İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOASERVASYON YÖNTEMİNİN MODEL MİKROORGANİZMALARDA CANLILIK KORUNUMUNA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zehra GÜLSÜNOĞLU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

AĞUSTOS 2013

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOASERVASYON YÖNTEMİNİN MODEL MİKROORGANİZMALARDA CANLILIK KORUNUMUNA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zehra GÜLSÜNOĞLU
506101527

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necla ARAN

AĞUSTOS 2013

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506101527 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Zehra GÜLSÜNOĞLU**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **"KOASERVASYON YÖNTEMİNİN MODEL MİKROORGANİZMALARDA CANLILIK KORUNUMUNA ETKİSİ"** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı :	**Prof. Dr. Necla ARAN** İstanbul Teknik Üniversitesi	.....
Eş Danışman :	**Doç. Dr. Fatma Neşe KÖK** İstanbul Teknik Üniversitesi	.....
Jüri Üyeleri :	**Prof. Dr. Harun AKSU** İstanbul Üniversitesi	.....
	Prof. Dr. Kamil BOSTAN İstanbul Aydın Üniversitesi	.....
	Yrd. Doç. Dr. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK İstanbul Teknik Üniversitesi	.....

Teslim Tarihi : **19 Ağustos 2013**
Savunma Tarihi : **20 Ağustos 2013**

Ailem'e,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimi ve tez çalışmam boyunca deneyim ve bilgileri ile bana yol gösteren ve her konuda desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Necla Aran'a ve Doç. Dr. Fatma Neşe Kök'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımın başlangıcından bitimine kadar manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Merve Buldur, Araş. Gör. Ayşe Saygun, Okan Mazmanoğlu, Sakip Önder, Balca Karaçor ve Volkan Köseoğlu'na çok teşekkür ederim.

Lactobacillus acidophilus LA5'in temin edilmesinde Peyma-Chr. Hansen Peynir Mayaları A.Ş. (İstanbul) ve *Saccharomyces cerevisiae* CEN PK 113-7D suşunun temin edilmesinde İ.T.Ü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Prof. Dr. Zeynep Petek Çakar'a katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam sırasında ve tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Ağustos 2013

Zehra GÜLSÜNOĞLU
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **vii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **xi**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xiii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xv**
ÖZET ..... **iii**
SUMMARY ..... **v**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Tezin Amacı 1
1.2. Literatür Araştırması 2
1.2.1. *Lactobacillus acidophilus* 3
1.2.2. *Saccharomyces cerevisiae* 3
1.2.3. Gastrointestinal sistemde probiyotik mikroorganizmalar 4
1.2.4. Probiyotik mikroorganizmaların fonksiyonel etkileri 6
1.2.5. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri 6
1.2.6. Enkapsülasyon 7
1.2.6.1. Koaservasyon 10
1.2.7. Kaplama materyalleri 12
1.2.7.1. Jelatin 13
1.2.7.2. Pektin 14
1.2.8. Çapraz bağlayıcılar 15
1.2.8.1. Gluteraldehit 15
1.2.8.2. Genipin 16
1.2.9. Liyofilizasyon 17
2. MATERYAL METOD **19**
2.1. Materyal 19
2.2. Kültür Canlandırma 19
2.3. Mikroorganizma Sayımı 19
2.4. Mikrokapsül Hazırlanması 20
2.4.1. Katı miktarının etkisi 21
2.4.2. Jelatin:pektin oranının etkisi 21
2.5. Koaservat Veriminin Belirlenmesi 21
2.6. Genipin ile Çapraz Bağlanma Derecesi 21
2.7. Enkapsülasyon İşleminin Canlılık Üzerine Etkisinin Belirlenmesi 21
2.8. Liyofilizasyon İşleminin *L. acidophilus* LA5'in Canlılığı Üzerine Etkisi 22
2.9. Enkapsüle *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nin Simüle Edilmiş Mide Özsuyunda Canlılık Korunumunun İncelenmesi 22
2.10. Enkapsüle *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nin Simüle Edilmiş Bağırsak Sıvısında Canlılık Korunumunun İncelenmesi 22
2.11. Mikrokapsül Boyutunun Belirlenmesi 23
2.12. Islanabilirlik 23

