results of the study, the effect of aljinat concentration was very important ($p<0.01$), and the interaction effect of aljinat concentration and chitosan concentration) was also very important ($p<0.01$).

According to the results of the study, it was concluded that the alginate concentration and calcium chloride molarity in the coating and double layer (electrostatic vibration/dripping method + kitosan) coating methods significantly influenced the microencapsul size as a consequence of ($p<0.01$) and besides it was detected that aljinat concentration was significantly effective on the size ($p<0.05$) in the emulsion technique.

KEYWORDS: *Lactobacillus acidophilus*, chitosan, microencapsulation, response surface methodology

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ABSTRACT.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xiii
TEŞEKKÜR	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1 Probiyotikler	3
2.1.1 Probiyotiklerin Tanımı.....	3
2.1.2 Probiyotik Etkinin Bilimsel Temeli ve Mekanizması.....	3
2.1.3 Probiyotik Mikroorganizma Seçim Kriterleri.....	5
2.2 Mikroenkapsülasyonun Tanımı ve Kullanılan Teknikler.....	7
2.3 Gıda Teknolojisinde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları.....	12
2.4 Probiyotik Kültürlerde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları	13
2.5 Mikroenkapsülasyon Uygulamalarında Yanıt Yüzey Yönteminin Kullanımı.....	16
2.6 Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Bazı Kaplama Materyalleri	17
2.6.1 Aljinat	17
2.6.2 Kitosan.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1 Materyal.....	20
3.1.1 Mikroorganizma Kültürü ve Mikroenkapsülator	20
3.2 Yöntem	20
3.2.1 Bakteri Kültürünün Hazırlanması ve Mikroorganizma Sayımı ...	20
3.2.2 Mikroenkapsülasyon İşlemi.....	21
3.2.2.1 Emülsiyon Tekniği ile Kaplama	21
3.2.2.2 Elektrostatik Titreşim/ Damlatma Yöntemi ile Kaplama.....	21
3.2.2.3 Elektrostatik Titreşim/ Damlatma Yöntemi ve Kitosan ile Çift Tabaka Kaplama.....	22
3.2.3 Mikrokapsüllerin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi.....	23
3.2.3.1 Mikrokapsüllerin Depolama Stabilitesinin Belirlenmesi	23
3.2.3.2 Mikrokapsüllerin Yapay Mide Ortamındaki Stabilitesi.....	23
3.2.3.3 Mikrokapsüllerin Yapay İncebağırsak Ortamındaki Stabilitesi23	
3.2.3.4 Mikrokapsüllerin Boyutlarının Belirlenmesi	24

3.2.4	Yanıt Yüzey Yöntemi Deneme Deseni ve İstatistiksel Analizler	24
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	26
4.1	ETDY ve ETDYK Kaplama Yöntemleri ile Kaplamanın Depolama Başlangıç ve Son Haftası Üzerine Bakteri Canlılığına Etkisi	26
4.2	ETDY ve ETDYK Kaplama Yöntemlerinin Yapay İnce Bağırsak Ortamında (pH 6,8'de) Mikroorganizma Canlılığı Üzerine Etkileri	31
4.3	ETDY ve ETDYK Kaplama Yöntemlerinin Yapay Mide Ortamında Mikroorganizma Canlılığı Üzerine Etkileri	35
4.4	ETDY ve ETDYK Kaplama Yöntemlerinin Partikül Boyut Sonuçları	39
4.5	Emülsiyon Tekniği ile Kaplama Depolama Sonuçları	44
4.6	Emülsiyon Tekniği ile Üretilen Mikrokapsüllerin Yapay İnce Bağırsak Ortamındaki Canlılık Sonuçları	48
4.7	Emülsiyon Tekniği ile Üretilen Mikrokapsüllerin Yapay Mide Ortamındaki Canlılık Sonuçları	52
4.8	Emülsiyon Tekniği ile Üretilen Probiyotik Mikrokapsüllerinin Parçacık Boyut Analizleri Sonuçları	56
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	61
6.	KAYNAKLAR	64
7.	EKLER	76
EK A.1	Elektrostatik titreşim tekniği depolama analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi	76
EK A.2	Elektrostatik titreşim tekniğinde kitosan ve aljinatın, bakteri canlılığına, depolama boyunca intereksiyon etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği	77
EK B.1	Elektrostatik titreşim tekniği pH6,8 analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi	78
EK B.2	Elektrostatik titreşim tekniğinde kitosan ve aljinat konsantrasyonunun, bakteri canlılığına, pH 6,8'deki etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği	79
EK C.1	Elektrostatik titreşim tekniği pH 2 analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi	80
EK C.2	Elektrostatik titreşim tekniğinde kitosan ve aljinat konsantrasyonunun, bakteri canlılığına, pH 2'deki etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği	81
EK D.1	Elektrostatik titreşim tekniği partikül boyut analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi	82
EK D.2	Elektrostatik titreşim tekniğinde kitosan ve aljinat konsantrasyonunun, bakteri boyutuna etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği	83
EK E.1	Emülsiyon tekniği, depolama analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi	84
EK E.2	Emülsiyon tekniğinde aljinat ve bitkisel yağın, bakteri canlılığına, depolama boyunca intereksiyon etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği	85
EK F.1	Emülsiyon tekniği, pH 6,8 analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi	86
EK F.2	Emülsiyon tekniğinde aljinat ve bitkisel yağın, bakteri canlılığına, pH 6,8'de intereksiyon etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği	87
EK G.1	Emülsiyon tekniği pH 2 analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi	88
EK G.2	Emülsiyon tekniğinde aljinat ve bitkisel yağın, bakteri canlılığına, pH 2'de intereksiyon etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği	89

EK H.1 Emülsiyon tekniği partikül boyut analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi	90
EK H.2 Emülsiyon tekniğinde aljinat ve bitkisel yağın, partikül boyutuna, intereksiyon etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği.....	91
8. ÖZGEÇMİŞ.....	92



ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 4.1** ETDY ve ETDYK yöntemleri ile kaplanan mikrokapsüllerin aljinat ve kitosan konsantrasyonunun depolamada bakteri canlılığı üzerine etkisi29
- Şekil 4.2** ETDY ve ETDYK yöntemleri ile kaplanan mikrokapsüllerin aljinat ve itosan konsantrasyonunun (pH 6,8’de) bakteri canlılığı üzerine etkisi34
- Şekil 4.3** ETDY ve ETDYK yöntemleri ile kaplanan mikrokapsüllerin aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin (pH 2’de) bakteri canlılığı üzerine etkisi.....38
- Şekil 4.4** ETDY ve ETDYK yöntemleri ile kaplanan mikrokapsüllerin, aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin partikül boyut üzerine etkisi.....42
- Şekil 4.5** Emülsiyon tekniği ile kaplanan mikrokapsüllerin, aljinat ve bitkisel yağ konsantrasyonunun depolamada bakteri canlılığı üzerine etkisi.....47
- Şekil 4.6** Emülsiyon tekniği ile kaplanan mikrokapsüllerin, aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin (pH 6,8’de) bakteri canlılığı üzerine etkisi.....51
- Şekil 4.7** Emülsiyon tekniği ile kaplanan mikrokapsüllerin, aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin (pH 2’de) bakteri canlılığı üzerine etkisi.....55
- Şekil 4.8** Emülsiyon tekniği ile kaplanan mikrokapsüllerin, aljinat ve Bitkisel yağ konsantrasyonunun partikül boyut üzerine etkisi.....59

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar.....	4
Çizelge 2.2 Probiyotik mikroorganizma seçim kriterleri	6
Çizelge 3.1 Mikroenkapsülasyon işleminde uygulanan çalışma parametreleri ...	22
Çizelge 3.2 ETDY ve ETDYK kaplama yöntemlerinde kullanılan deneme deseni	24
Çizelge 3.3 Emülsiyon tekniği yönteminde kullanılan deneme deseni.....	25
Çizelge 4.1 ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin depolama süresince mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri.....	27
Çizelge 4.2 Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl ₂ molaritesinin; depolama başlangıç ve son haftasındaki bakteri canlılığı üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları.....	28
Çizelge 4.3 ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin yapay ince bağırsak ortamında mikroorganizma canlılık sonuçları.....	32
Çizelge 4.4 Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl ₂ molaritesinin; yapay ince bağırsak ortamında, 0. ve 180. dakika bakteri canlılığı üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları.....	33
Çizelge 4.5 ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin yapay mide ortamında mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri	36
Çizelge 4.6 Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl ₂ molaritesinin; yapay mide ortamında, 0. ve 180. dakikalar arasında mikroorganizma canlılığı üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları.....	37
Çizelge 4.7 ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin parçacık boyutları.....	40
Çizelge 4.8 Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl ₂ molaritesinin; partikül boyut üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları.....	41
Çizelge 4.9 Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin depolama süresince mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri	45
Çizelge 4.10 Aljinat konsantrasyonu, Bitkisel Yağ konsantrasyonu ve CaCl ₂ molaritesinin, depolama başlangıç ve son haftasındaki bakteri canlılığı üzerindeki etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları.....	46
Çizelge 4.11 Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin yapay incebağırsak ortamındaki canlılık sonuçları.....	49
Çizelge 4.12 Emülsiyon tekniğinde aljinat konsantrasyonu, bitkisel yağ konsantrasyonu ve CaCl ₂ molaritesinin, yapay ince bağırsak ortamında 0-180. dakika arasında bakteri canlılığı üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları.....	50

Çizelge 4.13 Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin yapay mide ortamındaki canlılık sonuçları	53
Çizelge 4.14 Emülsiyon tekniğinde aljinat konsantrasyonu, bitkisel yağ konsantrasyonu ve CaCl_2 molaritesinin, yapay mide ortamında 0-180. dakika arasında bakteri canlılığı üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları.....	54
Çizelge 4.15 Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin parçacık büyüklükleri	57
Çizelge 4.16 Emülsiyon tekniğinde aljinat konsantrasyonu, bitkisel yağ konsantrasyonu ve CaCl_2 molaritesinin, mikrokapsüllerin parçacık boyutları üzerine etkilerine ait varyans analiz sonuçları.....	58



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

Kısaltmalar

A	: Aljinat
K	: Kitosan
CC	: Kalsiyum Klorür
BY	: Bitkisel Yağ
g	: Gram
mL	: Mililitre
KO	: Kareler Ortalaması
F	: F Değeri
SD	: Serbestlik Derecesi
ETDY	: Elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi
ETDYK	:Elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi ile birinci kaplama üzerine kitosan ile ikinci tabaka kaplama

Semboller

X	: Dizayn Matrisi
Y	: Yanıt Vektörü
X1	: Aljinat
X2	: Kitosan, Bitkisel Yağ
X3	: Kalsiyum Klorür
X1*X1	: Aljinatın Kuadratik Etkisi
X2*X2	: Kitosan, Bitkisel Yağın Kuadratik Etkisi
X3*X3	: Kalsiyum Klorürün Kuadratik Etkisi
X1*X2	: Aljinat X Kitosan, Bitkisel Yağ İntereksiyonu
X1*X3	: Aljinat X Kalsiyum Klorür
X2*X3	: Kitosan, Bitkisel Yağ X Kalsiyum Klorür İntereksiyonu

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca vermiő olduğu danıőmanlıėından ve anlayıőından dolayı, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR'a, BAP - 2013.09.01.629 no'lu proje kapsamında bu çalıőmayı destekleyen Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, yanıt yüzey tekniği deneme deseninin oluőturulmasında ve verilerin istatistiksel analizleri konusunda yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ömer ZORBA'ya ve daima yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.



1. GİRİŞ

Probiyotikler, yeterli sayıda alındıklarında konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösteren canlı mikroorganizmalardır. Probiyotikler yaygın olarak fermente süt ürünleri başta olmak üzere diğer fermente gıdalara katılarak, o gıdaya fonksiyonel özellik kazandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Uluslararası Sütçülük Federasyonu (International Dairy Federation, IDF) probiyotiklerden beklenen faydanın sağlanabilmesi için ürünün son kullanım tarihinde en az 10^7 KOB/mL canlı bakteri içermesini önermektedir (Sultana vd., 2000).

Diyet destekleyici olarak kullanılan probiyotik bakterilerin sindirim sisteminin kötü koşullarına dayanıklı olması gerekmektedir. Bununla birlikte birçok probiyotik bakterinin yüksek asitlik (düşük pH) ve safra tuzlarına karşı hayatta kalma kabiliyeti azdır (Holzapfel ve Schillinger, 2002; Çakır, 2003) ve tüketimden sonra, birçok probiyotik suş, midenin düşük pH'ına ve bağırsağın yüksek safra tuzu koşullarına maruz kaldıkça bakteri canlılığında önemli bir azalma olmaktadır (Huq vd., 2017).

Probiyotik mikroorganizma içeren fonksiyonel gıda üretiminde yüksek sıcaklık, kurutma, dondurma, yüksek basınç, asidik veya alkali ortam gibi engellerin yanı sıra, tüketimden sonra konakçı metabolizmasından kaynaklanan, sindirim sistemi enzimleri, yüksek asidik ortam ve safra tuzları gibi engeller de vardır. Probiyotik gıda üretiminde bu engellerin ortadan kaldırılması gerekmektedir.

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

Bu çalışmada, daha önceki araştırmalarımız sonucu elde edilen bilgiler ışığında Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan, potansiyel probiyotik özellikleri belirlenmiş ve moleküler genetik yöntemlerle (16S rRNA dizi analizi) kesin tanısı yapılmış *Lactobacillus acidophilus* KPb4b suşu kullanılmıştır. Çalışma kapsamında bu potansiyel suşun emülsiyon tekniği, elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi (ETDY) ve çift tabaka kaplama, elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi ile birinci kaplama üzerine kitosan ile ikinci tabaka kaplama (ETDYK) yöntemi ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonunda çalışılan mikroorganizmanın canlılığının korunmasında kullanılabilir en uygun enkapsülasyon yöntemi belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Probiyotikler

2.1.1 Probiyotiklerin Tanımı

Bugün kullandığımız probiyotik tanımı, Fuller (1992) tarafından geliştirilmiş olup; intestinal sistemin mikrobiyel dengesini geliştirerek konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan canlı, mikrobiyel diyet destekleyicisi anlamında kullanılmıştır. Kneifel vd. (1999) yaptıkları tanıma göre ise, probiyotikler, insan ve hayvan beslemede kullanılan probiyotikler; vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikroflorasına olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır.

İçerisinde konakçı sağlığı üzerine olumlu etkileri olan mikroorganizmaları içeren, çeşitli enzim, vitamin ve aroma bileşenleri ile desteklenerek direkt kapsül veya tablet haline getirilmiş diyet destekleyicilere “probiyotik ürün” denilmektedir. Bu tablet veya kapsüller “farmasötikaller” olarak da bilinmekte olup, hastalıkların tedavisinde ilaç yerine kesinlikle kullanılamamakta, sadece sağlık destekleyici ürünler olarak satılmaktadır. Bu preparatlar dondurarak kurutulmuş bakteri kültürlerinin kapsül veya tablet haline getirilmesi ile hazırlanmış olup; bazı hepatik hastalıklar, kabızlık ve antibiyotik tedavisi sonucu ortaya çıkan diyare gibi gastrointestinal düzensizliklerin önlenmesinde kullanılmaktadır (Ouwehand vd., 1999; Rolfe, 2000; Yücecan, 2002; Başyigit, 2004; Huq vd., 2017).

2.1.2 Probiyotik Etkinin Bilimsel Temeli ve Mekanizması

İnsan vücudu deri, ağız boşluğu, gastrointestinal ve ürogenital sistemler başta olmak üzere yüzlerce mikroorganizmanın yaşadığı dinamik bir ekosistemdir. İnsan vücudundaki toplam bakteriyel popülasyonun yaklaşık 10^{14} düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir (Yücecan, 2002). Çizelge 2.1’de probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar verilmiştir (Uymaz, 2010).

Çizelge 2.1 Probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Bacillus</i> türleri	<i>Pediococcus</i> türleri
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus cellebiosis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Leuconostoc</i> türleri
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	<i>Bacteriodes</i> türleri	Küfler
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptococcus</i> türleri	<i>Bacteriodes capillus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Bacteriodes suis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Bacteriodes ruminicola</i>	Mayalar
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Bacteriodes amylophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>Candida torulopsis</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	<i>Propionibacterium shermanii</i>	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
<i>Lactobacillus helveticus</i>			
<i>Lactobacillus salivarius</i>			
<i>Lactobacillus gasseri</i>			

Hastalık, yaşlılık, stres, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörler Intestinal ekosistemin fizyolojik dengesini etkileyebilmektedir (Rolfe 2000; Cedgard 2001). Bu düzensizlikler “disbiosis” olarak adlandırılmaktadır. İntestinal sistemde bulunan faydalı mikroorganizmaların sistemin fizyolojik dengesine olumlu yönde katkıda bulunmasına ise “probiyosis”, bu mikroorganizmalara da “probiyotik mikroorganizmalar” denilmektedir (Çakır vd., 2001; Çakır, 2003; Başyigit, 2004; Uymaz, 2010, Silva vd., 2018).

2.1.3 Probiyotik Mikroorganizma Seçim Kriterleri

Herhangi bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için sahip olması gereken kriterler Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Probiyotik olarak tanımlanmış bir mikroorganizmanın gastrointestinal bölgelerden geçerken metabolik ve biyolojik aktivitesini kaybetmemesi çok önemlidir. Ayrıca ticari üretimde ve son üründe suşun canlılığını ve istenen özelliklerini koruyabilmesi de probiyotik bakteriden beklenen özellikler arasındadır (Salminen vd., 1998; Gomes ve Malcata 1999; Ouwehand vd., 1999; Zhou vd., 2000).

Probiyotik özelliklere sahip ve klinik olarak etkisi kanıtlanmış suşlar genellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait türlerdir (Ouwehand vd., 1999; Laurens-Hattingh ve Viljoen, 2001; Binns 2013).

Yapılan bazı çalışmalara göre *Bifidobacterium bifidum* ve *Lactobacillus gasseri* gibi laktik asit bakterilerinin bağırsak mide ortamındaki bazı hastalıkları engellediği ortaya konulmuştur (You vd., 2004; Carroll vd., 2007).

Çizelge 2.2 Probiyotik mikroorganizma seçim kriterleri

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

2.2 Mikroenkapsülasyonun Tanımı ve Kullanılan Teknikler

2.2.1 Elektrostatik Titreşim Damlatma Yöntemi

Elektrostatik titreşim yöntemi, biyoaktif bileşenlerin oda sıcaklığında işlem görmesine izin verdiği için umut verici bir teknoloji olarak ortaya çıkmaktadır (Mascaraque ve Rubio 2016).

Polimerik sıvıların elektro hidrodinamik işlenmesine dayanan bir tekniktir. besleme solüsyonunu veya emülsiyonunu yüksek voltajlı bir elektrik alanına tabi tutarak, polimer jetinin pompalandığı iletken bir kılcal damardan bir toplayıcıya atılmasını sağlar. Sıvı, içinde üretilen elektrostatik kuvvetlerden dolayı, küçük damlacıklara bölünür ve mikro partiküller şeklinde toplayıcı üzerine düşer (Mascaraque vd., 2017).

2.2.2 Emülsiyon Yöntemi

Katı, sıvı veya gaz formundaki bir maddenin veya karışımın başka madde ile kaplanmasına enkapsülasyon denilmektedir (Madene vd., 2006). Küçük katı partikülleri, sıvı damlacıkları ve gaz halindeki materyalleri yararlı özellikleri korunarak bir kaplama materyali içerisine paketlenip kapsüller haline dönüştürülmesi ve uygun koşullarda salınımının sağlanması ise mikroenkapsülasyon olarak tanımlanmaktadır (Gouin, 2004; Desai ve Park 2005; Gharsallaoui vd., 2007; Anal ve Singh 2007).

Günümüzde, mikrokapsülleme, duyarlı mikro boyutlu maddeleri dış ortamdan korumayı ve kontrollü bir salınmayı mümkün kılmaktadır. Aktif bileşen çekirdek malzeme olarak adlandırılır ve kapsülleyici veya duvar malzemesi olarak adlandırılan ikinci bir malzemenin bir kabuğu içinde geçici olarak korunabilir. Mikroenkapsülleme, gıda matrisinde aktif maddenin düzgün bir şekilde dağılmasını teşvik etmekte ve istenmeyen reaksiyonları önlemek için, daha kolay bir kullanıma izin vermektedir (Paulo ve Santos 2017).

Mikroenkapsülasyon gıda üretimi, tarım, atık su arıtma, haşere kontrolü, çevresel dekontaminasyon, terapötik ajanlar, enzimler ve biyoyakıt üretimi gibi farklı

sektörlerde giderek genişleyen geniş bir uygulama yelpazesi içinde önem kazanmıştır (Bashan, 1986; Amiet-Charpentier vd., 1999; Badr vd., 2001; Byrd vd., 2005; De Castro-Cislaghi vd., 2012).

Süt ve eczacılık ürünlerinin hazırlanmasında starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri önemli rol oynamakta ve muhafazaları için uygun işlem gerekliliği doğmaktadır (Huq vd., 2017).

İnsan veya hayvan midesindeki aşırı asidik çevresel koşullar, hücreler bağırsağa ulaşmadan hücre canlılığında ciddi kayıplara neden olabilmektedir (Stanton vd., 2005). Probiyotik hücrelerin enkapsülasyonu çevresel koşullara karşı mikroorganizma etrafında fiziksel bir bariyer oluşturmakta, bu sebeple mikroenkapsülasyon proses, depolama ve özellikle sindirim koşullarına karşı istenmeyen canlı hücre kayıplarını engellemek amacıyla kullanılmaktadır (Li vd., 2011).

Mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda elde edilen mikrokapsüller, yarı geçirgen, küreye yakın bir şekilde, hafif ve kaplanan materyali güçlü bir şekilde çevreleyen, çapları birkaç yüz nanometreden birkaç milimetreye kadar değişen boyutlarda bir yapıya sahiptir (Desai ve Park 2005; Anal ve Singh 2007). Kaplanan materyal; aktif materyal, öz, iç faz veya dolgu materyali olarak, kaplama materyali ise kabuk, tabaka, duvar, taşıyıcı veya enkapsülant şeklinde adlandırılmaktadır (Augustin vd., 2001; Gharsallaoui vd., 2007).

Mikroenkapsülasyon bakteri hücrelerinin, elverişsiz çevresel koşullara karşı korunmasında umut verici yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Mikroenkapsülasyonun avantajlarından birisi probiyotik hücrelerin aljinat, k-karragenan, jellan/ksantan gam gibi biyolojik materyallerle jel matriksi içinde kaplandıktan sonra, ürün içerisinde tamamen serbest kalabilmesidir (Semyonov vd., 2010).

Mikroenkapsülasyonun bir başka avantajı ise kaplanmış hücrelerin insan ve hayvan bağırsak sisteminde belirli koşullar altında serbest kalabilmesidir (Prakash vd., 2005).

Mikroenkapsülasyonun bir diğ er amacı ise, enkapsüle edilen materyali zararlı çevre koşullarına, pH değ işimlerine, metabolik ürünlerin meydana getirdiğ i zararlara, ozmotik basınca, sıcaklık değ işimlerine karşı korumak ve depolama stabilitesini artırmaktır (Mortazavian vd., 2007).

Mikroenkapsülasyon amacıyla kullanılan yöntemlerden bazıları ekstrüzyon-emülsiyon, püskürterek dondurma ve püskürterek soğ utma, koazervasyon/faz ayrımı, lipozom tutuklama, inklüzyon kompleksi oluş turma, ko-kristalizasyon, püskürterek kurutma ve akış kan yataklı kurutma olarak sayılabilmektedir (Kailasapathy, 2002; Lian vd., 2002; Krasaekoopt vd., 2003; Krasaekoopt vd., 2004).

Bu yöntemlerden püskürterek kurutma, ekstrüzyon ve emülsiyon yöntemlerinin probiyotik mikroorganizmaların canlılığ ını %80-95 oranında koruduğ u belirtilmektedir (Sheu ve Marshall 1993; Krasaekoopt vd., 2003).

Ekstrüzyon yönteminde polimerik çözeltiler önce mikrobiyal hücrelerle karış tırılır, sonra bir delikten ekstrüde edilir ve damlalar çapraz bağlanma çözeltilerine damlatılır ardından jelleş me gerç ekleş ir. Kapsül büyüklüğ ü, nozzle boyutuna, polimerik solüsyonun akış hızına, damlanın çıkış noktasının çapraz bağlanma çözeltileri arasındaki mesafeye bağ lı olarak değ işiklik göstermektedir (Brun-Graeppe vd., 2011).

Ekstrüzyon yönteminin en büyük avantajları; yöntemin basitliğ i, düşük maliyeti, ılımlı operasyon ř artları ve yüksek canlı hücre sayısıdır (De Vos vd., 2010).

Bu teknikle elde edilen kapsüller biraz daha büyük ve tekdüze olurlar. Ekstrüzyon tekniğ inde en çok kullanılan polimer aljinat olup bunun yanında jellan gam, ksantan gam gibi gıda saflığ ında enkapsülasyon materyalleri de kullanılabilir (Krasaekoopt vd., 2003). Bu yöntemin probiyotik enkapsülasyonunda kullanılmasındaki en önemli avantajlarından birisi yüksek sıcaklıkla işleme gereksinim duyulmamasıdır (Prübe vd., 2000).

Ekstrüzyon yönteminde damlacıkların oluş umu atış , ayrılma noktası veya nozzle titreş im parametreleri kullanılarak gerç ekleş tiğ inde, yöntem düzgün akış

ayrılma (laminar jet-breakup) ya da prilling yöntemi olarak adlandırılmaktadır (Brandenberger ve Widmer, 1998; Del Gaudio vd., 2005).

Ekstrüzyon yönteminde, 500 µm'den küçük kapsül yapmanın zorluğu, düşük viskoziteli polimer çözeltisinin gerekliliği ve büyük çaplı nozzle gereksinimi gibi bazı dezavantajlar da bulunmaktadır (Reis vd., 2006). Buna ilave olarak çapraz bağlanmanın yüzeyde hızlı gerçekleşmesi ve çapraz bağlanma iyonlarının iç çekirdeğe ulaşmasının gecikmesi daha az kararlı mikroküreler oluşmasına neden olmaktadır (Liu vd., 2002). Herşeye rağmen bu yöntemde mikroküreler az miktar da olsa laboratuvar ölçeğine uygun olarak üretilmektedir.

Ekstrüzyon tekniğinde titreşim frekansı, polimerik sıvıyı damlalara bölmek için kullanılmaktadır. Bu damlalar daha sonra çapraz bağlanma çözeltisinin içine düşmekte, akış hızı ve viskoziteye bağlı olarak oluşan partikül büyüklüğü de değişim göstermektedir (Del Gaudio vd., 2005; Graff vd., 2008).

Ekstrüzyon yönteminde aljinat, κ-karragenan, jellan gam gibi biyopolimerler kullanıldığında bunların yüksek konsantrasyonları büyük ölçekte üretim yapılmasına bir engel oluşturmaktadır (Krasaekoopt vd., 2003).

Emülsiyon tekniği, laktik asit bakterilerinin kaplanmasında kullanılan başarılı yöntemlerden biridir (Lacroix vd., 1990). Bu teknikte sürekli ve sürekli olmayan fazlar bulunmaktadır. Yönteme göre enkapsüle edilecek hücre ve polimer süspansiyonu belirli hacimdeki bitkisel yağ içerisine ilave edilmekte ve karışım homojenize edilerek yağ içinde su emülsiyonu oluşturulmaktadır. Emülsiyon oluşmaya başladığında suda çözünen polimer, yağ fazı içinde küçük jel partikülleri şeklini alarak mikrokürecikler haline dönüşmektedir. (Lakkis, 2007; Yaşlı 2010).

Emülsifikasyon sonrası mikroküre boyutlarının genellikle geniş bir aralıkta (100-1000 µm) olduğu bildirilmektedir (Rabanel vd.,2009). Emülsifikasyon tekniğinin en önemli dezavantajı ise, kapsüllenmiş hücreler üzerine organik çözücülerin potansiyel toksik etkileri olarak rapor edilmiştir (Krasaekoopt vd., 2003).

Yapılan bir çalışmada emülsifikasyon yöntemi ile probiyotik maya *S. boulardii* inulin ve musilaje ile enkapsüle edilmiş ve bu hücrelerin raf ömrünün serbest hücrelere göre daha uzun olduğu bulunmuştur (Zamora-Vega vd., 2012).

Emülsiyon tekniğinde kaplama materyali olarak aljinat, κ -karragenan, kitosan ve jelatin kullanılabilir. Mikroenkapsülasyonda en fazla kullanılan yöntemlerden püskürterek kurutma ve ekstrüzyon yöntemleri basit yöntemler olarak nitelendirilmesine karşın emülsiyon yöntemi daha karmaşık bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Picot ve Lacroix, 2003).

Yüksek üretim oranı ve düşük maliyetinden dolayı, püskürterek kurutma yöntemi gıda ve eczacılık endüstrisinde en fazla kullanılan yöntemdir. Püskürterek kurutma yönteminin esası, sürekli fazdaki çözünmüş polimerin, çekirdek materyalin etrafını kaplamasına dayanmaktadır. Kurutma işlemi çekirdek materyali kaplamış olan polimerin boyutunun küçülmesine neden olmaktadır. Ortaya çıkan kapsüller kuru toz olarak toplanabilmektedir. Ancak püskürterek kurutmada kullanılan yüksek hava sıcaklığının probiyotik bakterilerin canlılığı üzerine olumsuz etki gösterdiği bilinmektedir (Gibbs vd., 1999).

Mevcut koruma yöntemleri arasında bulunan dondurarak kurutma yöntemi, kültürlerin depolanması için tercih edilen yöntemlerdendir. Ancak, bu işlem sırasında hücre zarının nükleik asitleri ve enzimleri hasar gördükten sonra canlı bakteri sayısı önemli ölçüde azalmaktadır. Bu yüzden probiyotikler, protein denatürasyonu, hücre duvarı ve hücre zarının hasar görmesi nedeniyle oda sıcaklığında depolama sırasında çok kararsızdır (Huq vd., 2017).

Enkapsülasyon sistemleri bir veya birkaç parametrenin etkisiyle çekirdek materyalinin serbest bırakılması üzerine tasarlanmıştır. Serbest bırakma işlemini tetikleyen parametreler sıcaklık, nem, pH, enzimler ile çiğneme ve öğütme gibi fiziksel etkenlerdir (Huq vd., 2017).

2.3 Gıda Teknolojisinde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları

Mikroenkapsülasyon, sanayide, hedeflenen maddelerin etkinliğini artırmayı amaçlamaktadır. Farklı endüstri sektörlerinde mikrokapsülleme tekniklerinin uygulanmasının ana avantajları hala tartışılmaktadır. Bununla birlikte, farmasötik ve gıda endüstrileri, mikroenkapsülasyon teknolojisindeki gelişmelerin ana itici güçlerini oluşturmaktadır. Gıda endüstrisi, mikroenkapsülasyon teknolojisinin ilerlemesinin ikinci ana itici gücüdür. Giderek artan miktarda tüketici talepleri ve ürün gereksinimleri, gıda sanayisine yönelik mikroenkapsülasyon araştırmasının ana motivasyonunu oluşturmaktadır (Paulo ve Santos, 2017).

Hücre mikroenkapsülasyonunun önemli avantajları ve çok yönlülüğü, geniş aralıkta materyal ve yöntem kullanım olanakları, reklam başarısı genellikle gıda endüstrisinde probiyotik mikroenkapsülasyonun ön plana çıkmasına neden olmuştur (Rathore vd., 2013).

Gıdaya eklenen biyoaktif bileşenlerin, gıdaların renk, aroma ve tat gibi özelliklerini etkilememesi gerekmektedir. Özellikle partikül büyüklüğü tekstürü etkileyeceğinden büyük partiküllerin gıda içinde bulunması istenmemekte bu sebeple mikroenkapsülasyon yöntemleri bu sektörde kritik rol oynamaktadır (Claude ve Fustier, 2007).

Bir gıda sistemine fonksiyonel bileşenlerin az miktarlarda eklenmesi, ürünün, özelliklerini önemli ölçüde etkilemeyebilmektedir. Ancak, belirli gereksinimleri karşılamak veya bir hastalığı tedavi etmek amacıyla alınan gıdalar çoğunlukla kararsız ve çoğu zaman tatsız ürünler elde edilmesine neden olmaktadır. Bu besin öğelerine, mineral ve vitamin takviyeleri, çoklu doymamış yağ asitleri, vb. örnek verilebilir. Bu gıdalar taneli olma, okside tat içermeye gibi çeşitli dezavantajlara sahip olabilmektedir. Mikroenkapsülasyon yönteminde uygulanan farklı kontrollü salınım sistemlerinin bu dezavantajların üstesinden gelmek ve kaplanan çekirdek materyalin serbest kalma gereksinimlerini geniş bir yelpazede sağlamak amacıyla formüle edilmektedir (Lakkis, 2007).

Kontrollü salınımda iki tip mekanizma bulunmaktadır. Bunlar gecikmeli ve devamlı salınımdır. Gecikmeli salınım aktif bileşenin, nerede ve ne zaman serbest

kalması gerektiğini sağlayan bir mekanizmadır. Örneğin enkapsüle edilmiş probiyotik bakteriler mide ortamındaki asidik koşullardan geçip bağırsak ortamında serbest kalmaktadır. Devamlı salınımında ise mekanizma aktif bileşenin konsantrasyonunu, hedef bölgede koruması esasına dayanmaktadır. Örneğin sakız içerisinde bulunan enkapsüle aroma maddeleri ve tatlandırıcılar çiğneme süresi boyunca istenen aroma etkisini sağlama oranında serbest kalmaktadır (Lakkis, 2007).

Peynir, yoğurt ve krema gibi fermente süt ürünlerinin yanı sıra tahıl ürünlerinin üretiminde laktik asit bakterileri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Donkor vd., 2007; Plessas vd., 2007; Cardarelli vd., 2008; Sendra vd., 2008).

Sheu ve Marshall (1993) yaptıkları çalışmada büyük çaplı küreciklerin *Lactobacillus bulgaricus*'u dondurulmuş tatlılarda daha iyi koruduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada aljinat ve nişasta ile kaplanmış probiyotik kültürünün boyutları 0,5-1 mm arasında olanlarının yoğurdun buzdolabı şartlarında depolama süresine olumlu yönde etki ettiği tespit edilmiştir.

2.4 Probiyotik Kültürlerde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları

Son yıllarda probiyotik bakterilerin insan sağlığına etkileri üzerine ilgi giderek artmıştır. Bu da endüstrinin süt ürünlerindeki laktik asit bakterilerine ve yeni nesil probiyotik gıdaların üretimine odaklanmasını sağlamıştır. IDF'nin belirttiğine göre ürünün son kullanma tarihinden önce aktif probiyotik canlı sayısı en az 10^{7-9} KOB seviyesinde olmalıdır (Seth vd., 2017).

Probiyotiklerin en fazla kullanıldığı alan süt ve süt ürünleridir. Başka bir deyişle probiyotiklerin taşınmasında esas yolu süt ürünleri oynamaktadır (Fuller 1992). Probiyotik etki; asit ve bakteriyosin üretimine, patojenlerle rekabete ve bağışıklık sistemini korumaya dayanmaktadır. Optimum işlevsellik açısından probiyotiklerin canlı ve etkin olmaları gerekmektedir (Mattila-Sandholm vd., 2002; Champagne ve Gardner, 2005).

Süt ürünlerindeki düşük canlı sayısına sahip probiyotik bulunma sebepleri arasında laktik ve asetik asit konsantrasyonu, düşük pH seviyesi, hidrojen peroksit varlığı ve oksijen seviyesi sayılabilmektedir (Dave ve Shah, 1997).

Probiyotik kültürlerde mikroenkapsülasyon uygulamalarının en önemli nedeni gerek katıldığı gıdanın teknolojik üretim süreçlerinde gerekse konakçının sindirim sisteminde gerçekleşen metabolik faaliyetler süresince hücrenin canlılığının belirli oranda korunmasını sağlamaktır. Probiyotik bakterilerin konakçıya istenen faydalı etkiyi verebilmesi için üst sindirim kanalından geçerken kararlı aktif ve yeterli sayıda canlı hücre olarak alınması gerekmektedir (Gilliland, 1989).

Probiyotik mikroenkapsülasyonunda canlılığın korunması için enkapsülasyon işleminin ılımlı şartlarda gerçekleştirilmesi gereklidir. Bu sebeple birçok mikroenkapsülasyon tekniği üzerinde çalışılmış ve yeni teknikler geliştirilmesi sağlanmıştır (Rathore vd., 2013).

Probiyotiklerin korunmasında kullanılan yöntemler, aside karşı dirençli suşların seçimi ve ortama sistein ya da askorbik asit eklenmesiyle güçlendirilebilmektedir (Dave ve Shah 1998; Adhikari vd., 2000; Krasaekoopt vd., 2003).

Probiyotik bakterilerin dondurulmuş sütlü tatlılarda kullanılması ürünün asiditesi, yüksek ozmotik basınç, donma zararı gibi güçlükler nedeniyle yaygınlaşmamaktadır. Bu olumsuzlukların önüne geçilmesinde mikroenkapsülasyon yöntemi önemli bir araç olarak görülmektedir (Shah ve Ravla 2004).

Yoğurt içinde canlı probiyotik bakteri sayısı düşük pH (4,2-4,6) seviyesinden dolayı azdır. Birçok çalışma probiyotik bakterilerin enkapsülasyonu ile bakteri canlılığını bu olumsuz koşula karşı pozitif yönde koruduğunu göstermiştir (Picot ve Lacroix 2004; Iyer ve Kailasapathy 2005; Patrignani vd., 2017).

Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 ekstrüzyon yöntemi ile aljinat kullanılarak mikroenkapsüle edilmiş ve daha sonra kitosan ile kaplanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre çift katmanla kaplı kapsüllerin canlılığı daha fazla koruduğu tespit edilmiştir (Jantarathin vd., 2017).

Seth vd. (2017) yaptıkları çalışmada *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*'dan oluşan karışık bakteri kültürünü, tatlandırılmış yoğurdun püskürterek kurutulması esnasında, kaplama malzemesi olarak sodyum aljinat kullanarak kapsüllemişler ve bunun için gelişmiş bir ekstrüzyon püskürtme

tekniki kullanmışlardır. Kaplama parametreleri olarak aljinat konsantrasyonunu %1, 1,5, 2, 2,5 ve 3 değerlerinde, kalsiyum klorür konsantrasyonunu 0,1, 0,2, 1 M ve sertleştirme zamanını 15, 30, 45 ve 60 dakika olacak şekilde ayarlamışlardır. Deney sonuçlarına göre, aljinat konsantrasyonu, mikrokapsül boyutunu arttırırken, nozzle hava basıncı boyutunun küçülttüğünü, kaplama verimliliğinin, mikrokapsül boyutuyla arttığını, sertleştirme süresinin 30 dakikaya kadar pozitif bir etki sergilediğini ve daha sonra bu sürenin etki anlamında önemli olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca deney sonuçlarına göre artan aljinat konsantrasyonu ile birlikte bakteri canlılığının da arttığı tespit edilmiştir.

Demitri vd. (2017) yaptıkları çalışmada aljinat bazlı solüsyon ve CaCl₂'nin çapraz bağlayıcı madde olarak spesifikasyonu üzerine geliştirilmiş yeni bir teknikle *Lactobacillus kefir* içeren mikrokapsüller elde etmişlerdir. Bu teknikte, mikrokapsüllerin fizikokimyasal özelliklerini (viskozite ve geçirgenlik) değiştirmek için muko yapışkan özelliğe sahip olduğu bilinen karboksimetilselüloz (CMC) de aljinata eklenmiştir. Bu teknikte aktif bileşen olarak *L. kefir*'yi kullanarak ve çapraz bağlayıcı ajan olarak aljinat bazlı solüsyon ve CaCl₂'den oluşan iki aerosol kullanarak 50-70 µm boyutlarında kapsüller üretmeyi başarmışlardır. Ayrıca kapsülleme işleminin etkili olduğu ve bakteri canlılığı açısından zararlı olmadığı da ortaya konulmuştur.

Probiyotik özellikteki *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, olumsuz ortamlara karşı toleransı artırmak amacıyla titreşimli teknoloji ile aljinat ve kitosan-aljinat matriks içinde mikrokapsülenmiştir. Mikroenkapsülasyon prosedürü, yüksek bir kapsülleme verimi (% 97) ile gerçekleştirilmiş ve ayrıca kitosan kaplaması ile hücre canlı popülasyonunu etkilemediği kanıtlanmıştır. Yapılan bu çalışmayla, kitosan-aljinat matriks ile mikrokapsülenmenin, *L. reuteri* DSM 17938'in gıda işlemede karşılaşılan stres koşullarına karşı toleransı artırabileceğini ve işlevsel özelliklerini koruduğunu tespit edilmiştir (De Prisco vd., 2015).

Başka bir çalışmada, iki probiyotik laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus paracasei* A13 ve *Lactobacillus salivarius* subsp *salivarius* CET 4063'ün fonksiyonel fermente süt üretiminde mikrokapsülasyonu için yüksek basınçlı homojenizasyon potansiyelini değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu fonksiyonel mikroorganizmaların mikrokapsülleri 50 MPa'da sodyum aljinat ve bitkisel yağ

varlığında yüksek basınçlı homojenizasyonla elde edilmiştir. Elde edilen mikrokapsüllerin boyutu 100µM'den küçük olduğundan mayalanmış sütlerin duyu özelliklerini olumsuz bir şekilde etkilememiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre mikrokapsülasyon işleminin simüle edilmiş sindirim sistemi koşullarına direnci artırdığı tespit edilmiştir ve probiyotik mikroorganizmaların yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile elde edilen mikrokapsüllerin, fermente süt üretme potansiyelini artırdığı ortaya konulmuştur (Patrignani vd., 2017).

Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus salivarius* Li01 aljinat ve jelatin kullanılarak mikroenkapsüle edilmiştir. Kapsülleme, aerobik depolama sırasında probiyotik canlılığını önemli ölçüde arttırmış, Mikroküreler simüle edilmiş gastrik koşullar altında yapılarını korurken simüle ince bağırsak koşullarında aşınmış veya şişmişlerdir. Ayrıca çalışma aljinat- jelatin kapsüllerinin, aljinat kapsülleri ve kapsüllenmemiş bakteriler ile karşılaştırıldığında, simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında bakterilerin korunmasında daha etkili olduğunu ortaya koymuştur (Yao vd., 2017).

2.5 Mikroenkapsülasyon Uygulamalarında Yanıt Yüzey Yönteminin Kullanımı

Liu vd. (2016) yaptıkları çalışmada balık yağı mikrokapsüllerini duvar malzemeleri olarak iki doğal polisakkarit, aljinat ve kitozan kullanılarak hazırlamışlardır. Balık yağı kapsülleme verimliliği koşullarını optimize etmek için bir yanıt yüzey metodolojisi (RSM) kullanılmıştır. Çalışmada balık yağı mikrokapsüllerinin oldukça muntazam mikroküreler oluşturarak yapay gastrointestinal bir modelde 270 dakika içinde %77,7'lik salınım oranı gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca RSM ile optimal mikroenkapsülasyon koşullarının formüle edilmesinin, gıda uygulamalarında çeşitli yağda çözünebilen besinlerin mikrokapsülenmesine uygulanabilir olduğunu ortaya koymuşlardır.

Getachew ve Chun (2016) yaptıkları çalışmada, kahve aromasını kapsüllemeyi ve kapsülleme verimliliğini etkileyen proses koşullarını optimize etmeyi amaçlamışlardır. Yağ, kavrulmuş *Coffea arabica*'dan ekstre edilmiş, çıkan yağ polietilenglikol (PEG) ile kapsüllenmiştir. Sıcaklık (40-50 °C), basınç (200-300

bar) ve polimer yağ oranları (5:1-10:1 g/g) gibi kapsülleme verimliliğini etkileyen proses parametreleri Box Behnken tasarımı ile optimize edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre optimum koşullar kullanılarak elde edilen kapsüllerin aromayı çok iyi muhafaza ettiği tespit edilmiştir.

Son yıllarda mikroenkapsülasyon uygulamalarında yanıt yüzey yöntemi sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Yanıt yüzey yöntemi, faktörler ve yanıtlar arasındaki ilişkileri ifade etmek için matematiksel ve istatistiksel yaklaşımlar kümesi olarak tanımlanır. Bağımsız değişken olarak da bilinen faktörler bağımsız olarak değiştirilebilen bağımsız parametrelerdir. Diğer yandan, yanıtlar veya bağımlı değişkenler, yapılan deneylerden ölçülen değerlerdir (Paulo vd., 2017).

Deneyler, çalışılan deney alanı olan deneysel bir alana aittir. Deneysel değişkenlerin maksimum ve minimum seviyeleri, alanın sınırlarını tanımlar. Buna ek olarak, bir değişken seviyeleri tanımlanmalıdır. Değişken seviyeleri, deneyin gerçekleştirilmesi gereken değerlerdir. (Paulo vd., 2017).

2.6 Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Bazı Kaplama Materyalleri

2.6.1 Aljinat

En yaygın kullanılan kapsülleme malzemesi olan aljinat, β -(1-4) D-mannuronik asit ve α -(1-4) L-gulukuronik asit ünitelerinden oluşmuştur. Kahverengi yosunlardan veya bakteriyel kaynaklardan elde edilmektedir. Suda yosunların bol olması nedeniyle, doğada büyük miktarda aljinat malzemesi mevcuttur. Endüstriyel aljinat üretimi yılda yaklaşık 30.000 tondur (Huq vd., 2017).

Aljinatların kullanımı düşük maliyet, basitlik ve biyouyumluluk özelliklerinden ötürü tercih edilmektedir. Aljinatlar, hafif jelleşme koşulları, ve toksik olmaması nedeniyle mikroenkapsülasyon için çok uygundur. Bakteriler, 17 nm'den daha düşük gözenek boyutuna sahip olduğu tahmin edilen aljinat jel matrisinde iyi korunmaktadır (Huq vd., 2017).

Laktik asit bakterilerinin enkapsülasyonunda genellikle aljinat kullanılmaktadır. Aljinatın toksik olmaması ve gıda katkı maddesi olarak kabul görmüş olması gibi avantajları bulunmaktadır (Prevost ve Divies, 1992). Enkapsülasyonun tersinirliği, aljinatın çözünebilir olması ve sodyum iyonlarından ayrılabilir oluşu diğer avantajları arasında sayılabilmektedir (Chandramouli vd., 2004).

Yapılan çalışmalarda sodyum aljinat konsantrasyonu %0,5 - %4 gibi geniş bir aralıkta kullanılmaktadır. (Sheu ve Marshall, 1993; Larisch vd., 1994; Kim vd., 1996; Hansen vd., 2002). Aljinat konsantrasyonundaki bu farklılık enkapsülasyonda farklı sonuçların alınmasına sebep olmaktadır.

Yapılan bir çalışmada kapsül büyüklüğü ve sodyum aljinat konsantrasyonunun, yüksek asidik koşullarda (pH 2) laktik asit bakterilerinin canlılığı üzerine etkisi araştırılmış ve kapsüllenmiş bakterilerin canlılığının, yapay mide koşullarında kapsül büyüklüğü arttıkça arttığı (200-1000 µm) ayrıca aljinat konsantrasyonu %0,75'ten %1,8'e yükseldiğinde kapsüllerdeki canlı bakteri sayısını koruma oranının da arttığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada aljinat konsantrasyonu %2'ye çıkarıldığında ise canlı bakteri sayısında önemli bir artış ($p>0,05$) görülmemiştir (Chandramouli vd., 2004).

Aljinat boncuklarını, kitosan gibi polikasyonla kaplamak yaygın olarak çalışılmış konulardan biridir (Krasaekoopt vd., 2006). Bu kaplamada aljinat boncukları kalsiyum klorür ve kitosan çözeltisi karşımının içine bırakılarak üretim gerçekleştirilmektedir. Kitosan (poly-(2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranose)) pozitif yüküyle aljinat ile polielektrolit kompleks oluşturarak polianyonik polimer membran meydana getirilmekte, bu sayede daha sağlam bir yapı meydana gelmektedir (Smidsrod ve Skjakbraek, 1990).