2.13. İstatistiksel Analiz 23
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 25
3.1. Kapsül Veriminin Belirlenmesi 25
3.2. Genipin ile Çapraz Bağlanma Derecesi 28
3.3. Genipin Varlığının Kapsül Boyutuna Etkisi 30
3.4. *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D İçeren Mikrokapsüllerin Boyutları 31
3.5. Enkapsülasyon İşleminin *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D 'nın Canlılık Korunumuna Etkisinin İncelenmesi 32
3.6. Liyofilizasyon İşleminin Enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in Canlılık Korunumuna Etkisi 33
3.7. Enkapsüle *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nın Simüle Edilmiş Mide Özsuyunda Canlılık Korunumunun İncelenmesi 34
3.8. Enkapsüle *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nın Simüle Edilmiş Bağırsak Sıvısında Canlılık Korunumunun İncelenmesi 36
4. SONUÇ VE ÖNERİLER 39
KAYNAKLAR 41
EKLER 49
ÖZGEÇMİŞ 53

KISALTMALAR

MRS Broth : De Man, Rogosa and Sharpe Broth
YPD Broth : Yeast Peptone Dextrose Broth
J:p : Jelatin:pektin oranı
HCl : Hidroklorik asit
NaOH : Sodyum hidroksit
NaCl : Sodyum klorür
KCl : Potasyum klorür
$CaCl_2$: Kalsiyum klorür
$NaHCO_3$: Sodyum bikarbonat
KH_2PO_4 : Potasyum di-hidrojen fosfat
SGF : "Simulated gastric fluid"
SIF : "Simulated intestinal fluid"

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: Probiyotik özellikteki mikroorganizmalar……..……..3
Çizelge 1.2: Gastrointestinal sistemdeki farklı pH aralıkları……...5
Çizelge 1.3: Probiyotik enkapsülasyonunun gıda endüstrisinde sağladığı yararlar….8
Çizelge 3.1: Kapsül veriminin kaplama materyali miktar ve oranları ile değişimi....25
Çizelge 3.2: Koaservasyon işlemi boyunca *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nın canlı kalma oranı.....32
Çizelge 3.3: Liyofilizasyon işleminin *L. acidophilus* LA5'in canlılığına etkisi.....33
Çizelge 3.4: SGF içinde serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in canlılık korunumu.....34
Çizelge 3.5: SGF içinde serbest ve enkapsüle *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nin canlılık korunumu.....35
Çizelge 3.6: SIF içinde serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in canlılık korunumu……...36
Çizelge 3.7: SIF içinde serbest ve enkapsüle *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nın canlılık korunumu……..37

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Farklı tipteki mikrokapsüllerin morfolojisi…….....9
Şekil 1.2: Jelatin/gam arabik kompleks koaservasyon yöntem basamakları……..…11
Şekil 1.3: Pektinin kimyasal yapısı……..…..14
Şekil 1.4: Gluteraldehitin kimyasal yapısı.....15
Şekil 1.5: Genipinin kimyasal yapısı.....16
Şekil 2.1: Jelatin-pektin kompleks koaservasyon yöntem basamakları.....20
Şekil 3.1: %2 w/v, 1:1(j:p); %1 w/v, 1:2(j:p); %2 w/v 2:1(j:p) oranında kaplama malzemesi içeren kapsüllerin optik mikroskoptaki görüntüsü.....26
Şekil 3.2: Kaplama materyali miktar ve oranları ile kapsül çaplarında meydana gelen değişim.....27
Şekil 3.3: Kapsül çapı ve koaservat veriminin toplam katı miktarı ile değişimi.....27
Şekil 3.4: %2 w/v, 1:2 (j:p)'lik boş mikroküreler.....28
Şekil 3.5: 30 mM genipin ile farklı sürelerde çapraz bağlanan mikrokapsüller.....29
Şekil 3.6: Genipin ile çapraz bağlanan kapsüllerin boyut dağılımı.....30
Şekil 3.7: Genipinsiz ve 20 mM genipin ile muamele edilen kapsüllerin liyofilizasyon sonrası sulu ortamda optik mikroskoptaki görüntüsü 31
Şekil 3.8: (a) *L.acidophilus* LA5 ve (b) *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D içeren mikrokapsüllerin optik mikroskoptaki görüntüsü.....32
Şekil 3.9: SGF'nin serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in canlılığına etkisi....34
Şekil 3.10: SGF'nin serbest ve enkapsüle *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nin canlılığına etkisi ……..…….35
Şekil 3.11: SIF'ın serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in canlılığına etkisi….37
Şekil 3.12: SIF'ın serbest ve enkapsüle *S. cerevisiae*'nın canlılığına etkisi……..37