2.6.2 Kitosan

Kitosan β(1-4)-glukozamin ve N-asetilglukozamin ünitelerinden oluşan kationik bir polisakkarittir. Enkapsülasyonda kullanılan kitosanın vizkozitesi, konsantrasyonu, sıcaklığı partikül morfolojisine etki etmektedir (Peniche vd., 2003).

Mikrokürelerin mekanik ve kimyasal stabilitelerini arttırmak amacıyla, birden fazla polimerle kaplama yapmak yaygın yaklaşımlardan biridir. Böylelikle daha fazla koruma sağlanmış ve enkapsüle edilmiş hücrelerin canlılığının daha iyi korunması amaçlanmaktadır. Kitosan, mikroküreler için etkili koruma sağlayan polimerlerden biridir (Serp vd., 2000; Chávarri vd., 2010).

Lee vd. (2004) yaptıkları çalışmada yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile kaplanmış *Lactobacillus bulgaricus* kapsüllerinin yapay mide suyu ortamı ve 22°C’de, kaplanmamış hücrelere göre daha yüksek canlı kalma oranına sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada aljinat ile enkapsüle edilen probiyotik kültürleri daha sonra kitosan ile kaplanmış ve boncukların yoğurtta canlı kalma oranları araştırılmıştır. Çalışma sonunda enkapsüle edilen probiyotik kültürlerin kaplanmamış olanlara göre canlılıklarını daha iyi korudukları tespit edilmiştir (Krasaekoopt vd., 2006).

Krasaekoopt vd. (2004) yaptıkları çalışmada farklı kaplama materyallerinin probiyotik canlılığı üzerine etkisini araştırmışlar ve kitosan kaplı aljinat kapsüllerinin mikroorganizma canlılığını, poly-L-lisin kaplı aljinat kapsüllerine göre daha iyi koruduğunu tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizma Kültürü ve Mikroenkapsülâtör

Bu çalışmada, daha önceki araştırmalarımız sonucu elde edilen bilgiler ışığında Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan, potansiyel probiyotik özellikleri belirlenmiş ve moleküler genetik yöntemlerle (16S rRNA dizi analizi) kesin tanısı yapılmış *Lactobacillus acidophilus* KPb4b suşu kullanılmıştır. Çalışma kapsamında bu potansiyel suşun emülsiyon tekniği, elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi ve çift tabaka kaplama (elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi ile birinci kaplama üzerine kitosan ile ikinci tabaka kaplama) yöntemi ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Elektrostatik titreşim tekniğinde, BAİBÜ Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında bulunan Nisco Var A Model (Nisco Eng. Inc. Zürih, İsviçre) mikroenkapsülâtör cihazı kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri Kültürünün Hazırlanması ve Mikroorganizma Sayımı

Kaplama işlemi uygulanacak mikroorganizma kültürü denemeler süresince -18°C’de, %40 gliserol içeren ½ MRS Broth besiyerinde muhafaza edilmiştir. Kültür, ardışık 2 kez MRS Broth besiyerinde 37°C’ de 24 saat aktifleştirildikten sonra 50 mL MRS Broth besiyerinde geliştirilmiş ve daha sonra 30 mL’lik steril santrifüj tüplerine aktarılıp 10.000 × g’de 10 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edilmiştir. Pelet iki kez 5 mL fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkanarak aynı yöntemle tekrar santrifüj

edilerek kaplamada kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir (Çakır vd., 2010; İşleyen, 2010; İşleyen ve Çakır 2016).

Mikroorganizma sayımı, de Man, Ragosa, Sharp Agar (MRS Agar, Merck, Almanya) besiyerinde yayma kültür sayım yöntemi ile iki paralel olarak yapılmıştır. Araştırmada kapsüllerin açılması için ilk 1/10'luk seyrelti 0,1 M KPO₄ tamponu (pH 7,4, Merck, Almanya) içerisinde, diğer seyreltiler ise MRD (Maximum Recovery Diluent, Merck) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonunda mikroorganizma canlılığının korunmasında kullanılabilecek en uygun yöntem belirlenmeye çalışılmıştır (Çakır vd., 2010)

3.2.2 Mikroenkapsülasyon İşlemi

3.2.2.1 Emülsiyon Tekniği ile Kaplama

Kaplama materyali olarak 120 mL steril %3 (v/w) sodyum aljinat çözeltisi 30 mL (10⁶-10⁸ KOB/mL) *L. acidophilus* KPb4b kültürü ile karıştırılmış ve buradan alınan 50 mL probiyotik ve aljinat karışımı, içerisinde 100-200 mL steril bitkisel yağ bulunan bir beher içerisine aktarılmıştır. Daha sonra bu karışım manyetik karıştırıcı ile 200 rpm'de karıştırılıp emülsiyon oluşana kadar üzerine 0,1 M CaCl₂ ilave edilmiştir (Capela vd. 2007; Yaşlı 2010).

3.2.2.2 Elektrostatik Titreşim/ Damlatma Yöntemi ile Kaplama

Elektrostatik Titreşim/ Damlatma Yönteminde (ETDY) kullanılan probiyotik bakteri kültürü mikroenkapsülatör sistemi kullanılarak kaplanmıştır. Buna göre %1,5 aljinat çözeltisi ve 5 mL 10⁶-10⁸ KOB/mL düzeyinde probiyotik içeren FTS çözeltisi ile oluşturulan emülsiyon cihaza yerleştirilmiş ve peristaltik pompa yardımı ile 150 µm çapındaki nozuldan geçirilerek 0,1-1 M CaCl₂ katılaştırma çözeltisi içine düşürülmüştür. Bu şekilde üretilen mikrokürecikler 30 dakika karıştırıldıktan sonra buzdolabında bir gece bekletilmiştir (Çakır vd., 2010). Mikroenkapsülasyon işleminde uygulanan çalışma parametreleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Mikroenkapsülasyon işleminde uygulanan çalışma parametreleri

Parametre	Çalışma Aralığı
Mikroorganizma	<i>L. acidophilus</i> KPb4b
Kaplama materyali	% 1 - % 3 Aljinat,
Katılaştırma çözeltisi	0,1 M CaCl ₂ ve 1 M CaCl ₂
Nozul çapı	150 µm
Akış hızı	6,5 mL/dk. - 12 mL/dk.
Frekans	2,21 kHz
Amplitude (Genlik)	%95
Şırınga çapı	20 mL
Işık Şiddeti	%20

Cihaz tespit edilen çalışma parametrelerine (akış hızı, frekans ve genlik değerleri) kurulduktan sonra, steril şırıngaya doldurulan emülsiyon cihaza yerleştirilmekte ve cihaz çalıştırılmaktadır. Peristaltik pompanın hareketi ile şırıngadan gelen karışım nozzle sisteminden geçmeye zorlanırken önce büyük damlalar, ardından da standart düzgün bir akış elde edilirken, mikrokapsüller şeklinde sistemden çıkan çok küçük damlacıklar toplama tankı içerisindeki 0,1 M CaCl₂ katılaştırma çözeltisine düşmektedir. Bu arada toplama tankında bulunan manyetik karıştırıcı çalıştırılarak küreciklerin yapışması engellenmektedir. Bu şekilde üretilen mikrokürecikler 30 dakika karıştırıldıktan sonra buzdolabında bir gece bekletilerek tam katılama işlemi tamamlanmaktadır (Çakır vd., 2010).

3.2.2.3 Elektrostatik Titreşim/ Damlatma Yöntemi ve Kitosan ile Çift Tabaka Kaplama

Elektrotatik Titreşim/ Damlatma Yöntemi ve Kitosan (ETDYK) ile çift tabaka kaplama yönteminde probiyotik kültür %1-3 aljinat çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra karışım içerisine steril MRS Broth (55 g/L), trehaloz (50 g/L), prebiyotik inulin (10 g/L) ve tween 80 (2 g/L) katılarak elde edilen karışım mikroenkapsülasyon cihazından geçirilerek mikroorganizma kültürünün kaplanması sağlanmıştır. Mikrokapsüller, içerisinde 0,02 M sodyum asetat içeren % 0,5'lik kitosan çözeltisine alınmış ve 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu süre sonunda yıkanan aljinat-kitosan kapsülleri %0,05'lik aljinat çözeltisinde yine 30 dakika karıştırıldıktan sonra, deneme süresince 4°C'de depolanmıştır (Kanmani vd. 2011).

3.2.3 Mikrokapsüllerin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.3.1 Mikrokapsüllerin Depolama Stabilesinin Belirlenmesi

Mikrokapsüller ve serbest hücre kültürleri 1 ay boyunca +5°C'de depolanmış ve depolama boyunca haftalık yapılan sayımlar sonucu mikroorganizma sayısındaki azalma belirlenmiştir (Çakır vd., 2010).

3.2.3.2 Mikrokapsüllerin Yapay Mide Ortamındaki Stabilesi

Yapay mide ortamı için 0,2 g NaCl tartılarak, üzerine 1 N 0,7 mL HCl eklenmiş ve saf suyla 100 mL'ye tamamlandıktan sonra bu çözeltinin pH'sı 2,0'a ayarlanarak ve sterilize edilmiştir. Kapsüller bu ortamda 37°C'deki inkübatörde 3 saat boyunca tutulmuş ve saat başı ekimler yapılarak canlı mikroorganizma sayısı tespit edilmiştir (Çakır vd., 2010). Bu denemede kaplanmamış *L. acidophilus* KPb4b suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.3.3 Mikrokapsüllerin Yapay İncebağırsak Ortamındaki Stabilesi

Yapay bağırsak ortamı için 0,2 N 11,8 mL NaOH çözeltisi üzerine 0,2 M, 25 mL KH₂PO₄ eklenmiş ve çözelti saf suyla 100 mL ye tamamlanmıştır. pH'sı 6,8 olan bu çözelti sterilize edilmiş ve 37°C'deki inkübatörde 3 saat boyunca tutularak ve her saat başı yapılan ekimler sonucunda canlı mikroorganizma sayısı tespit edilmiştir (Çakır vd., 2010). Bu denemede kaplanmamış *L. acidophilus* KPb4b suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.3.4 Mikrokapsüllerin Boyutlarının Belirlenmesi

Mikrokapsüllerin boyutlarının belirlenmesinde Üniversitemiz Yenilikçi Gıda Teknolojileri Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (YENİGIDAM) laboratuvarlarında bulunan partikül boyut analiz cihazı (Mastersizer 2000, Malvern) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Mingard vd. (2009)'a göre değerlendirilmiştir.

3.2.4 Yanıt Yüzey Yöntemi Deneme Deseni ve İstatistiksel Analizler

Çalışma kapsamında yapılan denemeler Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te belirtilen deneme desenine göre gerçekleştirilmiştir. Deneme deseni Statistical Analysis Software (SAS 6.12) yazılımı kullanılarak, Yanıt Yüzeyi Yöntemine (Response Surface Methodology) göre, 2 merkez noktalı, Merkezi Bileşik Desen (Central Composite Design) modeli esas alınarak gerçekleştirilmiş ve deneme iki tekerrürlü olarak yürütülmüştür. ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri Çizelge 3.2'de görüldüğü şekilde birleştirilerek tek bir deneme deseni altında mikroenkapsülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2 ETDY ve ETDYK kaplama yöntemlerinde kullanılan deneme deseni

No	Aljinat (%)	Kitosan (%)	CaCl ₂ (M)
1	1	0	0,1
2	1	0	1
3	1	0,5	0,55
4	1	1	0,1
5	1	1	1
6	2	0	0,55
7	2	0,5	0,1
8	2	0,5	0,55
9	2	0,5	0,55
10	2	0,5	1
11	2	1	0,55
12	3	0	0,1
13	3	0	1
14	3	0,5	0,55
15	3	1	0,1
16	3	1	1

Çizelge 3.3 Emülsiyon tekniği yönteminde kullanılan deneme deseni

No	Aljinat (%)	Bitkisel Yağ (%)	CaCl ₂ (M)
1	1	100	0,1
2	1	100	1
3	1	150	0,55
4	1	200	0,1
5	1	200	1
6	2	100	0,55
7	2	150	0,1
8	2	150	0,55
9	2	150	0,55
10	2	150	1
11	2	200	0,55
12	3	100	0,1
13	3	100	1
14	3	150	0,55
15	3	200	0,1
16	3	200	1

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 ETDY ve ETDYK Kaplama Yöntemleri ile Kaplamanın Depolama Başlangıç ve Son Haftası Üzerine Bakteri Canlılığına Etkisi

Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin; depolama başlangıç ve son haftasındaki bakteri canlılığı üzerindeki etkilerini açıklayan polinomial modele ait eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$Y = 3,1431 - 1,3X_1 - 0,199X_2 + 0,252 X_3 - 0,1796X_1^2 + 0,2875 X_1X_2 + 0,2253 X_2^2 + 0,1775 X_3X_1 + 0,1225 X_3X_2 - 0,2696X_3^2 \quad (\text{Eşitlik 4. 1})$$

ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin depolama süresince mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri Çizelge 4.1'de, Varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2'de, bakteri canlılığındaki azalış üzerine aljinat ve kitosan konsantrasyonunun etkisi ise Şekil 4.1'de verilmiştir.

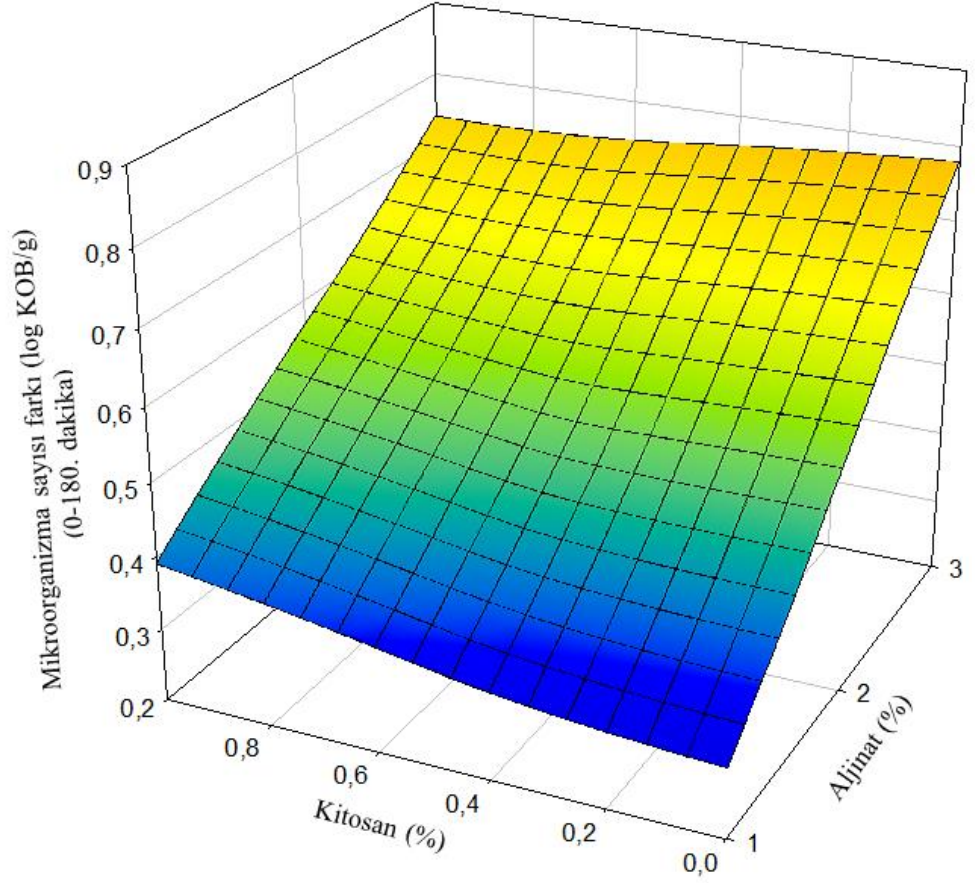
Çizelge 4.1 ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin depolama süresince mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri

Aljinat (%)/Kitosan (%)/Kalsiyum Klorür (M)	Mikroorganizma Sayısı (log KOB/g)					
	0. Hafta	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	Fark (0-4. Hafta Arası)
1/0/0,1	7,8	7,1	6,1	4,6	2,4	5,4
1/0/1	7,6	6,5	5,5	4,7	3,3	4,3
1/0,5/0,55	7,5	6,6	6,1	5,0	4,3	3,2
1/1/0,1	7,9	6,7	6,0	4,9	4,7	3,2
1.01.2001	7,3	6,4	5,4	4,6	3,4	3,9
2/0/0,55	7,5	5,3	5,2	4,8	4,2	3,3
2/0,5/0,1	8,1	7,3	6,7	6,6	6,6	1,5
2/0,5/0,55	8,7	7,8	7,3	6,7	6,4	2,3
2/0,5/0,55	8,1	7,3	6,7	6,0	5,7	2,4
2/0,5/1	8,2	7,5	6,8	6,3	6,1	2,1
2/1/0,55	8,6	7,4	7,2	6,6	6,1	2,5
3/0/0,1	8,1	7,5	6,8	6,0	5,7	2,4
3/0/1	8,0	7,1	6,8	6,3	5,8	2,2
3/0,5/0,55	8,7	7,7	7,3	7,3	6,9	1,8
3/1/0,1	8,5	7,8	7,8	7,8	7,5	1,0
3.01.2001	8,8	7,9	7,7	7,5	7,4	1,4
Kontrol (KPb4b)	8,4	6,6	3,7	1,1	0,0	8,4

Çizelge 4.2 Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin; depolama başlangıç ve son haftasındaki bakteri canlılığı üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	KO	F
Model	9	38,7274	26,7237
X ₁ (Aljinat konsantrasyonu; %)	1	33,8000	209,9115**
X ₂ (Kitosan konsantrasyonu; %)	1	0,7920	4,9188*
X ₃ (Kalsiyum klorür; Molarite)	1	1,2700	7,8877*
X ₁ *X ₁	1	0,1701	1,0569
X ₂ *X ₁	1	1,3225	8,2133**
X ₂ *X ₂	1	0,2677	1,6628
X ₃ *X ₁	1	0,5041	3,1307
X ₃ *X ₂	1	0,2401	1,4911
X ₃ *X ₃	1	0,3834	2,3811
Uyum Eksikliği	5	3,5324	1201,031
Genel	31		

*: P<0.05; **: P<0.01



Şekil 4.1 ETDY ve ETDYK yöntemleri ile kaplanan mikrokapsüllerin aljinat ve kitosan konsantrasyonunun depolamada bakteri canlılığı üzerine etkisi

Çizelge 4.2’te görüldüğü gibi depolama başlangıç ve son haftasındaki bakteri canlılığı üzerine aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin etki ettiği görülmektedir. Aljinat konsantrasyonunun etkisinin diğer iki faktörün gösterdiği etkiye göre çok önemli olduğu ($P<0.01$), ayrıca bakteri canlılığı üzerine etki eden faktörlerden aljinat konsantrasyonu ve kitosan konsantrasyonunun interaksiyon etkisinin de ($P<0.01$) düzeyinde çok önemli olduğu görülmektedir. Şekil 4.1’de aljinat konsantrasyonu ve kitosan konsantrasyonu arttıkça, analizin başlangıç ve son haftasındaki canlı bakteri sayısı arasındaki farkın daha az olduğu görülmektedir. Bakteri canlılığındaki bu korunmanın, yüksek konsantrasyonlu aljinat ve kitosan kapsüllerinin bakteriyi daha iyi korumuş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu konusunda yapılan bir çalışmada, laktik asit bakterilerinin kaplanması, üretim süreçlerinde ve depolamada, hücre

kayıplarını azalttığını tespit etmişlerdir (Capela vd. 2006). Bir diğer çalışmada da çeşitli biyoteknolojik üretim süreçlerinde, immobilize hücrelerin kullanımının, serbest hücrelerin kullanımından daha avantajlı olduğu bulunmuştur (Cassidy vd., 1996).

Krasaekoopt vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, kitosanla kaplamanın aljinat mikrokürelerinin stabilitesini arttırdığı ve kaplanmış hücrelerin canlılığını daha iyi koruduğu belirtilmiştir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde en yüksek aljinat ve kitosan konsantrasyonlu kapsüllerde, depolama sonundaki bakteri canlılığındaki kaybın 1 log KOB/g olduğu, buna karşın serbest hücrelerde ise depolamanın son haftasında hiç canlı hücre kalmadığı tespit edilmiştir.

Lopez vd. (2012) yaptıkları çalışmada elektrospraying tekniği ile *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 bakterisini kaplamışlar ve depolama boyunca bakteri canlılığındaki kayıpları incelemişlerdir. Çalışma sonunda mikroenkapsülasyonun bakteri canlılığındaki kayıpları depolama boyunca azalttığını tespit etmişlerdir.

Perez vd. (2014) yaptıkları çalışmada, mikroenkapsülasyon işlemindeki değişik işlem parametrelerinin mikroenkapsülasyon verimliliğine doğrudan etki ettiğini tespit etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir. Chávarri vd. (2010) yaptıkları çalışmada aljinatla kaplanmış probiyotik kapsüllerine, kitosan uygulamış ve sonrasında kapsüllerin gözenekli yapısında azalma olduğunu gözlemlemişler ve işlem sonunda bakterilerin kapsül dışına çıkışında azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

4.2 ETDY ve ETDYK Kaplama Yöntemlerinin Yapay İnce Bağırsak Ortamında (pH 6,8'de) Mikroorganizma Canlılığı Üzerine Etkileri

Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin; yapay ince bağırsak ortamında, 0. ve 180. dakikalar arasındaki bakteri canlılığı üzerindeki etkilerini açıklayan polinomial modele ait eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$Y = 0,4842 + 0,2069X_1 + 0,0132X_2 - 0,0359 X_3 + 0,0265X_1^2 - 0,1810 X_1X_2 + 0,2696 X_2^2 + 0,1014 X_3X_1 - 0,0233X_3X_2 - 0,2025X_3^2 \quad (\text{Eşitlik 4. 2})$$

ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin yapay ince bağırsak ortamında mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri Çizelge 4.3'te, varyans analiz sonuçları Çizelge 4.4'te, yapay ince bağırsak ortamında bakteri canlılığındaki azalış üzerine aljinat ve kitosan konsantrasyonunun etkisi ise Şekil 4.2'de verilmiştir.

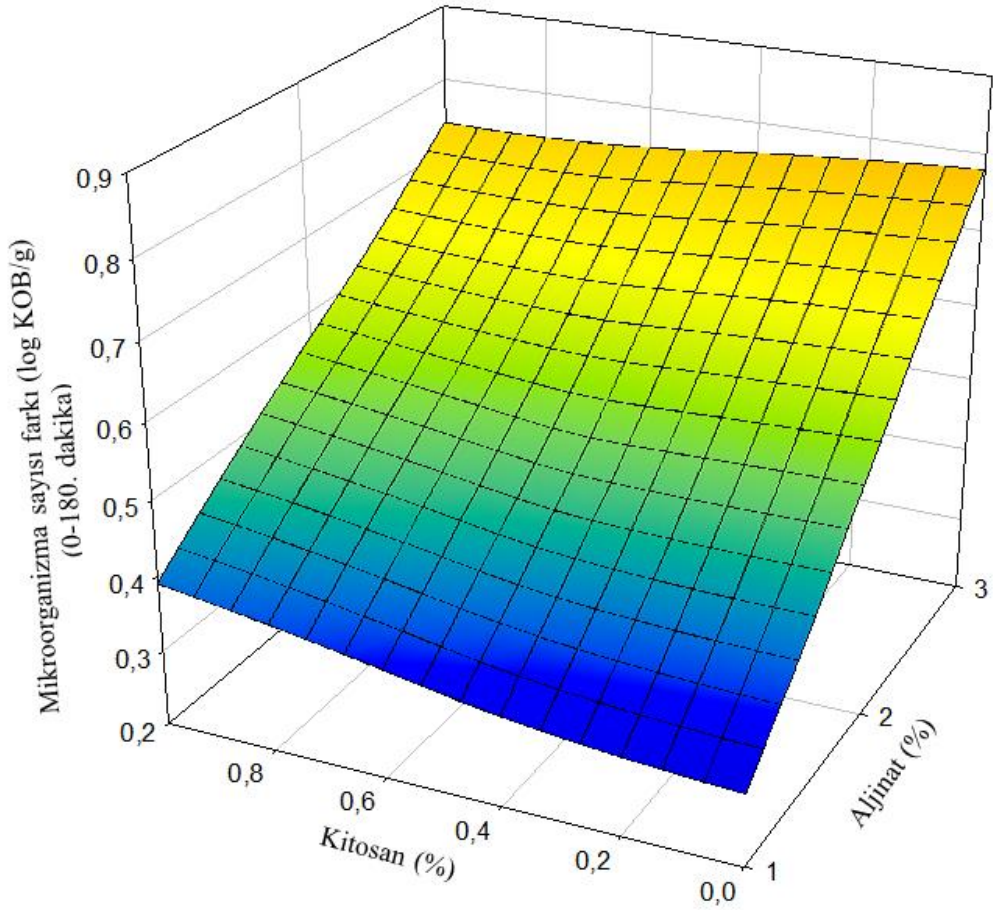
Çizelge 4.3 ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin yapay ince bağırsak ortamında mikroorganizma canlılık sonuçları

Aljinat (%)/Kitosan (%)/Kalsiyum Klorür(M)	Mikroorganizma Sayısı (log KOB/g)				
	0. dk	60. dk	120. dk	180. dk	Fark (0-180. dk Arası)
1/0/0,1	7,8	7,7	7,6	7,4	0,4
1/0/1	7,6	7,6	7,4	7,6	0,0
1/0,5/0,55	7,6	7,6	7,5	7,4	0,2
1/1/0,1	7,8	7,7	7,2	7,2	0,6
1.01.2001	7,7	7,7	7,5	7,2	0,6
2/0/0,55	8,1	7,9	7,7	7,4	0,7
2/0,5/0,1	8,6	8,4	8,2	8,2	0,4
2/0,5/0,55	8,2	8,1	7,8	7,7	0,5
2/0,5/0,55	7,7	7,7	7,2	7,3	0,4
2/0,5/1	8,7	8,6	7,8	8,5	0,2
2/1/0,55	8,0	7,6	7,5	7,2	0,8
3/0/0,1	8,9	8,7	8,3	8,2	0,7
3/0/1	8,0	7,9	7,4	6,9	1,1
3/0,5/0,55	8,2	8,2	7,5	7,3	0,9
3/1/0,1	8,6	8,3	8,3	8,0	0,6
3.01.2001	8,6	8,5	8,2	8,1	0,5
Kontrol (KPb4b)	8,9	8,9	7,8	7,6	1,3

Çizelge 4.4 Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin; yapay ince bağırsak ortamında, 0. ve 180. dakika bakteri canlılığı üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	K.O	F
Model	9	2,0720	1,0330
X ₁ (Aljinat konsantrasyonu; %)	1	0,8563	3,8421
X ₂ (Kitosan konsantrasyonu; %)	1	0,0034	0,0157
X ₃ (Kalsiyum klorür; Molarite)	1	0,0257	0,1157
X ₁ *X ₁	1	0,0037	0,0167
X ₂ *X ₁	1	0,5245	2,3533
X ₂ *X ₂	1	0,3833	1,7198
X ₃ *X ₁	1	0,1647	0,7392
X ₃ *X ₂	1	0,0087	0,0393
X ₃ *X ₃	1	0,2163	0,9709
Uyum Eksikliği	5	0,3066	0,2268
Genel	31		

** : P<0.01 * : P<0.05



Şekil 4.2 ETDY ve ETDYK yöntemleri ile kaplanan mikrokapsüllerin aljinat ve kitosan konsantrasyonunun (pH 6,8’de) bakteri canlılığı üzerine etkisi

Araştırmanın bu aşamasında yapay ince bağırsak ortamında 0. ve 180. dakika arasında bakteri canlılığı üzerine uygulanan faktörlerin etkilerinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($P>0,05$) belirlenmiştir. Çizelge 4.3’te görüleceği üzere yapay ince bağırsak ortamında kapsüllerdeki canlı mikroorganizma sayısı, analiz sonunda hem düşük aljinat konsantrasyonlu kapsüllerde, hem de yüksek konsantrasyonlu kapsüllerde çok büyük bir fark olmadan korunmuştur. Aynı şekilde yüksek ve düşük kitosan konsantrasyonlu kapsüllerdeki bakteri canlılığındaki azalmanın da düşük olduğu görülmektedir.

Rathar vd. (2017) yaptıkları çalışmada, bu çalışmaya benzer sonuçlar elde etmişlerdir. *Lactobacillus plantarum* NCDC201 ve *L. casei* NCDC297 suşları aljinat ile kaplanmış ve simüle edilmiş yapay incebağırsak ortamında 120 dakika bekletmişler ve süre sonunda *Lactobacillus plantarum* NCDC201 suşunda 2,02 log KOB/mL azalma, *L. casei* NCDC297 suşunda ise 1,97 log KOB/mL’ lik bir azalma

olduğunu ve kaplamanın bakteri canlılığını olumlu yönde koruduğunu tespit etmişlerdir.

4.3 ETDY ve ETDYK Kaplama Yöntemlerinin Yapay Mide Ortamında Mikroorganizma Canlılığı Üzerine Etkileri

Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin; yapay mide ortamında, 0. ve 180. dakikalar arasında mikroorganizma canlılığı üzerindeki etkilerini açıklayan polinomial modele ait eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$Y = 8,1454 + 0,1139X_1 - 0,0389X_2 - 0,2109 X_3 - 0,4127X_1^2 - 0,2187 X_1X_2 + 0,0055 X_2^2 - 0,1718X_3X_1 + 0,1160X_3X_2 - 0,1394X_3^2 \quad \text{(Eşitlik 4. 3)}$$

ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin yapay mide ortamında mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri Çizelge 4.5'te varyans analiz sonuçları Çizelge 4.6'da, Yapay mide ortamının (pH 2'de) mikroorganizma canlılığındaki azalış üzerine kalsiyum klorür molaritesi ve aljinat konsantrasyonunun etkisi ise Şekil 4.1'de verilmiştir.

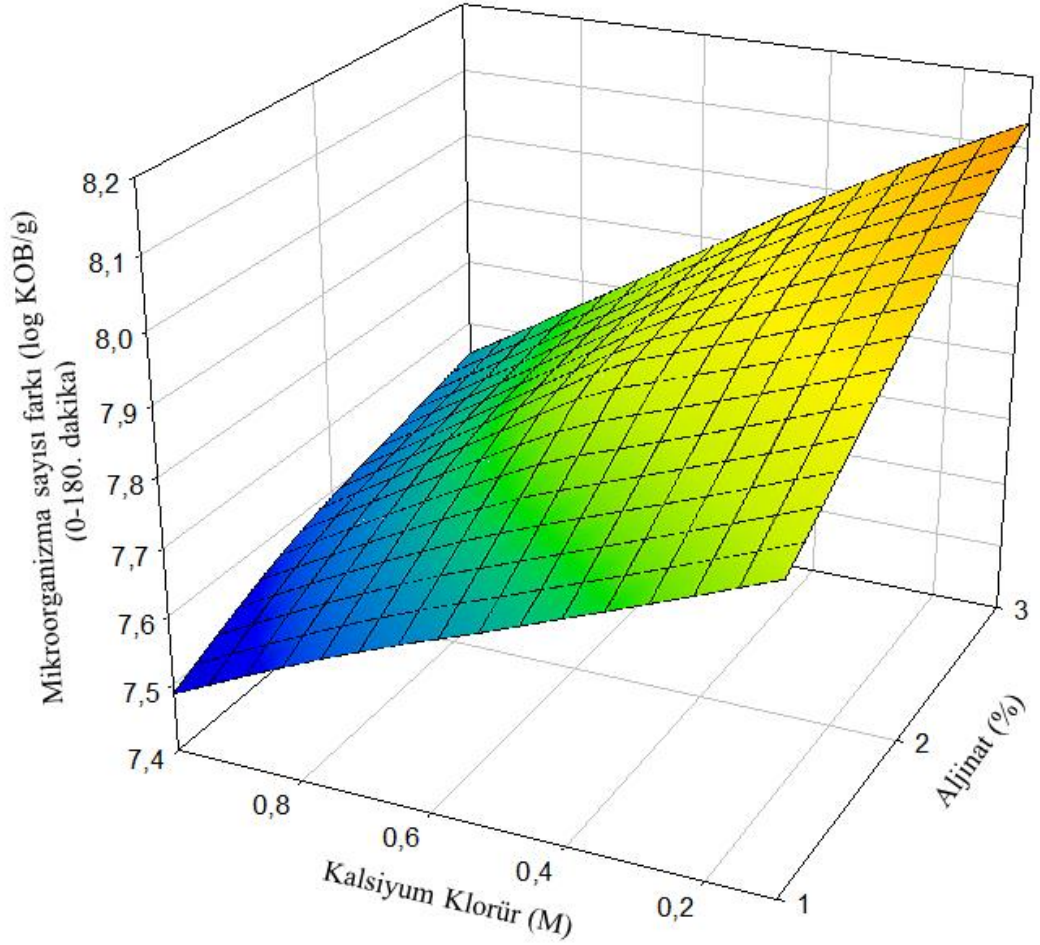
Çizelge 4.5 ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin yapay mide ortamında mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri

Aljinat (%)/Kitosan (%)/Kalsiyum Klorür(M)	Mikroorganizma Sayısı (log KOB/g)					
	0. dk	30. dk	60. dk	120. dk	180. dk	Fark (0-180. dk arası)
1/0/0,1	7,7	4,5	2,6	1,0	0,0	7,7
1/0/1	7,4	4,9	2,6	1,0	0,0	7,4
1/0,5/0,55	7,3	4,7	2,7	1,2	0,0	7,3
1/1/0,1	7,6	5,1	3,2	1,3	0,0	7,6
1.01.2001	7,6	5,1	3,0	1,4	0,0	7,6
2/0/0,55	7,6	5,3	3,2	1,1	0,0	7,6
2/0,5/0,1	8,0	4,7	2,5	1,2	0,0	8,0
2/0,5/0,55	8,7	5,5	2,6	1,2	0,0	8,7
2/0,5/0,55	7,9	5,0	2,6	1,1	0,0	7,9
2/0,5/1	7,9	5,2	3,3	1,2	0,0	7,9
2/1/0,55	8,6	5,6	3,1	1,3	0,0	8,6
3/0/0,1	8,7	5,2	3,1	1,2	0,0	8,7
3/0/1	7,5	5,0	3,3	1,4	0,0	7,5
3/0,5/0,55	8,6	5,0	3,2	1,8	0,5	8,1
3/1/0,1	8,7	5,8	3,8	2,5	1,1	7,6
3.01.2001	8,2	5,6	3,7	2,5	1,2	7,0
Kontrol (KPb4b)	8,8	3,6	0,0	0,0	0,0	8,8

Çizelge 4.6 Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin; yapay mide ortamında, 0. ve 180. dakikalar arasında mikroorganizma canlılığı üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	K.O	F
Model	9	4,4393	2,6866
X ₁ (Aljinat konsantrasyonu; %)	1	0,2595	1,4139
X ₂ (Kitosan konsantrasyonu; %)	1	0,0304	0,1656
X ₃ (Kalsiyum klorür; Molarite)	1	0,8902	4,8489*
X ₁ *X ₁	1	0,8983	4,8931*
X ₂ *X ₁	1	0,7659	4,1716
X ₂ *X ₂	1	0,0001	0,0009
X ₃ *X ₁	1	0,4724	2,5731
X ₃ *X ₂	1	0,2154	1,1736
X ₃ *X ₃	1	0,1025	0,5584
Uyum Eksikliği	5	2,0252	3,4192
Genel	31		

** : P<0.01 * : P<0.05



Şekil 4.3 ETDY ve ETDYK yöntemleri ile kaplanan mikrokapsüllerin aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin (pH 2’de) bakteri canlılığı üzerine etkisi

Çizelge 4.6’da görüldüğü üzere yapay mide ortamının 0. ve 180. dakika arasındaki bakteri canlılığına etkisi açısından değerlendirildiğinde, kalsiyum klorür molaritesinin bakteri canlılığı üzerindeki etkisinin önemli olduğu ($P<0.05$), ayrıca aljinat konsantrasyonunun kuadratik etkisinin de ($P<0.05$) düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.3’te analiz başlangıç ve sonu arasındaki canlı mikroorganizma sayısı farkının yüksek olduğu görülmektedir. Çizelge 4.5 incelendiğinde sadece %3 konsantrasyona sahip aljinat ve %1 konsantrasyonlu kitosan kapsüllerinde 180. dakika sonunda canlı mikroorganizma saptanmıştır.

Shori (2017) yaptığı çalışmada, yapay mide ortamlarındaki enkapsüle edilmiş probiyotiklerin canlılıkları üzerine, enkapsülasyon yöntemleri, enkapsülasyon materyalleri, polimer çeşitleri gibi birden fazla parametrenin etki edebileceğini ve özellikle kitosan kaplı aljinat mikroenkapsüllerinin bu ortamlarda, probiyotik canlılıklarındaki kaybı azalttığını belirtmiştir.

Heidebach vd. (2009) yaptıkları çalışmada serbest *L. paracasei* ve *B. lactis* kültürlerini 90 dakika boyunca pH 2,5 ortamında tutmuşlar ve süre sonunda bakteri canlılıkları sırasıyla 5 ve 3,0 log KOB/g oranında azalmıştır. Aynı çalışmada bu iki bakteri mikroenkapsüle edilerek yine pH 2,5 ortamında bekletilmiş ve canlılık kayıplarını sırasıyla 3,0 ve 2,7 log KOB/g olarak tespit etmişlerdir.

4.4 ETDY ve ETDYK Kaplama Yöntemlerinin Partikül Boyut Sonuçları

Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin; partikül boyut üzerindeki etkilerini açıklayan polinomial modele ait eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$Y = 633,1338 + 104,3302X_1 - 17,1553X_2 + 51,6875 X_3 - 108,1053X_1^2 + 12,4093X_1X_2 + 022,6304X_2^2 - 21,8525X_3X_1 - 13,9216X_3X_2 + 6,3182X_3^2 \text{ (Eşitlik 4.4)}$$

ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin parçacık büyüklükleri Çizelge 4.7’de, varyans analiz sonuçları Çizelge 4.8’de, aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin partikül boyut üzerine etkisi ise Şekil 4.4’te verilmiştir.

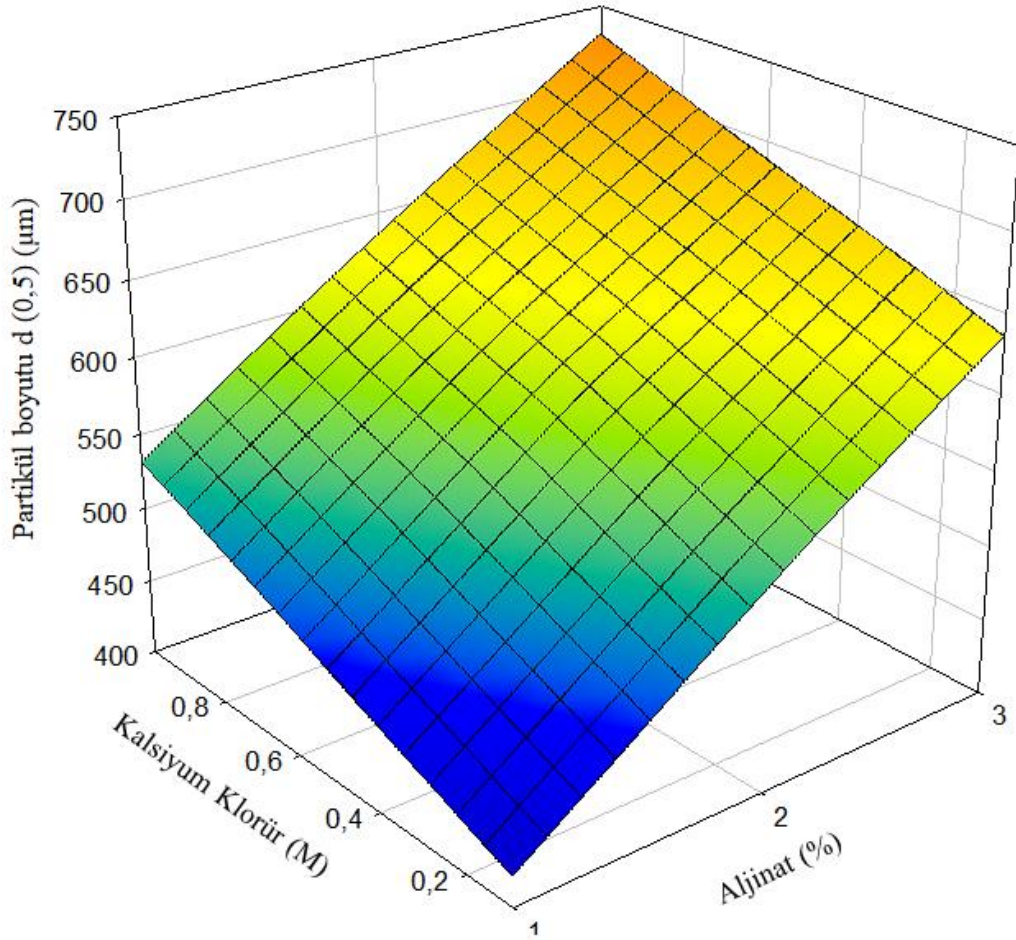
Çizelge 4.7 ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerin parçacık boyutları

Aljinat (%)/Kitosan (%)/Kalsiyum Klorür (M)	Partikül Büyüklüğü (µm)		
	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)
1/0/0,1	65,00	367,54	1069,19
1/0/1	101,80	557,59	1277,18
1/0,5/0,55	65,67	446,63	1179,55
1/1/0,1	63,30	372,53	1059,81
1.01.2001	78,69	474,99	1152,28
2/0/0,55	95,09	698,96	1350,58
2/0,5/0,1	50,21	571,50	1219,78
2/0,5/0,55	80,97	667,18	1292,17
2/0,5/0,55	70,65	657,55	1237,11
2/0,5/1	127,79	678,18	1338,34
2/1/0,55	57,35	583,34	1213,33
3/0/0,1	247,65	631,31	1176,86
3/0/1	361,56	702,05	1234,26
3/0,5/0,55	242,09	574,19	1053,91
3/1/0,1	206,77	654,04	1250,07
3.01.2001	373,73	700,99	1196,01

Çizelge 4.8 Aljinat konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin; partikül boyut üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	K.O	F
Model	9	361104,93	16,2947
X ₁ (Aljinat konsantrasyonu; %)	1	217696,02	88,4108**
X ₂ (Kitosan konsantrasyonu; %)	1	5886,09	2,3905
X ₃ (Kalsiyum klorür; Molarite)	1	53432,06	21,6998**
X ₁ *X ₁	1	61621,04	25,0256**
X ₂ *X ₁	1	2463,88	1,0006
X ₂ *X ₂	1	2700,37	1,0967
X ₃ *X ₁	1	7640,51	3,1030
X ₃ *X ₂	1	3100,99	1,2594
X ₃ *X ₃	1	210,49	0,0855
Uyum Eksikliği	5	23710,803	2,6466
Genel	31		

** : P<0.01 * : P<0.05



Şekil 4.4 ETDY ve ETDYK yöntemleri ile kaplanan mikrokapsüllerin, aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin partikül boyut üzerine etkisi

Çizelge 4.7’de verilen $d(0,1)$, $d(0,5)$ ve $d(0,9)$ değerleri parçacık boyutlarının sırasıyla %10, %50 ve %90’ının ölçülen değerden küçük olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.7’nin 1. satırında yer alan değerler incelendiğinde %1 aljinat, %0 kitosan ve 0,1 M kalsiyum klorür ile üretilen probiyotik kapsüllerinin %10’unun 65,00 μm , %50’sinin 367,54 μm ve %90’ının 1069,19 μm ’den daha küçük olduğu anlamına gelmektedir. Araştırma bulguları değerlendirilirken sonuçlardan $d(0,5)$ boyutları dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.8’de görüldüğü üzere partikül boyutu üzerine aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin çok önemli düzeyde etkili olduğu ($P < 0.01$) belirlenmiştir. Ayrıca, aljinat konsantrasyonunun partikül boyutları üzerindeki kuadratik etkisinin de çok önemli olduğu ($P < 0.01$) tespit edilmiştir. Şekil 4.4’te aljinat konsantrasyonu artarken kapsül partikül boyutunda büyüme olduğu ve

aynı şekilde kalsiyum klorür molaritesi artış gösterirken yine kapsül boyutunda yükselme olduğu görülmektedir.

Arslan ve Erbaş (2017) yaptıkları çalışmada çift tabaka kaplamanın partikül büyüklüğünü arttırdığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatür ile uyum göstermekte, Çizelge 4.7 incelendiğinde çift tabaka mikroenkapsülasyonlarda partikül büyüklüklerinin arttığı görülmektedir.

Probiyotik kültürlerin mikroenkapsülasyonu ile ilgili birçok çalışmada küçük boyutlu kapsüllerin parçacık içinde yüksek hücre konsantrasyonuna, oksijen, besin ve metabolit difüzyonuna olanak verdiği belirtilmektedir (Christenson vd., 1993).

Guiseley (1989) yaptığı çalışmada hücre immobilizasyonu için en iyi parçacık büyüklüğünün 500-1000 µm olduğunu belirtmiştir. Mikrokürelerin içine besin difüzyonu ve içeriden dışarıya metabolit atımı, mikrokürelerin küçük boyutlu, dolayısıyla geniş bir yüzey alanı olmasıyla ilişkilidir (Liu vd., 2010; Tan vd., 2011; Ylittervo vd., 2011).

4.5 Emülsiyon Tekniği ile Kaplama Depolama Sonuçları

Aljinat Konsantrasyonu, Bitkisel Yağ Konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin; depolama başlangıç ve son haftasındaki bakteri canlılığı üzerindeki etkilerini açıklayan polinomial modele ait eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$Y = 2,9636 - 1,0635X_1 - 0,2862X_2 - 0,1595 X_3 + 0,5000X_1^2 + 0,3677 X_1X_2 - 0,2047 X_2^2 + 0,2017 X_3X_1 + 0,0749 X_3X_2 - 0,1315X_3^2 \quad (\text{Eşitlik 4. 5})$$

Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin depolama süresince mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri izelge 4.9'da, varyans analiz sonuçları izelge 4.10'da, aljinat ve bitkisel yağ konsantrasyonunun depolama süresi boyunca bakteri canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.5'te verilmiştir.

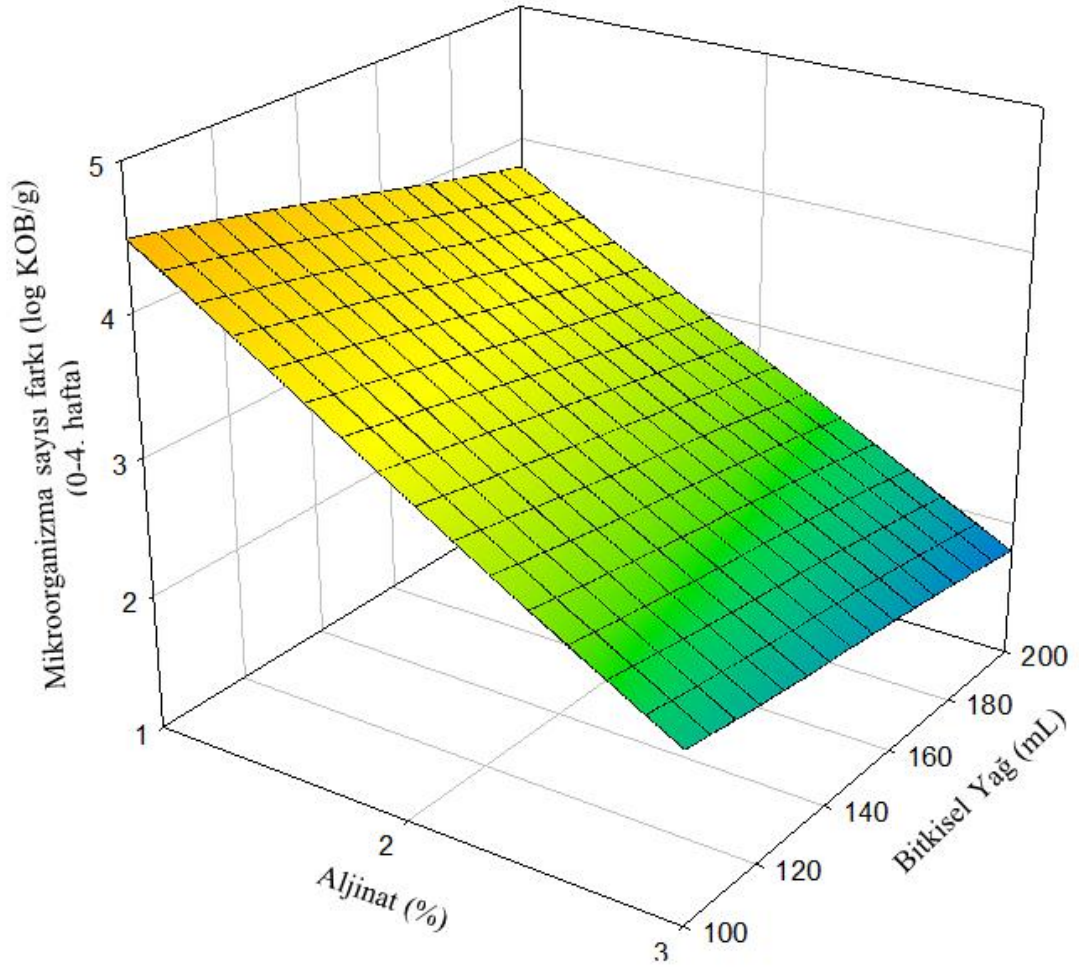
Çizelge 4.9 Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin depolama süresince mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri

Aljinat (%)/Bitkisel Yağ (mL)/Kalsiyum Klorür (M)	Mikroorganizma Sayısı (log KOB/g)					
	0. Hafta	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	Fark (0-4. Hafta Arası)
1/100/0,1	8,7	8,5	7,1	5,9	3,3	5,4
1/100/1	8,2	8,0	7,1	5,4	3,7	4,5
1/150/0,55	8,3	7,7	7,2	5,1	4,0	4,3
1/200/0,1	8,2	7,5	6,4	5,3	4,5	3,7
1/200/1	7,8	7,1	6,0	5,5	4,3	3,5
2/100/0,55	7,8	7,7	6,7	6,2	5,2	2,6
2/150/0,1	8,4	8,0	7,2	6,4	5,3	3,1
2/150/0,55	8,4	8,1	7,2	6,3	5,3	3,1
2/150/0,55	8,8	8,6	7,4	6,3	4,8	4,0
2/150/1	7,8	7,7	7,3	6,3	5,6	2,2
2/200/0,55	8,1	7,8	7,0	6,3	5,8	2,4
3/100/0,1	7,6	7,3	6,6	6,6	5,5	2,1
3/100/1	8,4	8,1	7,2	6,8	6,1	2,3
3/150/0,55	8,7	8,3	7,7	7,0	6,7	2,1
3/200/0,1	7,7	7,5	7,2	6,1	5,6	2,1
3/200/1	8,3	8,2	7,8	6,8	6,0	2,3
Kontrol (KPb4b)	8,9	7,8	4,3	2,2	0,0	8,9

Çizelge 4.10 Aljinat Konsantrasyonu, Bitkisel Yağ Konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin, depolama başlangıç ve son haftasındaki bakteri canlılığı üzerindeki etkilerine ait Varyans Analiz Sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	SD	K.O	F
Model	9	29,0076	2,2962
X ₁ (Aljinat konsantrasyonu; %)	1	22,6230	16,1175**
X ₂ (Bitkisel yağ konsantrasyonu; %)	1	1,6388	1,1676
X ₃ (Kalsiyum klorür; Molarite)	1	0,5090	0,3627
X ₁ *X ₁	1	1,3183	0,9393
X ₂ *X ₁	1	2,1643	1,5419
X ₂ *X ₂	1	0,2211	0,1575
X ₃ *X ₁	1	0,6515	0,4642
X ₃ *X ₂	1	0,0897	0,0640
X ₃ *X ₃	1	0,0912	0,0650
Uyum Eksikliği	5	2,9101	0,3538
Genel	31		

** : P<0,01 * : P<0,05



Şekil 4.5 Emülsiyon tekniği ile kaplanan mikrokapsüllerin, aljinat ve bitkisel yağ konsantrasyonunun depolamada bakteri canlılığı üzerine etkisi

Çizelge 4.10'daki veriler incelendiğinde emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin probiyotik mikroorganizmanın depolama süresince canlılığının korunmasında aljinat konsantrasyonunun çok önemli düzeyde etkili olduğu ($P<0,01$) tespit edilmiştir. Şekil 4.5'te aljinat konsantrasyonundaki artışın depolama sonundaki bakteri canlılığı üzerine etkisindeki rolü daha iyi anlaşılmaktadır. Aljinat konsantrasyonundaki artışın daha fazla sayıda hücrenin canlı kalmasını sağladığı, buna karşın bitkisel yağ konsantrasyonundaki değişimin canlılık üzerine önemli oranda etki etmediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4,9 incelendiğinde depolama sonunda en yüksek canlı mikroorganizma sayılarının %3 aljinatla kaplanan kapsüllerde bulunduğu buna karşın serbest hücrelerin 3. hafta sonunda canlılıklarını tamamen kaybettikleri görülmektedir.

Kahlweit vd. (1996) yaptıkları çalışmada kararlı mikroküreler elde edebilmek için uygun enkapsülasyon materyalinin çok önemli olduğunu ve mikrokapsül özelliklerinin kararlı bir yapı oluşturmasında dominant bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde emülsiyon tekniğinde aljinat kullanımı ile elde edilen sonuçların yukarıda verilen çalışma sonuçları ile uyum gösterdiği görülmektedir.

4.6 Emülsiyon Tekniği ile Üretilen Mikrokapsüllerin Yapay İnce Bağırsak Ortamındaki Canlılık Sonuçları

Emülsiyon tekniğinde aljinat konsantrasyonu, bitkisel yağ konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin, yapay ince bağırsak ortamında 0-180. dakika arasında bakteri canlılığı üzerindeki etkilerini açıklayan polinomial modele ait eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$Y = 1,4889 + 0,1128X_1 - 0,1007 X_2 - 0,0640 X_3 - 0,0925X_1^2 + 0,1145 X_1X_2 + 0,2147X_2^2 + 0,1808 X_3X_1 + 0,0561 X_3X_2 - 0,4594X_3^2 \quad \text{(Eşitlik 4. 6)}$$

Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin yapay incebağırsak ortamındaki canlılık sonuçları Çizelge 4.11'de, varyans analiz sonuçları Çizelge 4.12'de aljinat konsantrasyonunun ve kalsiyum klorür molaritesinin yapay ince bağırsak ortamında bakteri canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.11 Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin yapay incebağırsak ortamındaki canlılık sonuçları

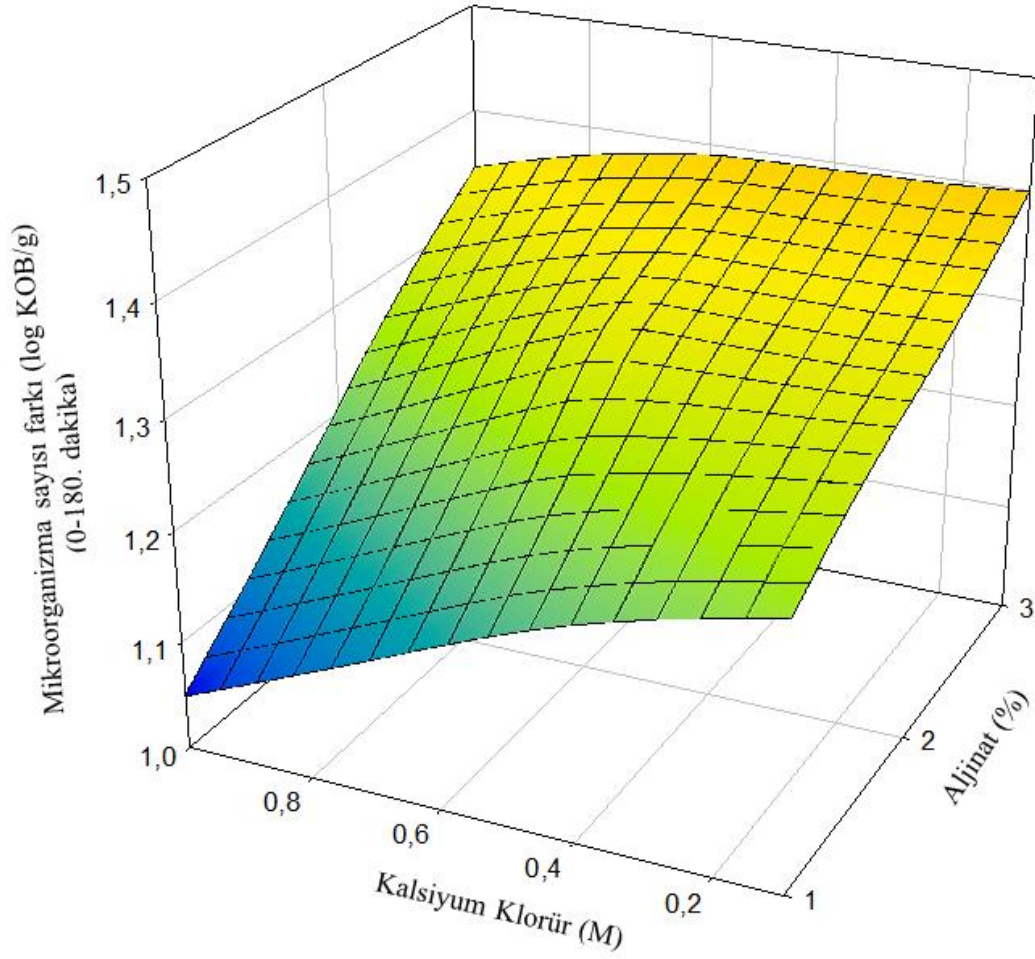
Aljinat (%)/Bitkisel Yağ (mL)/Kalsiyum Klorür (%)	Mikroorganizma Sayısı (log KOB/g)				
	0. dk	60. dk	120. dk	180. dk	Fark (0-180. dk Arası)
1/100/0,1	8,2	7,6	6,8	6,5	1,7
1/100/1	7,8	7,5	7,1	7,0	0,8
1/150/0,55	8,2	7,5	7,1	6,9	1,3
1/200/0,1	7,7	7,1	6,7	6,7	1,0
1/200/1	7,4	7,1	6,9	6,8	0,6
2/100/0,55	8,4	7,2	7,1	6,6	1,9
2/150/0,1	7,5	7,1	6,8	6,6	0,9
2/150/0,55	8,3	8,0	7,0	6,8	1,5
2/150/0,55	7,8	7,5	6,7	6,7	1,1
2/150/1	7,7	7,6	6,5	6,3	1,5
2/200/0,55	8,8	8,4	7,7	7,0	1,8
3/100/0,1	7,5	7,4	6,4	6,4	1,2
3/100/1	8,2	7,8	7,0	7,0	1,3
3/150/0,55	8,9	8,0	7,4	7,2	1,7
3/200/0,1	8,7	8,3	7,6	7,5	1,2
3/200/1	8,3	7,6	7,5	7,1	1,2
Kontrol (KPb4b)	8,9	7,7	7,6	7,5	1,4

Çizelge 4.12 Emülsiyon tekniğinde aljinat konsantrasyonu, bitkisel yağ konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin, yapay ince bağırsak ortamında 0-180. dakika arasında bakteri canlılığı üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	K.O	F
Model	9	2,7845528	1,2063
X ₁ (Aljinat konsantrasyonu; %)	1	0,2548245	0,9935
X ₂ (Bitkisel yağ konsantrasyonu; %)	1	0,2028388	0,7908
X ₃ (Kalsiyum klorür; Molarite)	1	0,0820365	0,3198
X ₁ *X ₁	1	0,0451801	0,1762
X ₂ *X ₁	1	0,2099725	0,8187
X ₂ *X ₂	1	0,2432698	0,9485
X ₃ *X ₁	1	0,5232765	2,0402
X ₃ *X ₂	1	0,0503949	0,1965
X ₃ *X ₃	1	1,1130388	4,3396*
Uyum Eksikliği	5	1,0429778	0,7709
Genel	31		

** : P<0,01

* : P<0,05



Şekil 4.6 Emülsiyon tekniği ile kaplanan mikrokapsüllerin, aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin (pH 6,8’de) bakteri canlılığı üzerine etkisi

Çizelge 4.12’de verilen sonuçlar incelendiğinde yapay ince bağırsak ortamında 0-180. dakikada arasındaki bakteri sayısı üzerinde, kalsiyum klorür molaritesinin kuadratik etkisinin $P<0,05$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.6’da kalsiyum klorür molaritesindeki artışın analiz sonundaki canlı bakteri sayısındaki farkın az olmasında önemli olduğu görülmektedir.

Benzer şekilde Chen vd. (2017) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus bulgaricus* kültürünü aljinat ve peynir altı suyu protein izolatı ile emülsiyon tekniğini kullanarak mikrokapsüle etmişler ve yapay ince bağırsak ortamının mikrokapsüller üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre ortamda 4 saat bekletilen serbest hücre ve enkapsüle edilmiş hücreler, canlılıklarını sırasıyla 0,16 ve 0,21 log KOB/g oranında arttırmıştır. Sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla benzer

olup, yapay ince bağırsak ortamının, hücre canlılığında herhangi bir azaltıcı etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir.

4.7 Emülsiyon Tekniği ile Üretilen Mikrokapsüllerin Yapay Mide Ortamındaki Canlılık Sonuçları

Emülsiyon tekniğinde aljinat konsantrasyonu, bitkisel yağ konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin, yapay mide ortamında 0-180. dakika arasında bakteri canlılığı üzerindeki etkilerini açıklayan polinomial modele ait eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$Y = 8,0188 + 0,1872X_1 + 0,0208X_2 + 0,0005X_3 + 0,0563X_1^2 + 0,0659 X_1X_2 - 0,0452X_2^2 - 0,0512X_3X_1 - 0,0399 X_3X_2 - 0,0745X_3^2 \quad (\text{Eşitlik 4. 7})$$

Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin yapay mide ortamındaki canlılık sonuçları Çizelge 4.13'te varyans analiz sonuçları Çizelge 4.14'te, aljinat konsantrasyonunun ve kalsiyum klorür molaritesinin yapay mide ortamında bakteri canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.7'de verilmiştir.

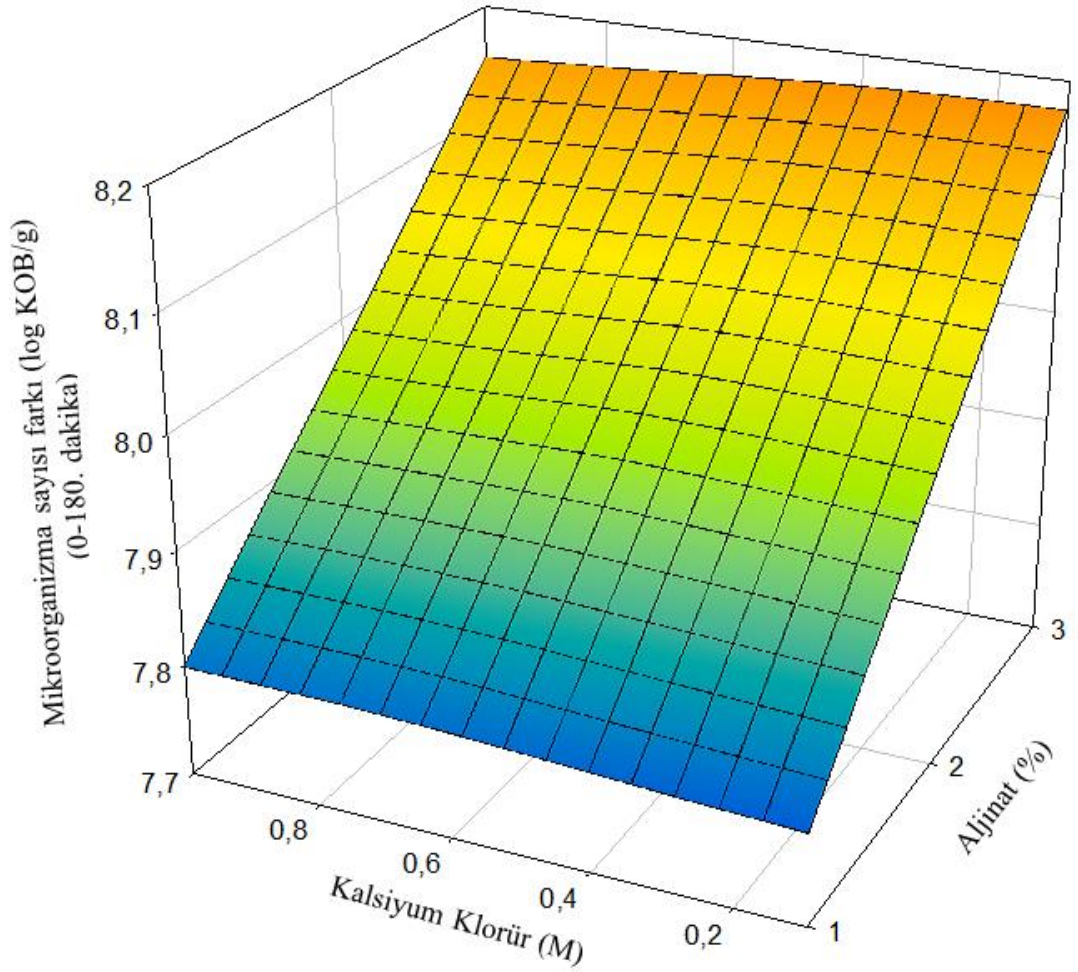
Çizelge 4.13 Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin yapay mide ortamındaki canlılık sonuçları

Aljinat (%)/Bitkisel Yağ (mL)/Kalsiyum Klorür (%)	Mikroorganizma Sayısı (log KOB/g)					
	0. dk	30. dk	60. dk	120. dk	180. dk	Fark (0-180. dk arası)
1/100/0,1	7,7	4,7	2,4	1,0	0,0	7,7
1/100/1	8,1	6,0	3,1	1,7	0,0	8,1
1/150/0,55	7,8	4,5	2,4	1,1	0,0	7,8
1/200/0,1	7,7	4,7	1,8	1,1	0,0	7,7
1/200/1	7,8	5,1	2,1	1,3	0,0	7,8
2/100/0,55	7,7	4,6	1,4	1,1	0,0	7,7
2/150/0,1	8,1	4,8	2,3	1,1	0,0	8,1
2/150/0,55	8,3	5,6	2,6	1,2	0,0	8,3
2/150/0,55	8,1	6,2	2,5	1,2	0,0	8,1
2/150/1	7,6	5,0	1,9	1,2	0,0	7,6
2/200/0,55	8,2	5,0	1,8	1,2	0,0	8,2
3/100/0,1	8,2	5,1	2,0	1,2	0,0	8,2
3/100/1	8,2	5,3	1,9	1,3	0,0	8,2
3/150/0,55	8,2	5,0	2,4	1,4	0,0	8,2
3/200/0,1	8,2	5,2	2,1	1,3	0,0	8,2
3/200/1	8,2	4,9	2,7	1,4	0,0	8,2
Kontrol (KPb4b)	8,8	3,6	1,1	0,0	0,0	8,8

Çizelge 4.14 Emülsiyon tekniğinde aljinat konsantrasyonu, bitkisel yağ konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin, yapay mide ortamında 0-180. dakika arasında bakteri canlılığı üzerindeki etkilerine ait varyans analiz sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	SD	K.O	F
Model	9	0,9041	0,3803
X ₁ (Aljinat konsantrasyonu; %)	1	0,7012	2,6544
X ₂ (Bitkisel yağ konsantrasyonu; %)	1	0,0086	0,0329
X ₃ (Kalsiyum klorür; Molarite)	1	0,000006	0,0000
X ₁ *X ₁	1	0,0167	0,0635
X ₂ *X ₁	1	0,0694	0,2630
X ₂ *X ₂	1	0,0107	0,0408
X ₃ *X ₁	1	0,0419	0,1589
X ₃ *X ₂	1	0,0255	0,0967
X ₃ *X ₃	1	0,0292	0,1108
Uyum Eksikliği	5	0,7085	0,4720
Genel	31		

** : P<0,01 * : P<0,05



Şekil 4.7 Emülsiyon tekniği ile kaplanan mikrokapsüllerin, aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin (pH 2’de) bakteri canlılığı üzerine etkisi

Çizelge 4.14’te verilen sonuçlar değerlendirildiğinde yapay mide ortamında (pH 2’de) kaplanmış probiyotik mikroorganizma canlılığının 0. ve 180. dakikası arasındaki farkta, denemede kullanılan faktörlerin etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde analiz sonundaki farkın çok yüksek olduğu ve başlangıçtaki canlı sayısını koruyamadığı aljinat konsantrasyonundaki artışın bu farkı biraz azalttığı ancak Çizelge 4.13 incelendiğinde 180. dakika sonunda hiç canlı mikroorganizma kalmadığı, Buna karşın serbest hücrelerin canlılıklarını 120. dakika sonunda tamamen kaybettikleri halde mikrokapsüllerin bu süre sonunda azda olsa bakteri canlılığını koruduğu tespit edilmiştir.

Gonzales vd. (2009) yaptıkları çalışmada *L. rahnosus* probiyotik kültürünü emülsiyon yöntemiyle mikroenkapsüle etmişler ve pH 2,3’te emülsiyon yöntemiyle

elde edilen kapsüllerin canlılıklarını serbest hücreye göre daha iyi koruduklarını tespit etmişlerdir.

Rathar vd. (2017) *L. plantarum* NCDC201 bakterisini aljinat ile kaplamışlar ve pH 2,0 ortamında 120 dakika sonunda canlı hücre sayılarını aynı ortamdaki serbest hücre sayıları ile karşılaştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre serbest canlı hücreler 120 dakika sonunda %72,25 oranında azalırken aljinat kaplı kapsüllerdeki canlı bakteri sayısındaki azalış % 47,50 oranında kalmıştır.

4.8 Emülsiyon Tekniği ile Üretilen Probiyotik Mikrokapsüllerinin Parçacık Boyut Analizleri Sonuçları

Emülsiyon tekniğinde aljinat konsantrasyonu, bitkisel yağ konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin, mikrokapsüllerin parçacık boyutları üzerine etkilerini açıklayan polinomial modele ait eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$Y = 235,6340 + 1,5351X_1 - 38,6937X_2 + 0,22705X_3 + 183,7234X_1^2 - 54,8934X_1X_2 - 31,6026X_2^2 - 19,2196X_3X_1 - 21,1246X_3X_2 - 45,0483X_3^2 \text{ (Eşitlik 4.8)}$$

Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin parçacık büyüklükleri Çizelge 4.15'te, varyans analiz sonuçları Çizelge 4.16'da, aljinat ve bitkisel yağ konsantrasyonunun partikül boyut üzerine etkisi Şekil 4.8'de verilmiştir.

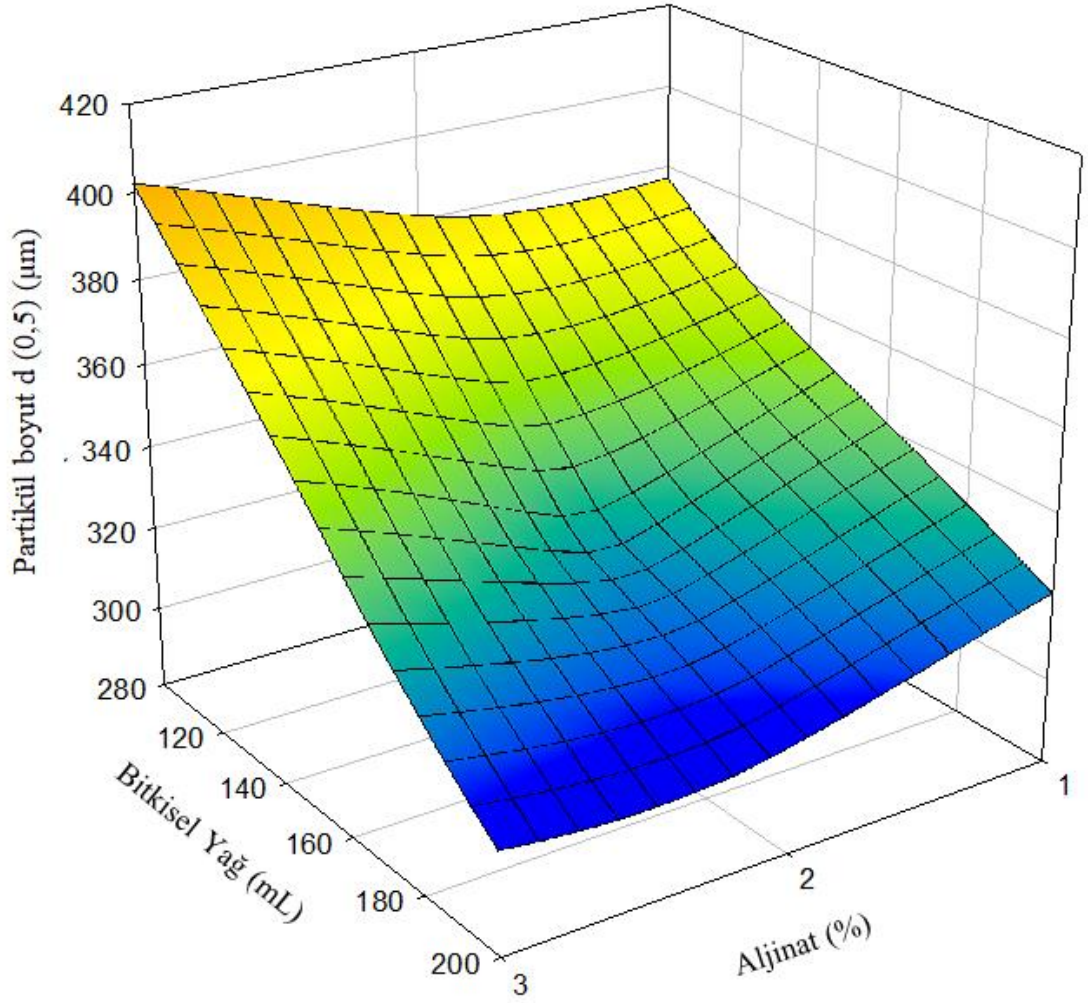
Çizelge 4.15 Emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin parçacık büyüklükleri

Aljinat (%)/Bitkisel Yağ (mL)/Kalsiyum Klorür (%)	Partikül Büyüklüğü (µm)		
	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)
1/100/0,1	71,34	334,56	737,65
1/100/1	38,53	499,03	948,00
1/150/0,55	56,42	341,69	843,95
1/200/0,1	77,65	476,51	998,47
1/200/1	114,46	383,55	1178,96
2/100/0,55	43,45	257,34	753,84
2/150/0,1	66,62	173,83	390,32
2/150/0,55	33,83	263,54	819,16
2/150/0,55	40,68	248,81	711,03
2/150/1	44,74	186,81	440,72
2/200/0,55	40,51	256,60	720,17
3/100/0,1	138,98	539,39	1155,21
3/100/1	112,35	454,05	986,08
3/150/0,55	90,88	476,49	969,89
3/200/0,1	42,52	288,83	852,19
3/200/1	50,44	291,93	605,22

Çizelge 4.16 Emülsiyon tekniğinde aljinat konsantrasyonu, bitkisel yağ konsantrasyonu ve CaCl₂ molaritesinin, mikrokapsüllerin parçacık boyutları üzerine etkilerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	K.O	F
Model	9	339865,5	0,9558
X ₁ (Aljinat konsantrasyonu; %)	1	47,13	0,0012
X ₂ (Bitkisel yağ konsantrasyonu; %)	1	29944,13	0,7579
X ₃ (Kalsiyum klorür; Molarite)	1	1,03	0,0000
X ₁ *X ₁	1	177977,15	4,5049*
X ₂ *X ₁	1	48212,63	1,2203
X ₂ *X ₂	1	5266,02	0,1333
X ₃ *X ₁	1	5910,34	0,1496
X ₃ *X ₂	1	7140,04	0,1807
X ₃ *X ₃	1	10700,23	0,2708
Uyum Eksikliği	5	62193,84	0,2620
Genel	31		

** : P<0,01 * : P<0,05



Şekil 4.8 Emülsiyon tekniği ile kaplanan mikrokapsüllerin, aljinat ve Bitkisel yağ konsantrasyonunun partikül boyut üzerine etkisi

Çizelge 4.16’da verilen sonuçlara göre, emülsiyon tekniği ile üretilen mikrokapsüllerin partikül büyüklüğü üzerine aljinat konsantrasyonunun kuadratik etkisinin önemli düzeyde ($P < 0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.8 incelendiğinde aljinat konsantrasyonunun %1’den %3’e doğru giderken partikül boyutuna etki ettiği ancak bu etkinin tek yönde artış, ya da tek yönde azalış şeklinde olmadığı, buna karşın bitkisel yağ konsantrasyonu arttığında ise partikül boyutunun azaldığı, ancak bu azalışın da istatistiki olarak önemli olmadığı ($P > 0,05$) tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında emülsiyon tekniği ile üretilen kapsüllerin partikül büyüklükleri ortalama 342 μm olarak belirlenmiştir.

Robitaille vd. (2000) yaptıkları çalışmada probiyotik mikroorganizmalar için mikrokapsül boyutunun 350 µm'den az olmasının yeterli olduğunu; çok küçük boyutlu mikroenkapsüllerin çözünürlüğünün düşük olacağını belirtmişlerdir. Büyük boyutlu mikrokapsüllerin, çekirdek madde üzerinde daha etkili koruma sağladıklarına ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır (Zhao vd. 2008).

Çalışmada, emülsiyon tekniğiyle üretilen mikrokapsüllerin boyutlarının, ETDY ve ETDYK yöntemleriyle üretilen mikrokapsüllere göre daha küçük boyutlu olmalarına rağmen, hücre canlılığını, serbets hücrelere göre, depolama ve yapay mide ortamında daha iyi koruduğu ve partikül büyüklüğünün kabul edilebilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma kapsamında moleküler tanısı yapılmış ve probiyotik özellikleri belirlenmiş *L. acidophilus* KPb4b bakterisinin; emülsiyon tekniği, elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi ve çift tabaka kaplama (elektrostatik titreşim/damlatma yöntemi + kitosan ile ikinci kaplama) yöntemleri ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiş ve üretilen kapsüllerin in vitro gastrointestinal koşullardaki canlılık düzeyi araştırılmıştır. Çalışma deneme deseni Yanıt Yüzeyi Yöntemi 2 merkez noktalı, Merkezi Bileşik Desen modeli esas alınarak gerçekleştirilmiş ve faktörler arasındaki ilişkinin analiz edilmesi açısından da kullanışlı bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan analizlerde başlangıç ve analiz sonundaki canlı mikroorganizma sayısı arasındaki fark değerlerinin düşük olması, *L. acidophilus* KPb4b suşunun test edilen depolama ve yapay sindirim koşullarına dayanımının yüksek olduğunu göstermektedir.

Depolama çalışmaları sonuçlarına göre, 1 ay boyunca +5 °C'de depolanan kaplama işlemi uygulanmamış, kontrol olarak kullanılan *L. acidophilus* KPb4b hücrelerinin 4. hafta sonunda canlılığını tamamen kaybettiği; buna karşın ETDY ve ETDYK kaplama yöntemleri ile üretilen mikrokapsüllerde, 4. hafta sonunda canlılığını hala korumakta olduğu, aljinat ve kitosan konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin canlı mikroorganizma sayısının korunmasında olumlu yönde etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Depolama sonuçlarına göre aljinat konsantrasyonunun etkisinin (P<0,01) düzeyinde çok önemli olduğu, ayrıca bu faktörlerden aljinat konsantrasyonu ve kitosan konsantrasyonunun interaksiyon etkisinin de (P<0,01) düzeyinde çok önemli olduğu tespit edilmiştir.

Benzer şekilde emülsiyon tekniği ile üretilen *L. acidophilus* KPb4b kapsüllerinin 4. hafta sonunda bakterinin canlılığını korumada etkili olduğu, ancak kaplanmış bakterilerde sadece aljinat konsantrasyonunun depolama sonuçlarına

pozitif yönde bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Aljinat konsantrasyonunun bu etkisinin depolama süresince canlılığın korunmasında çok önemli düzeyde etkili olduğu ($P<0,01$) tespit edilmiştir.

Her üç kaplama yönteminde de yapay ince bağırsak ortamında (pH 6,8'de) bakteri canlılığının belirlenmesi çalışmalarında, 0. dakika ve 180. dakika değerleri arasındaki farkın düşük bulunması canlılığın bu ortamda korunduğunu göstermektedir. Serbest hücrelerde de büyük oranda bir canlılık kaybı tespit edilmemiştir.

Özellikle emülsiyon tekniği ile yapılan kaplamalarda canlılığın korunmasında yapay ince bağırsak ortamında (pH 6,8'de) kalsiyum klorür molaritesinin kuadratik etkisinin ($P<0,05$) düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında uygulanan her üç kaplama yönteminde de yapay mide ortamında (pH 2'de) kaplanmamış *L. acidophilus* KPb4b hücreleri canlılığını 60. ve 120. dakikada tamamen kaybederken, her üç kaplama yöntemiyle kaplanmış bakteri kültürlerinin 120. dakika sonunda canlılıklarını düşük düzeyde de olsa korudukları tespit edilmiştir.

İstatistiki olarak ETDY ve ETDYK kaplama yöntemlerinde bakteri canlılığının korunmasında kalsiyum klorür molaritesinin bakteri canlılığı üzerindeki etkisinin önemli olduğu ($P<0,05$), aljinat konsantrasyonunun kuadratik etkisinin de ($P<0,05$) düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Özellikle kitosan konsantrasyonunun %1 olduğu iki kaplamada da bakteri, canlılığını 180. dakika sonuna kadar korumuştur.

Araştırma bulgularına göre ETDY ve ETDYK kaplama yöntemlerinde aljinat konsantrasyonu ve kalsiyum klorür molaritesinin mikrokapsül boyutları üzerine çok önemli düzeyde ($P<0,01$) etki ettiği, emülsiyon tekniğinde ise aljinat konsantrasyonunun mikrokapsül boyutları üzerinde önemli düzeyde ($P<0,05$) etkili olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen veriler, değişik mikroenkapsülasyon teknikleriyle kaplama işleminin bakteri canlılığının korunması üzerinde önemli etkileri olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle +4 °C'de depolama ve pH 2 gibi ortamlarda serbest

hücrelerin dayanıksızlığı, buna karşın kaplanmış mikroenkapsüllerin bakteri canlılığını korumadaki etkisi, mikroenkapsülasyonun etkili bir çözüm yöntemi olduğunu göstermektedir.

Mikroenkapsülasyon işleminde kullanılacak tekniklerin seçimi partikül boyutunu ve mikroorganizma canlılığını etkilemektedir. Bu nedenle elde edilecek mikroenkapsülün kullanım amacına uygun olarak emülsiyon, elektrostatik titreşim/ damlatma ve çift tabaka kaplama, elektrostatik titreşim/ damlatma yöntemi ile birinci kaplama üzerine kitosan ile ikinci tabaka kaplama yöntemlerinin ayrı ayrı veya birlikte kullanılması önerilmektedir.

Bu alanda daha sonra yapılacak çalışmalarda, yanıt yüzey yöntemiyle, farklı probiyotik kültürleri ve farklı kaplama materyalleri kullanılarak, kapsül içerisindeki biyoaktif bileşenlerin salınım özelliklerinin belirlenmesi, gıda matrisi ortamında ve gıda işleme koşullarında mikrokapsüllerin koruyucu etkisinin belirlenmesi üzerinde çalışmalar yapılarak, yeni potansiyel probiyotik kültürlerin ve kaplama yöntemlerinin teknolojiye kazandırılması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adhikari K, Mustapha A, Grun IU and Fernando L. (2000) “Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yoghurt during refrigerated storage” *Journal of Dairy Science*, 83: 1946-1951.
- Amiet-Charpentier C, Gadille P and Benoit JP (1999) “*Rhizobacteria* microencapsulation: properties of microparticles obtained by spray-drying” *Journal of Microencapsulation*, 16 (2): 215–229.
- Anal AK and Singh H (2007) “Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery” *Trends in Food Science and Technology*, 18: 240-251.
- Arslan S and Erbas M (2017) “Single and double layered microencapsulation of probiotics by spraydrying and spray chilling” *LWT - Food Science and Technology*, 81: 160-169.
- Augustin MA, Sanguansri L, Margetts C and Young B (2001) “Microencapsulation of food ingredients” *Food Australia*, 53: 220-223.
- Badr HR, Toledo R and Hamdy MK, (2001) “Continuous acetone–ethanol–butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*” *Biomass and Bioenergy*, 20 (2): 119-132.
- Bashan Y (1986) “Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth” *Applied Environmental Microbiology*, 51 (5): 1089-1098.
- Başıyigit G (2004) “Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılma özellikleri” (Yüksek Lisans Tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta, s. 96.
- Binns N (2013) “Probiotics, Prebiotics And The Gut Microbiota” D/2013/10.996/36 Belgium.
- Brandenberger H and Widmer F (1998) “A new multinozzle encapsulation/immobilisation system to produce uniform beads of alginate” *Journal of Biotechnology*, 63 (1): 73-80.
- Brun-Graeppi AKAS, Richard, C., Bessodes, M., Scherman, D and Merten, OW., (2011) “Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers” *Journal of Controlled Release*, 149 (3): 209-224.

- Byrd W, de Lorimier A, Zheng ZR and Cassels FJ (2005) “Microencapsulated subunit vaccine approach to enterotoxigenic *Escherichia coli* and other mucosal pathogens” *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (9): 1362-1380.
- Capela P, Hay TKC and Shah NP (2006) “Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt” *Food Research International*, 39(2): 203-211.
- Capela B, Hay TKC and Shah NP (2007) “Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria” *Food Research International*, 40: 1261–1269.
- Cardarelli HR, Buriti FCA, Castro IA and Saad SMI (2008) “Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese” *LWT - Food Science and Technology*, 41: 1037-1046.
- Carroll IM, Andrus JM, Bruno-Bárcena JM, Klaenhammer TR, Hassan HM and Threadgill DS (2007) “Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis” *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 293: G729-G738.
- Cassidy MB, Lee H and Trevors JT (1996) “Environmental applications of immobilized microbial cells: a review” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 16 (2): 79-101.
- Cedgard L (2001) “Probiotics: The link between health and disease” <http://www.positivehealth.com/permit/Articles/Environment/probiot.htm>. 11 Şubat 2010.
- Ceyhan N ve Alıç H (2012) “Bağırsak Mikroflorası ve Probiyotikler” *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 5 (1): 107-113.
- Champagne CP and Gardner NJ (2005) “Challenges in the addition of probiotic cultures to foods” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 61-84.
- 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.
- Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez, FC, Marzo F and Villarán MdC, (2010) “Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions” *International Journal of Food Microbiology*, 142 (1-2): 185-189.
- Chen HY, Li XY, Liu BJ and Meng XH (2017) “Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays undersimulated gastrointestinal conditions” *Journal of Functional Foods*, 29: 248-255.

- Christenson L, Dionne K and Lysaught M, (1993) "Biomedical application of immobilized cells. In: Goosen, MFA (Ed.), Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization" CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 7-41.
- Claude PC and Fustier P (2007) "Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods" Current Opinion in Biotechnology, 18: 184-190.
- Çakır İ, Karahan, AG, ve Çakmakçı ML (2001) "Probiotic and functional properties of some traditional Turkish foods" 1st Euroasian Congress on Molecular Biotechnology, Trabzon, pp. 89-93.
- Çakır İ (2003) "Laktobasillus ve bifidobakterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi" Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Çakır İ, Erge HS ve İşleyen MF (2010) "Probiyotiklerde Mikroenkapsülasyon Tekniğinin Mikrobiyolojik Stabilitesi, Oksijen Toksikitesi, *In Vitro* Protein Sindirilebilirliği ve Duyusal Özellikler Üzerine Etkilerinin Araştırılması" Proje Sonuç Raporu (TÜBİTAK-TOVAG Kariyer Proje No: 106O559), 105 sayfa.
- Çakır İ (2010) "Antibacterial and antifungal activities of some lactic acid bacteria isolated from naturally fermented herbs" Journal of Food, Agriculture & Environment, 8 (2): 223-226.
- Dave RI ve Shah NP (1997) "Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures" International Dairy Journal, 7(1): 31-41.
- Dave RI ve Shah NP (1998) "Ingredients supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoğurt" Journal of Dairy Science, 81: 2804-2816.
- De Castro-Cislaghi FP, Silva CDRE, Fritzen-Freire CB, Lorenz JG and Sant'Anna ES (2012) "*Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage" Journal of Food Engineering, 113 (2): 186-193.
- De Prisco A, Maresca D, Ongeng D and Mauriello G (2015) "Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment" LWT - Food Science and Technology, 61: 452-462.
- De Vos P, Faas MM, Spasojevic M and Sikkema J (2010) "Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components" International Dairy Journal, 20 (4): 292-302.
- Del Gaudio P, Colombo P, Colombo G, Russo P and Sonvico F (2005) "Mechanisms of formation and disintegration of alginate beads obtained by prilling" International Journal of Pharmaceutics, 302: (1-2), 1-9.

- Demitri C, Lamanna L, De Benedetto E, Damiano F, Cappello MS, Siculella L and Sannino A (2017) “Encapsulation of *Lactobacillus kefir* in alginate microbeads using a double novel aerosol technique” *Materials Science and Engineering*, 77: 548-555.
- Desai KGH and Park HJ (2005) “Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients” *Drying Technology*, 23: 1361-1394.
- Donkor ON, Nilmini SLI, Stolic P, Vasiljevic T and Shah NP (2007) “Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage” *International Dairy Journal*, 17: 657-665.
- Fuller R (1992) “Probiotics” *The Scientific Basis*. London: Chapman & Hall. p. 125.
- Getachew AT and Chun BS (2016) “Optimization of coffee oilflavor encapsulation using response surface methodology” *LWT - Food Science and Technology*, 70: 126--134.
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A and Saurel R (2007) “Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients” *Food Research International*, 40: 1107-1121.
- Gibbs BF, Kermasha S, Alli I and Mulligan CN (1999) “Encapsulation in the food industry” *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50: 213-224.
- Gilliland SE (1989) “*Acidophilus* milk products: A review of potential benefits to consumers” *Journal of Dairy Science*, 72: 2483–2494.
- Gomes AMP and Malcata FX (1999) “*Bifidobacterium* ssp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics.” *Trends in Food Science and Technology*, 10: 139-157.
- González DJP, Montiel RGC, Calleros CL, Islas RP and Carter VEJ (2009) “Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions” *Food Research International* doi:10.1016/j.foodres.2008.12.002.
- Gouin S (2004) “Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends” *Trends in Food Science and Technology*, 15: 330-347.
- Graff S, Hussain S, Chaumeil JC and Charrueau C (2008) “Increased intestinal delivery of viable *Saccharomyces boulardii* by encapsulation in microspheres” *Pharmaceutical Research*, 25 (6): 1290-1296.
- Guiseley KB (1989) “Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization” *Enzyme and Microbial Technology*, 11 (11): 706-716.

- Hansen TL, Allan PM, Jin YL and Paulson AT (2002) Survival of free and calcium-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19: 35-45.
- Heidebach T, Först P and Kulozik U (2009) “Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells” *International Dairy Journal*, 19: 77-84.
- Holzapfel WH and Schillinger U (2002) “Introduction to pre-and probiotics.” *Food Research International*, 35: 109-116.
- Huq T, Frascini C, Khan A, Riedl B, Bouchard J and Lacroix M (2017) “Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin” *Carbohydrate Polymers* 168: 61–69.
- Iyer C and Kailasapathy K (2005) “Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt” *Journal of Food Science* 70 (1): 18-23.
- İşleyen MF (2010) “Mikroenkapsülasyon Tekniğinin *Lactobacillus acidophilus* KPb4b Ve *Lactobacillus rhamnosus* KPb7 Probiyotik Kültürlerinin Stabilitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması” Yüksek Lisans Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bolu.
- İşleyen MF ve Çakır İ (2016) “Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of viability in storage conditions and in food” *Research Journal of Biotechnology*, 11 (12): 31-37.
- Jantarathin S, Borompichaichartkul C and Sanguandeeikul R (2017) “Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding” *Materials Today: Proceedings* 4: 6166-6172.
- Kahlweit M, Busse G, Faulhaber B and Jen J (1996) “Shape changes of globules in nonionic microemulsions” *J. Phys. Chem.*, 100: 14991-14994.
- Kailasapathy K (2002) “Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications” *Current Issues in Intestinal Microbiology* 3 (2): 39-48.
- Kanmani P, Kumar RS and Yuvaraj N (2011) Cryopreservation and microencapsulation of a probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions *Biotechnology Bioprocess Engineering* 16: 1106.
- Kim IK, Baek YJ and Yoon YH, (1996) “Effects of rehydration and immobilisation in Ca-alginate on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*” *Korean J. Dairy Sci.* 18: 193-198.

- Kneifel W, Mattila-Sandholm T and Wright A (1999) "Probiotic Bacteria Detection and estimation in fermented and non-fermented dairy products." *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3: 1783-1789.
- Krasaekoopt W, Bhandari B and Deeth H (2003) "Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt" *International Dairy Journal*, 13 (1): 3-13.
- Krasaekoopt W, Bhandari B and Deeth H (2004) "The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria" *International Dairy Journal*, 14 (8): 737-743.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, and Deeth HC (2006) "Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage" *LWT*, 39: 177-183.
- Lacroix C, Paquin C and Arnaud JP (1990) "Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. I. Optimization of the rheological properties of the entrapment" *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32: 403-408.
- Lakkis J (2007) *Encapsulation and Controlled Release: Technologies in Food Systems*, Blackwell Publishing Professional 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA.
- Larisch BC, Poncelet D, Champagne CP and Neufeld RJ, (1994) "Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp" *cremoris*. *Journal of Microencapsulation*, 11: 189-193.
- Laurens HA and Viljoen BC (2001) "Yogurt as probiotic carrier food" *International Dairy Journal*, 11: 1-17.
- Lee JS, Cha DS and Park H J (2004) "Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosancoated calcium alginate microparticles" *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52: 7300-7305.
- Li XY, Chenb XG, Suna ZW, Parkc HJ and Chac DS, (2011) "Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393" *Carbohydrate Polymers*, 83: 1479-1485.
- Lian WC, Hsiao HC and Chou CC (2002) "Survival of *bifidobacteria* after spray-drying" *International Journal of Food Microbiology*, 74 (1-2): 79-86.
- Liu H, Wang L, Yang T, Zhang G, Huang J, Sun J and Huo J (2016) "Optimization and evaluation of fish oil microcapsules" *Particuology*, 29: 162-168.
- Liu J, Ren Y and Yao S, (2010) "Repeated-batch cultivation of encapsulated *Monascus purpureus* by polyelectrolyte complex for natural pigment production" *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18 (6): 1013-1017.

- Liu XD, Yu WY, Zhang Y, Xue WM, Yu, WT, Xiong Y, Ma XJ, Chen Y and Yuan Q, (2002) "Characterization of structure and diffusion behaviour of Calcium alginate beads prepared with external or internal calcium sources" *Journal of Microencapsulation*, 19 (6): 775-782.
- Lopez RA, Sanchez, E, Wilkanowicz, S, Sanz, Y and Lagaron, JM. (2012) "Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids" *Food Hydrocolloids*, 28(1): 159-167.
- Madene A, Jacquot M, Scher J and Desobry S (2006) "Flavour encapsulation and controlled release" *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 1-21.
- Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fonden R and Saarela M (2002) "Technological challenges for future probiotic foods" *International Dairy Journal*, 2: 173-182.
- Mascaraque LGG and Rubio, LA. (2016). "Protein-based emulsion electrosprayed micro- and submicroparticles for the encapsulation and stabilization of thermosensitive hydrophobic bioactives" *Journal of Colloid and Interface Food Science*, 465: 259-270.
- Mascaraque LGG, Masia RP, Barrio RG, Periago MJ and Rubio AL (2017). "Potential of microencapsulation through emulsion-electrospraying to improve the bioaccessibility of β -carotene" *Food Hydrocolloids*, 73: 1-12.
- Mingard KP, Roebuck B, Bennet EG, Gee MG, Nordenstrom H, Sweetmanoch G and Chan P (2009) "Comparison of EBSD and conventional methods of grain size measurement of hardmetals" *International Journal of Refractory & Hard Materials*, 27: 213
- Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR and Sohrabvandi S (2007) "Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms" *Iranian Journal of Biotechnology*, 5 (1): 1-18.
- Ouwehand AC and Salminen SJ (1998) "The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria" *International Dairy Journal*, 8: 749-758.
- Ouwehand AC, Kirjavainenv, PV, Shortt C and Salminen S (1999) "Probiotics: Mechanisms and established effects" *International Dairy Journal*, 9: 43-52.
- Patrignani F, Siroli L, Serrazanetti DI, Braschi G, Betoret E, Reinheimer JA and Lanciotti R (2017) "Microencapsulation of functional strains by high pressure homogenization for a potential use in fermented milk" *Food Research International*, 97: 250-257.
- Paulo F and Santos L (2017) "Design of experiments for microencapsulation applications: A review *Materials Science and Engineering C*, 77: 1327-1340.

- Peniche C, Argüelles-Monal W, Peniche H and Acosta N (2003) “Chitosan: An attractive biocompatible polyme for microencapsulation” *Macromolecular Bioscience*, 3: 511-520.
- Perez MR, Lagaron, J and Rubio, AL (2014) “Development and optimization of novel encapsulation structures of interest in functional foods through electrospraying” *Food and Bioprocess Technology*, 7(11): 3236-3245.
- Picot A and Lacroix C (2003) “Production of multiphase water-insoluble microcapsules for cell microencapsulation using an emulsification/spray-drying technology” *Journal of Food Science*, 68(9): 2693-2700.
- Picot A and Lacroix C (2004) “Encapsulation of *Bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt” *International Dairy Journal*, 14: 505-515.
- Plessas S, Trantallidi M, Bekatorou A, Kanellak, M, Nigam P and Koutinas AA (2007) “Immobilization of kefir and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making” *Food Chemistry*, 105: 187-194.
- Poncelet D (2009) “Microencapsulation Methods and Technologies, COST865 Summer School on Bioencapsulation” Course Notes, Anzere, Switzerland, p. 194.
- Prakash S and Jones ML, (2005) “Artificial cell therapy: new strategies for the therapeutic delivery of live bacteria” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1: 44-56.
- Prevost H, and Divies C (1992) “Cream fermentation by a mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads” *Biotechnology Letters*, 14: 583- 588.
- Prüße U, Dalluhn J, Breford J and Vorlop K (2000) “Production of spherical beads by Jet Cutting” *Chemical Engineering Technology*, 23(12): 1105-1110.
- Rabanel JM, Banquy X, Zouaoui H, Mokhtar M and Hildgen P, (2009) “Progress technology in microencapsulation methods for cell therapy” *Biotechnology Progress*, 25 (4): 946-963.
- Rathar SA, Akhter R, Masoodi FA, Gani A and Wan SM, (2017) “Effect of double alginate microencapsulation onin vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297” *LWT - Food Science and Technology*, 83: 50-58.
- Rathore S, Desai PM, Liew CV, Chan LW and Heng PWS (2013) “Microencapsulation of microbial cells” *Journal of Food Engineering*, 116: 369-381.

- Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ and Veiga F (2006) "Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles" *Journal of Microencapsulation*, 23 (3): 245-257.
- Robitaille, R., Leblond, FA, Bourgeois Y, Henley N, Loignon M and Halle JP (2000) "Studies on small (<350 µm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. V. Determination of carbohydrate and protein permeation through microcapsules by reverse-size exclusion chromatography" *Journal of Biomedical Materials Research*, 50(3): 420 - 427.
- Rolfe RD (2000) "The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health" *Journal of Nutrition*, 130: 396-402.
- Salminen S, vonWright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, deVos WM, Fondén R, Saxelin, M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE and Mattila-Sandholm T (1998) "Demonstration of safety of probiotics-a review" *International Journal of Food Microbiology*, 44: 93-106.
- Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, Levin-Brener L, Gurevich N and Shimoni E (2010) "Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying" *Food Research International*, 43: 193-202.
- Sendra E, Fayos P, Lario Y, Lopez JF, Barbera ES and Alvarez JAP (2008) "Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria" *Food Microbiology*, 25: 13-21.
- Serp D, Cantana E, Heinzen C, Von Stockar U and Marison IW (2000) "Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization" *Biotechnology and Bioengineering*, 70 (1): 41-53.
- Seth D, Mishra HN and Deka SC (2017) "Effect of microencapsulation using extrusion technique on viability of bacterial cells during spray drying of sweetened yoghurt" *International Journal of Biological Macromolecules*, 103: 802-807.
- Shah NP and Ravla RR (2004) "Selling the cells in desserts" *Dairy Industries International*, 69(1): 31-32.
- Sheu TY and Marshall RT (1993) "Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels" *Journal of Food Science*, 54: 557-561.
- Shori AB (2017) "Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit" *HAYATI Journal of Biosciences*, 24: 1-5.
- Silva KCG, Cezarino EC, Michelon M and Sato, ACK (2018) "Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival" *LWT - Food Science and Technology*, 89: 503-509.

- Smidsrod O and Skjak-Braek G (1990) "Alginate as immobilization matrix for cells" Trends in Biotechnology, 8(3): 71-78.
- Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peris P and Kailasapathy K, (2000). "Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastro-intestinal conditions and in yoghurt." International Journal of Food Microbiology, 62: 47-55.
- Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF and Van Sinderen D (2005) "Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites" Current Opinion in Biotechnology, 16: 198-203.
- Tan SM, Heng PWS and Chan LW, (2011) "Development of re-usable yeast-gellan gum micro-bioreactors for potential application in continuous fermentation to produce bio-ethanol" Pharmaceutics, 3 (4): 731-744.
- Uymaz B, (2010) "Probiyotikler ve Kullanım Alanları" Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16 (1): 95-104.
- Yao M, Wu J, Li B, Xiao H, McClements DJ and Li L (2017) "Microencapsulation of *Lactobacillus salivarius* Li01 for enhanced storage viability and targeted delivery to gut microbiota" Food Hydrocolloids, 72: 228-236.
- Yaşlı B (2010) "*Lactobacillus acidophilus* KPb1 ve *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 Probiyotik Kültürlerinin Koazervasyon Yöntemi ile Kaplanması ve Dondurmaya İlavesinin Kültürlerin Canlılık Düzeyleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bolu.
- Ylitérvo P, Franzén CJ and Taherzadeh MJ (2011) "Ethanol production at elevated temperatures using encapsulation of yeast" Journal of Biotechnology, 156 (1): 22-29.
- You HJ, Oh DK and Ji GE, (2004) "Anticancerogenic effect of a novel chiroinositolcontaining polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4." FEMS Microbiology Letters, 240: 131-136.
- Yücecan S (2002) "Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri" Türkiye Diyetisyenler Derneği Bülteni, 2: 1-13.
- Zamora-Vega R, Montañez-Soto JL, Martínez-Flores HE, Flores-Magallón R, Muñoz-Ruiz CV, Venegas-González J and Ariza Ortega TDJ (2012) "Effect of incorporating prebiotics in coating materials for the microencapsulation of *Sacharomyces boulardii*" International Journal of Food Sciences and Nutrition, 63 (8): 930-935.
- Zhao RX, Sun JL, Torley P, Wang DH and Niu SY (2008) "Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure" World Journal of Microbiology & Biotechnology, 24(8): 1349-1354.

Zhou JS, Shu Q, Rutherford KJ, Prasad J, Birtles MJ, Gopal PK and Gill HS (2000) “Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/ c mice” *International Journal of Food Microbiology*, 56: 87-96.

Zhou Y, Martins E, Groboillot A and Neufeld RJ (1998) “Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating” *Journal of Applied Microbiology*, 84(3): 342-348.

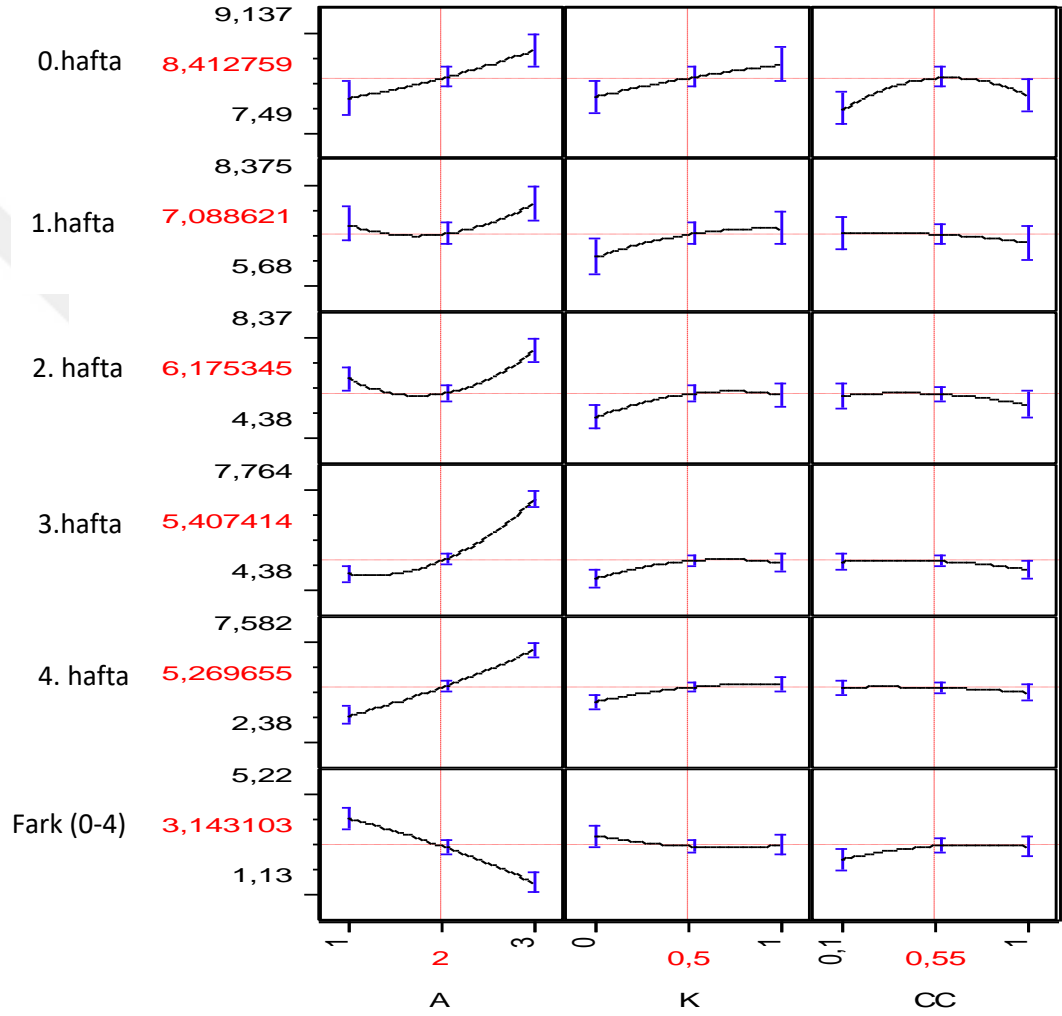




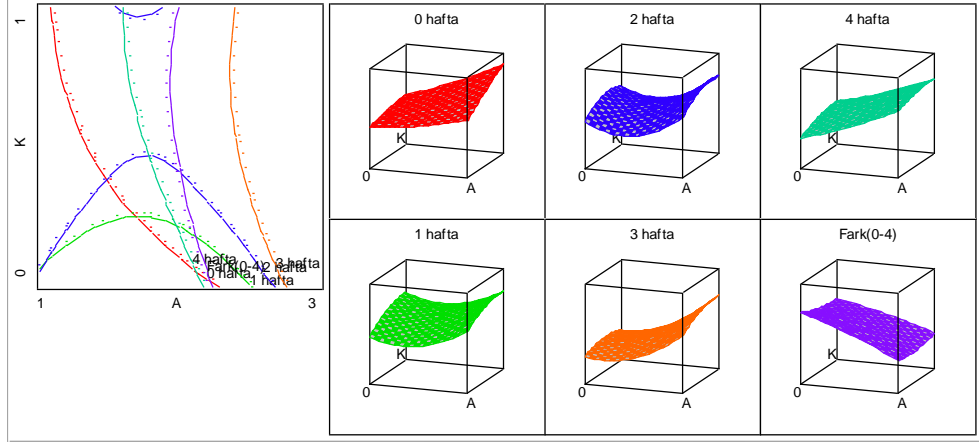
EKLER

7. EKLER

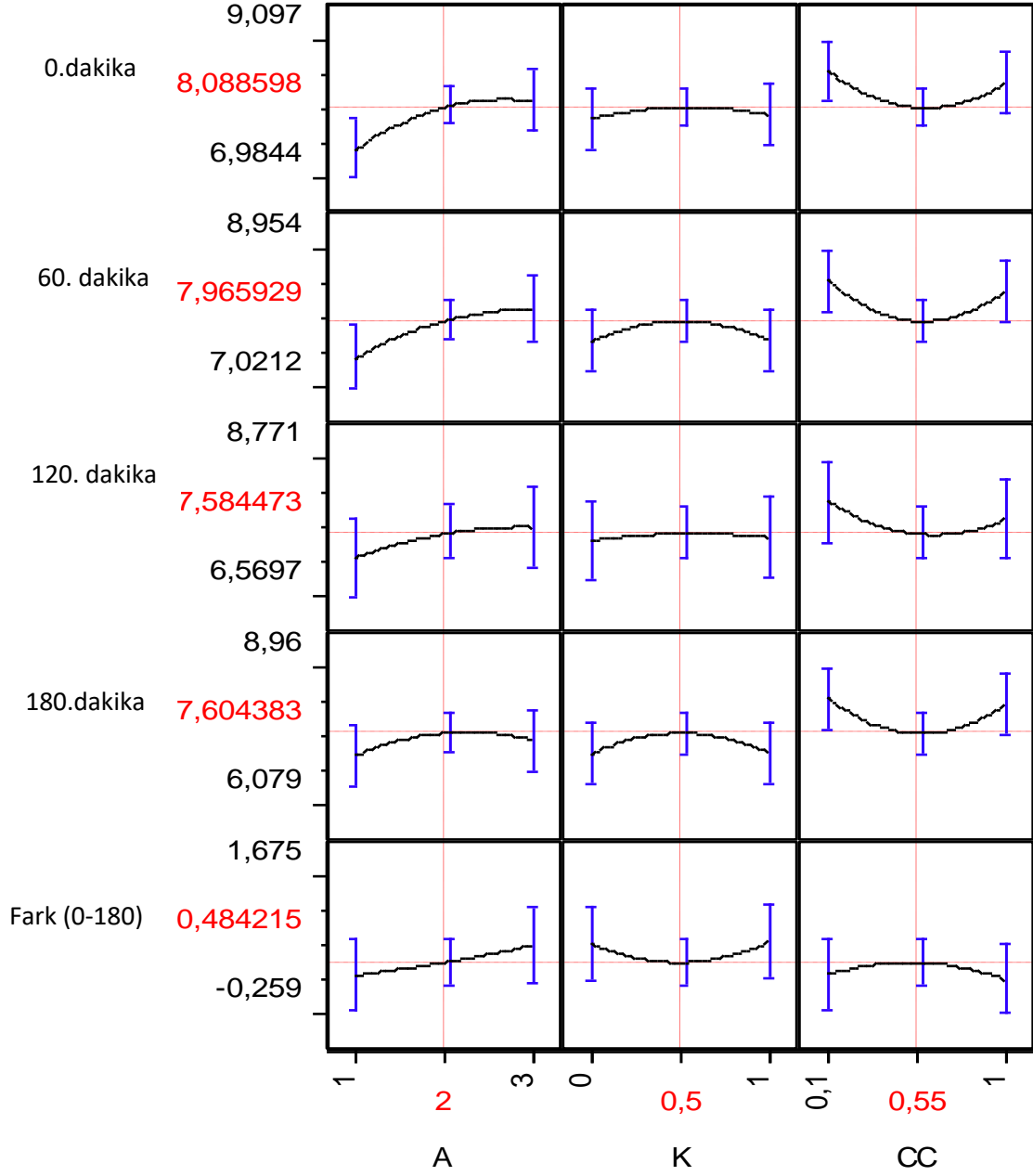
EK A.1 Elektrostatik titreşim tekniği depolama analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi.



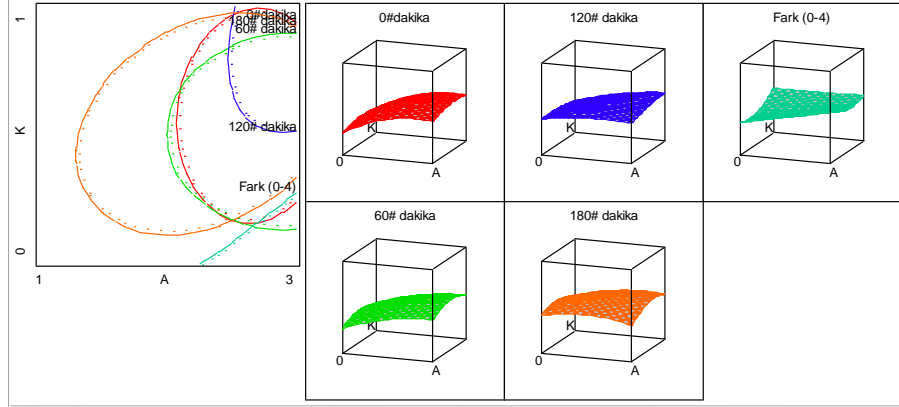
EK A.2 Elektrostatik titreşim tekniğinde kitosan ve aljinatın, bakteri canlılığına, depolama boyunca intereksiyon etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği.



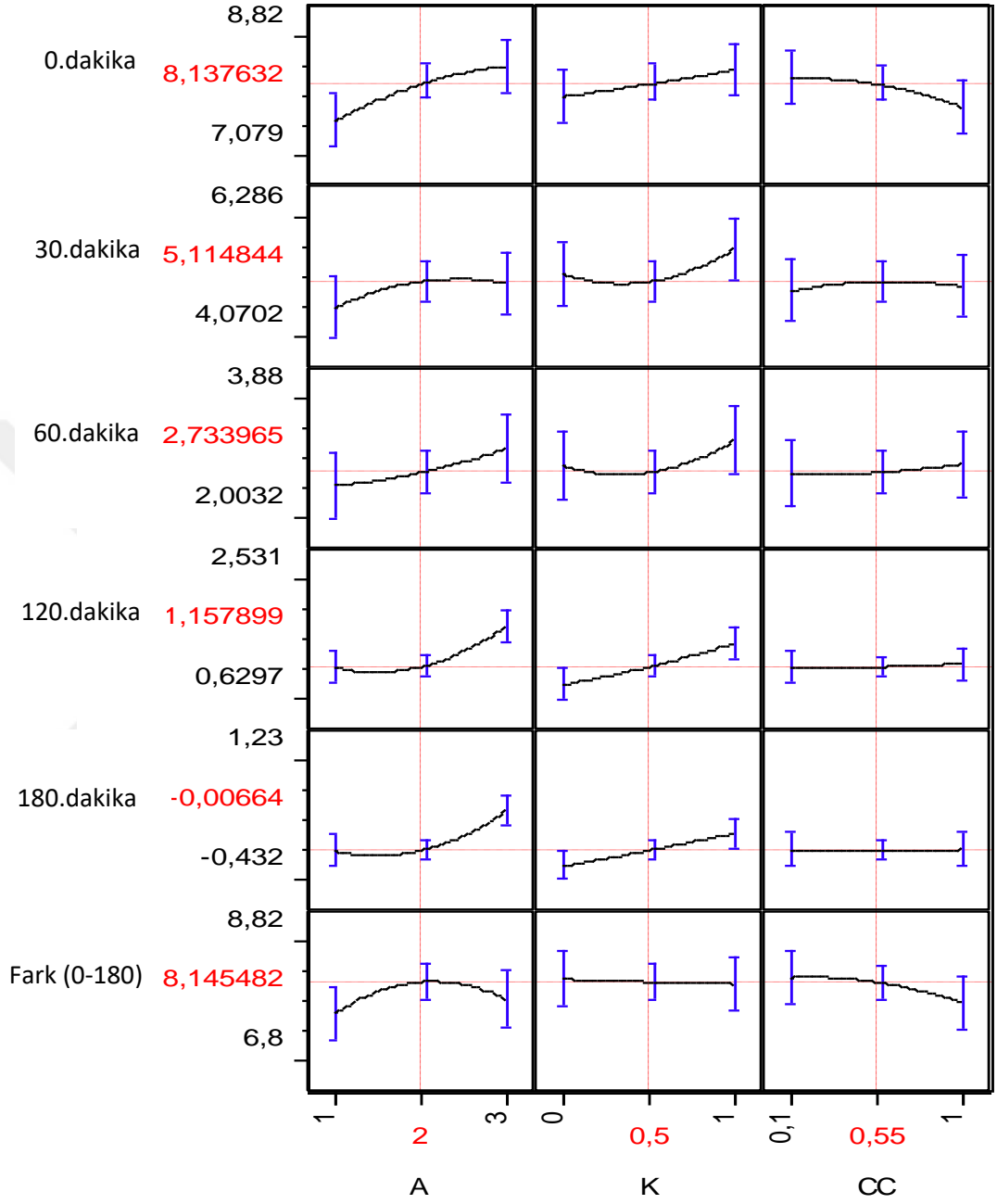
**EK B.1 Elektrostatik titreşim tekniği pH6,8 analizine ait parametreler
üzerine faktörlerin etkisi**



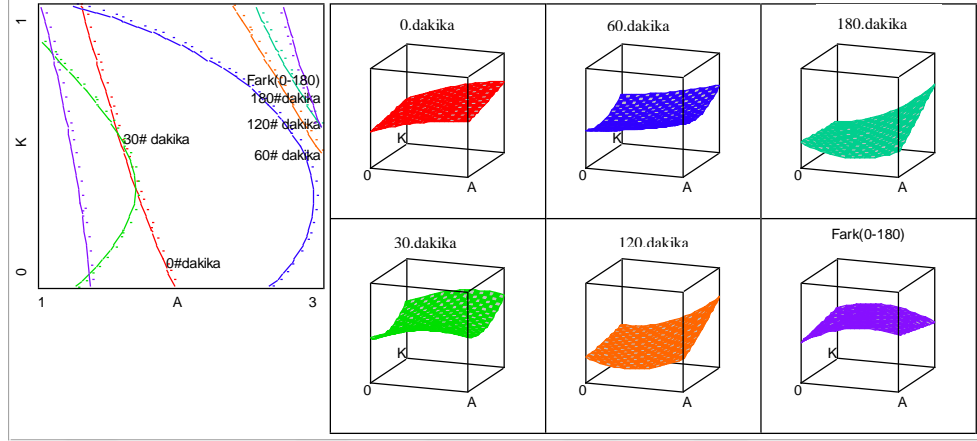
EK B.2 Elektrostatik titreşim tekniğinde kitosan ve aljinat konsantrasyonunun, bakteri canlılığına, pH 6,8'deki etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği.



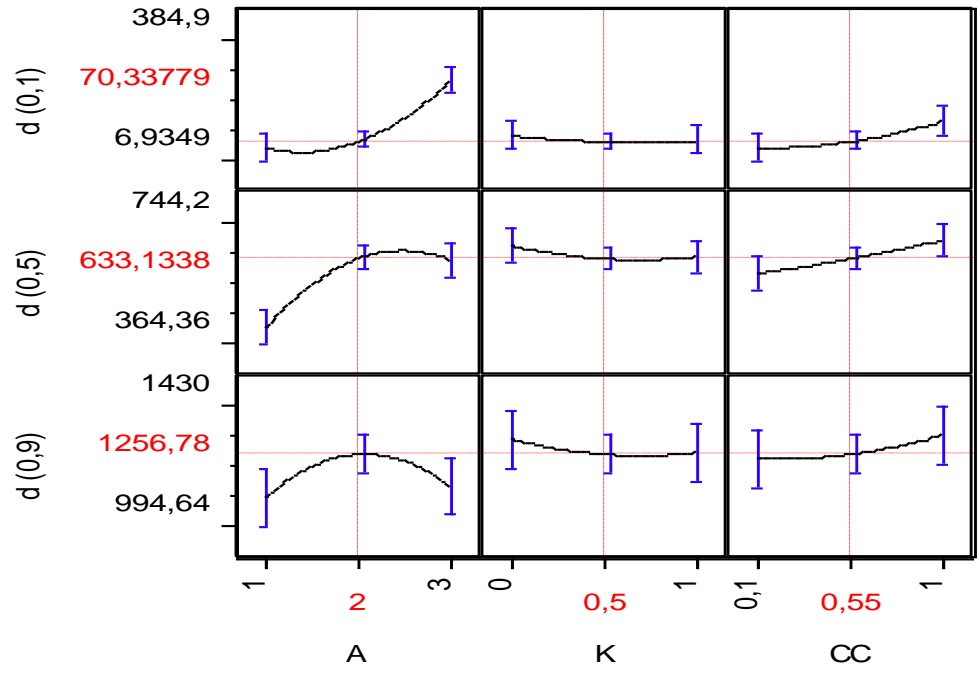
EK C.1 Elektrostatik titreşim tekniği pH 2 analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi



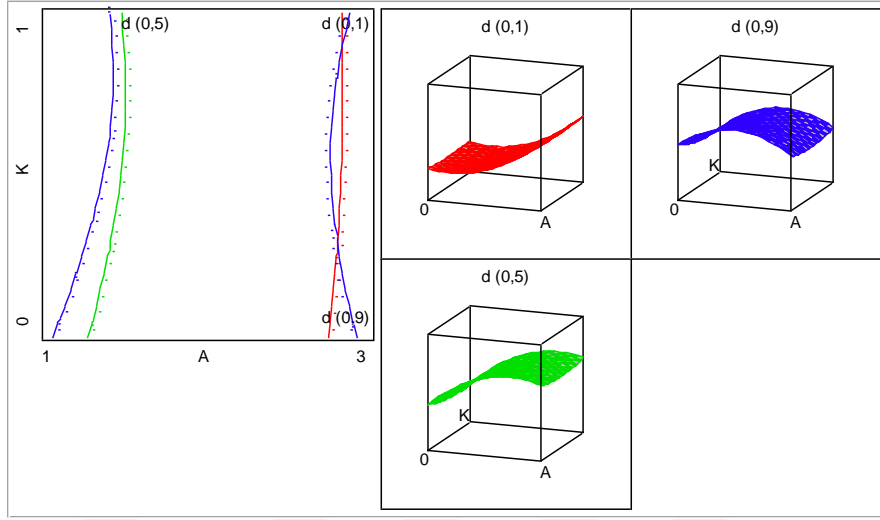
EK C.2 Elektrostatik titreşim tekniğinde kitosan ve aljinat konsantrasyonunun, bakteri canlılığına, pH 2'deki etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği.



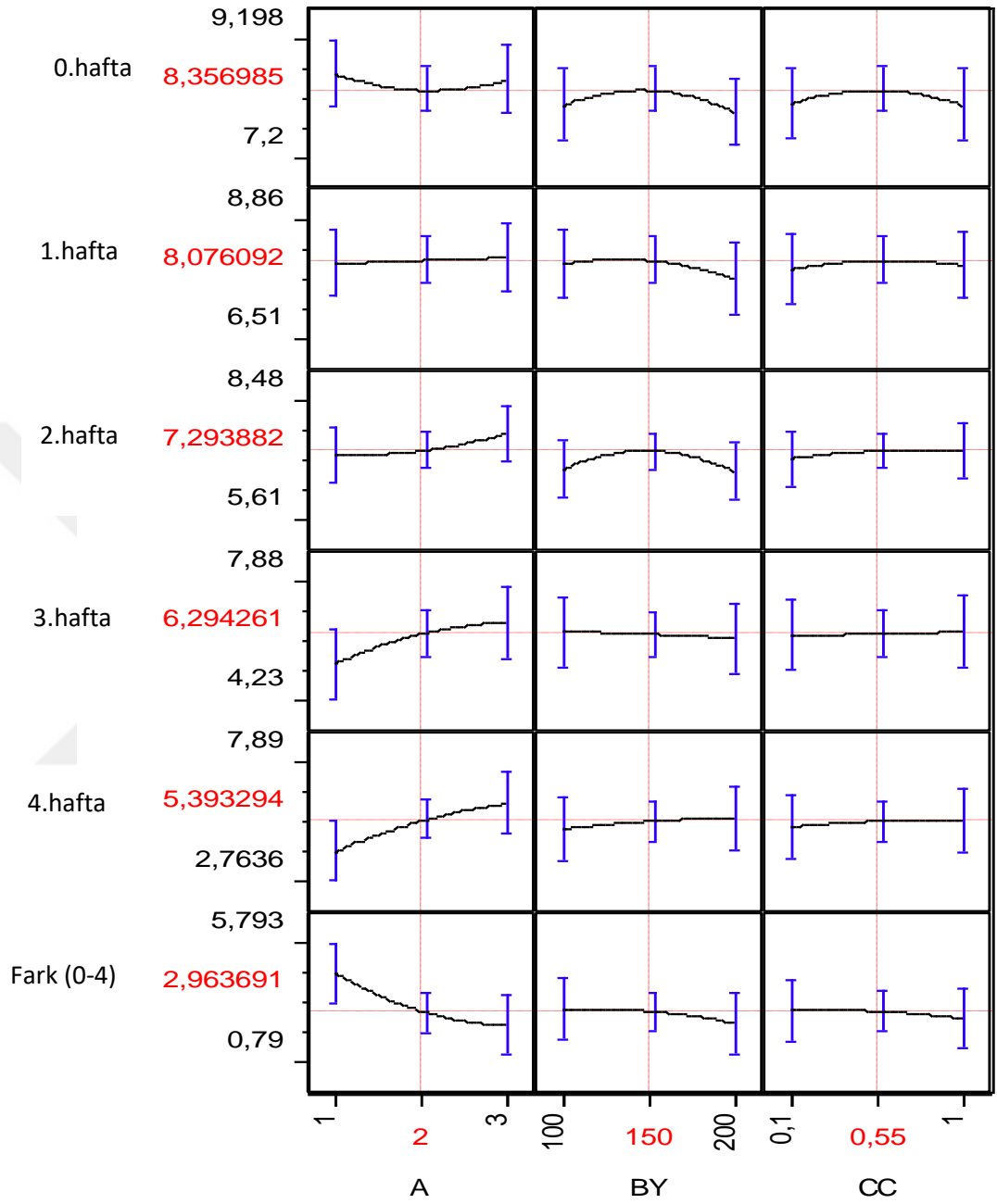
EK D.1 Elektrostatik titreşim tekniği partikül boyut analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi



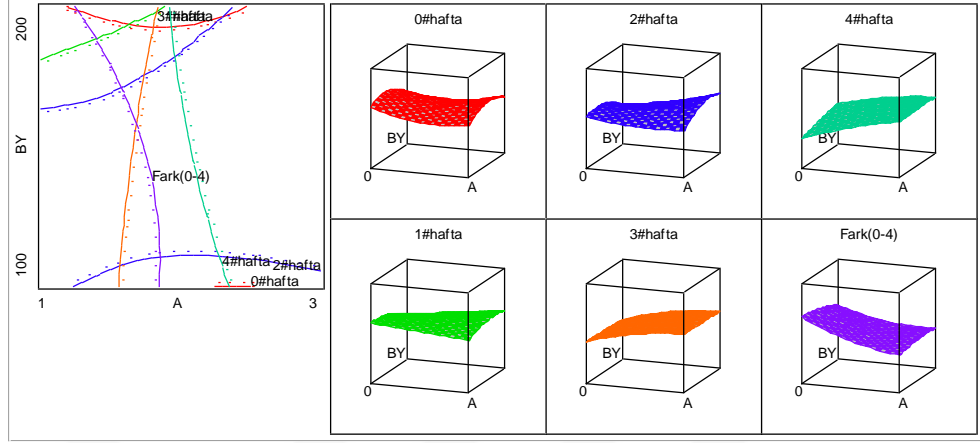
EK D.2 Elektrostatik titreşim tekniğinde kitosan ve aljinat konsantrasyonunun, bakteri boyutuna etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği.



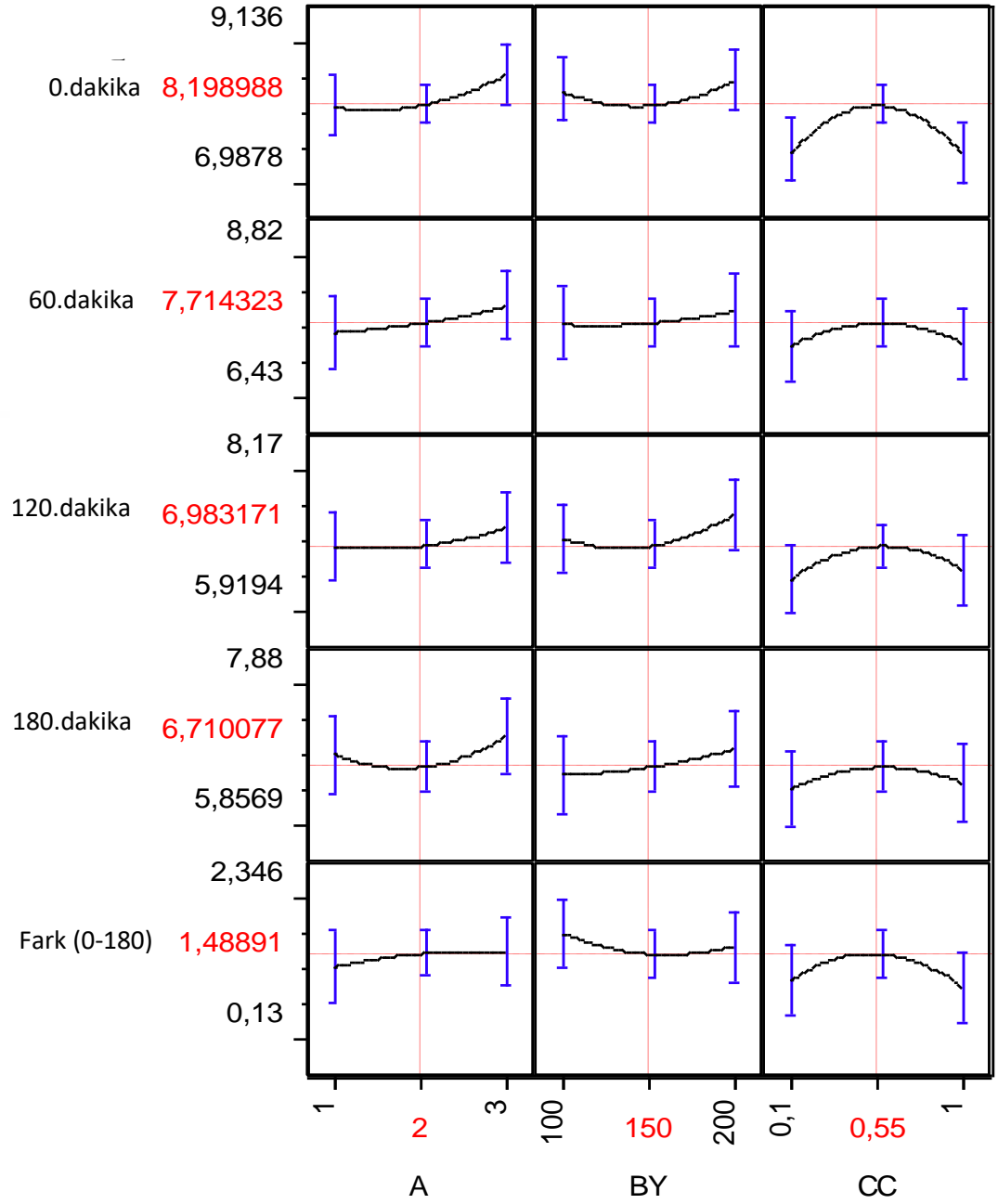
EK E.1 Emülsiyon tekniği, depolama analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi



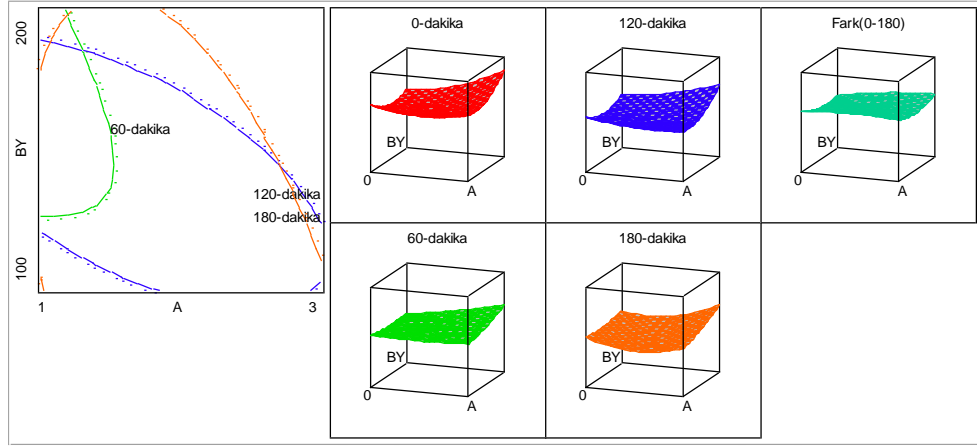
EK E.2 Emülsiyon tekniğinde aljinat ve bitkisel yağın, bakteri canlılığına, depolama boyunca intereksiyon etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği.



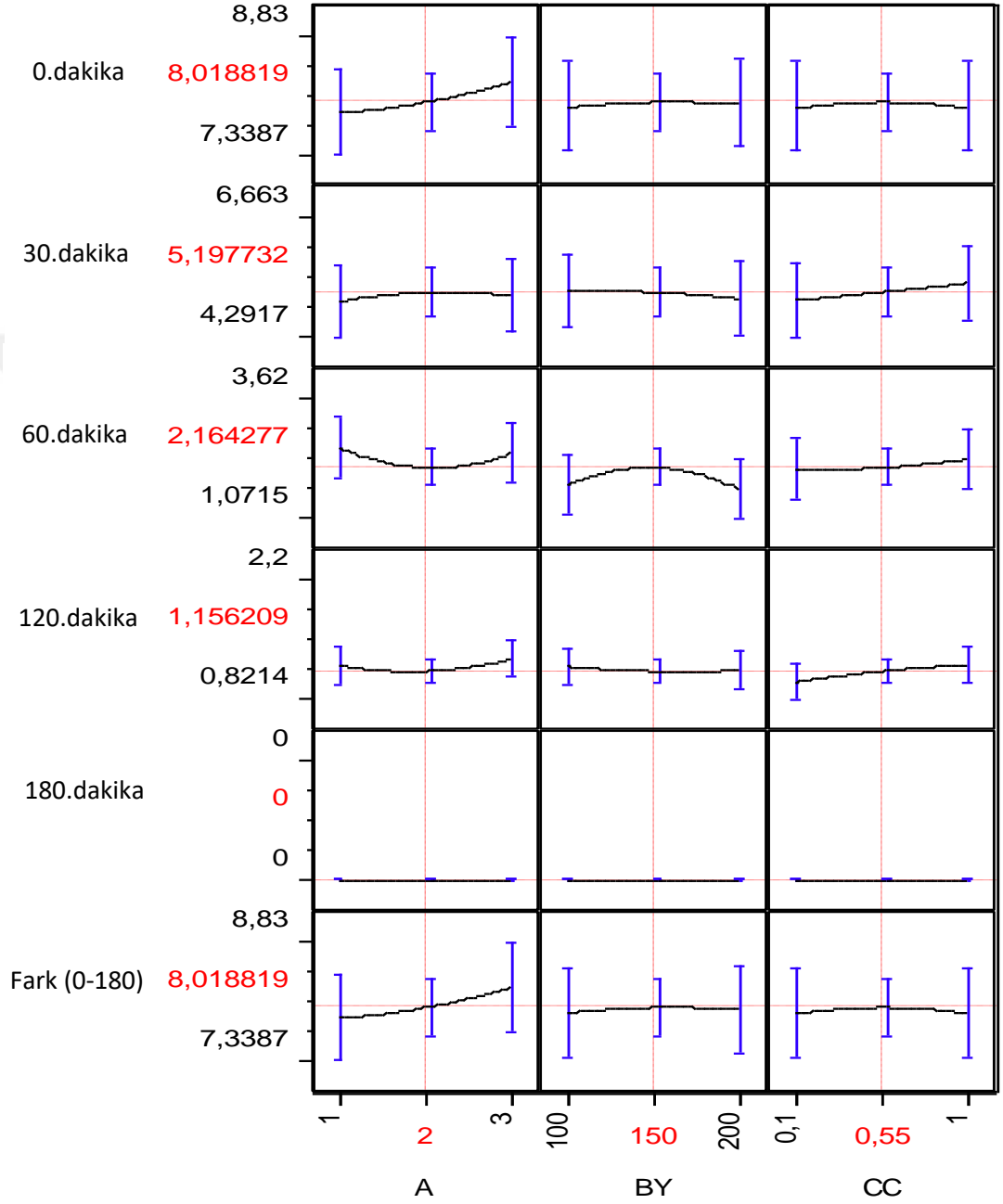
EK F.1 Emülsiyon tekniği, pH 6,8 analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi



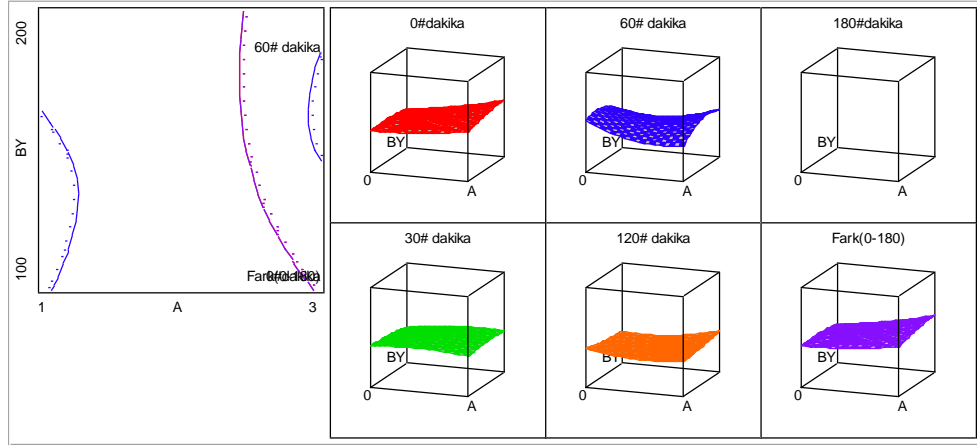
EK F.2 Emülsiyon tekniğinde aljinat ve bitkisel yağın, bakteri canlılığına, pH 6,8’de intereksiyon etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği.



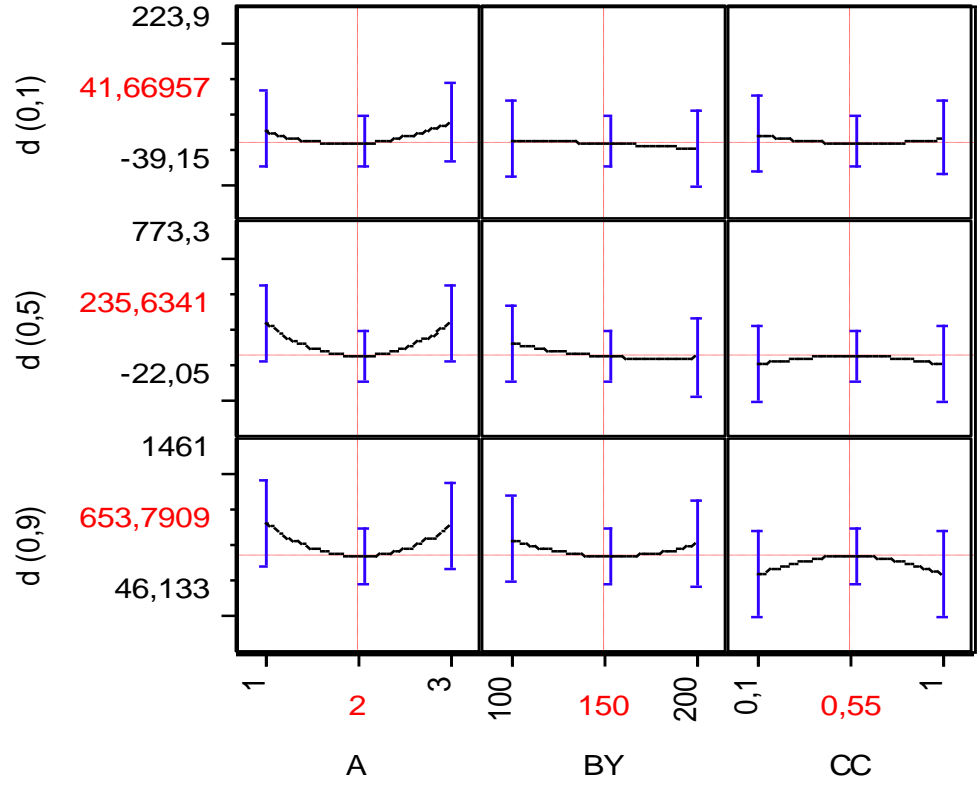
EK G.1 Emülsiyon tekniği pH 2 analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi



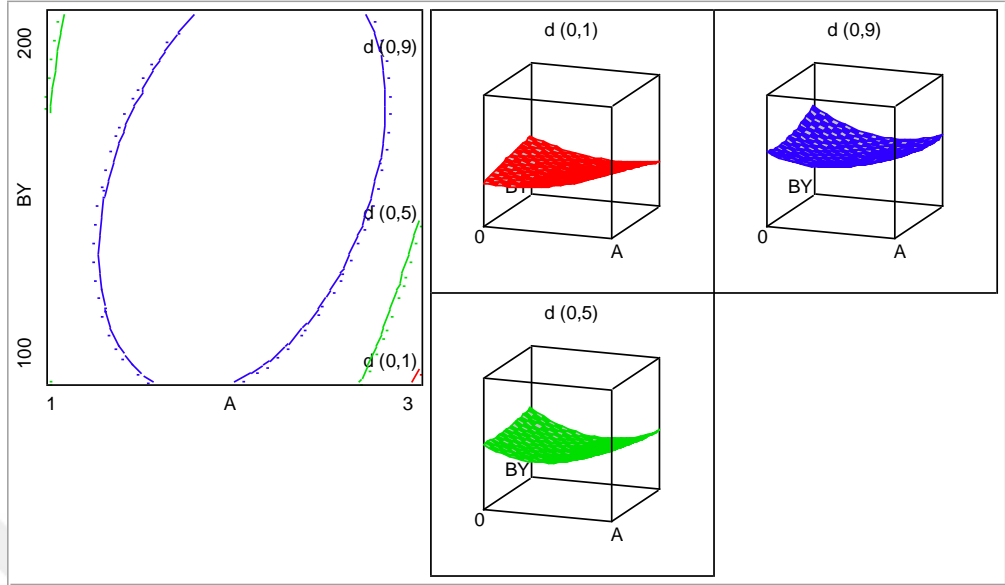
EK G.2 Emülsiyon tekniğinde aljinat ve bitkisel yağın, bakteri canlılığına, pH 2’de intereksiyon etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği.



EK H.1 Emülsiyon tekniği partikül boyut analizine ait parametreler üzerine faktörlerin etkisi



EK H.2 Emülsiyon tekniğinde aljinat ve bitkisel yağın, partikül boyutuna, intereksiyon etkisini gösteren, yanıt yüzey grafiği.



8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : M. Fatih İŞLEYEN

Doğum Yeri ve Tarihi : Erzurum 20.07.1977

Lisans Üniversite : Ankara Üniversitesi

Y. Lisans Üniversite : Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Elektronik posta : isleyen_f@ibu.edu.tr

İletişim Adresi :BAİBÜ Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda
Mühendisliği Bölümü 14030 Gölköy/ Bolu

Yayın Listesi :

Coşkun, H., Bayrak, A., Çakır, İ., Akoğlu, İ.T., Kıralan, M, İşleyen, F. 2008. Bolu ve çevresinde üretilen ve geleneksel bir süt ürünü olan Keş'in yapılışı. Dünya Gıda Dergisi, 13: 42-48.

Çakır, İ., Coşkun, H., Akoğlu, İ.T., İşleyen, M.F., Kıralan, M., Bayrak, A. 2009. Introducing a traditional dairy product Kes: Chemical, microbiological, and sensorial properties and fatty acid composition. Journal of Food, Agriculture and Environment, 7 (3&4): 116-119.

İşleyen M.F., Çakır İ. 2016 “Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of viability in storage conditions and in food” Research Journal of Biotechnology 11 31-37.