KOASERVASYON YÖNTEMİNİN MODEL MİKROORGANİZMALARDA CANLILIK KORUNUMUNA ETKİSİ

ÖZET

Mikroenkapsülasyon tekniği, gıda sektöründe genellikle, sıvı damlacıkların, katı partiküllerin veya gaz bileşenlerinin, katı-sıvı gıda saflığında kaplama materyalleri ile kaplanması için ürünlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirmek ve raf ömürlerini artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon yönteminden, birçok biyoaktif malzemenin korunmasında ve biyoyararlılığının artırılması amacıyla da yararlanılmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar mikroenkapsülasyon yönteminin, çeşitli mikroorganizmaların teknolojik özelliklerinin korunumunda da etkili bir yöntem olabileceğini göstermektedir.

Çalışma kapsamında bir mikroenkapsülasyon tekniği olan ve mikroorganizmaların enkapsülasyonunda az denenmiş bir yöntem olan kompleks koaservasyon tekniğinin kullanım olanakları araştırılmıştır. Duvar materyali olarak jelatin-pektin protein-polisakkarit kompleksi, çekirdek materyali olarak ise *Lactobacillus acidophilus* LA5 ve *Saccharomyces cerevisiae* CEN PK 113-7D seçilmiştir. *L. acidophilus* probiyotik bir mikroorganizma olarak *S. cerevisiae* ise fermentasyon proseslerinde yaygın kullanılan bir mikroorganizma olarak önem taşımaktadır. Ayrıca doğal bir çapraz bağlayıcı olan genipin ile çapraz bağlanan kapsüllerin şişme aktivitesi ile kullanılan duvar materyali miktarı ve oranlarının kapsül oluşumuna ve koaservat verimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. En verimli koşullarda oluşturulan kapsüller ile kaplanan *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D simüle edilmiş mide özsuyu ve bağırsak sıvısında dayanım süreleri ve liyofilizasyonun bu mikroorganizmaların canlılığı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Duvar malzemesi miktarı ve oranlarını belirlemek amacıyla %1-2-4 katı miktarında (1:1); (1:2); (2:1) (jelatin:pektin) (j:p) oranları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; %2'lik 1:2 (j:p) oranında en iyi kapsül oluşumu görülmüş ve koaservat verimi yaklaşık %26 olarak hesaplanmıştır. Ortalama kapsül çapı, çekirdek materyali içermeyenlerde 22,86 µm iken *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D içeren kapsüllerde sırasıyla, 29,24 ve 38,9 µm olarak ölçülmüştür.

Simüle edilmiş mide özsuyunda *L. acidophilus* LA5 serbest ve enkapsüle olanlarda 120 dakika sonunda sırasıyla 3,02 ve 1,93 log birim azalma görülürken, *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D serbest ve enkapsüle olanlarda sırasıyla 1,23 ve 1,17 log birim azalma görülmüştür. Simüle edilmiş bağırsak sıvısında *L. acidophilus* LA5 serbest ve enkapsüle olanlarda 4 saat sonunda sırasıyla 2,06 ve 2,24 log birim azalma görülürken, *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D serbest ve enkapsüle olanlarda sırasıyla 1,08 ve 0,95 log birim azalma görülmüştür.

Liyofilizasyon uygulamasında krayoprotektan olarak %10'luk yağsız süt tozu kullanılmıştır. Liyofilize *L. acidophilus* LA5'in enkapsüle ve serbest halde canlılıklarında sırasıyla 2,16 ve 3,67 log birimlik bir azalma görülmüştür.

Genipin ile çapraz bağlanan kapsüllerde, çapraz bağlanmanın bir sonucu olarak oluşan mavi renk değişimi görsel olarak izlenmiştir. Aynı genipin konsantrasyonunda (30 mM) muamele süresi arttıkça (0-90 saat) oluşan mavi rengin yoğunluğunda da artış gözlenmiştir.

Kapsüllerin liyofilizasyon sonrası sulu ortamda su alarak şişmesi, genipin konsantrasyonunun artması ile azalmış ve kapsül boyutları artan genipin konsantrasyonu ile birlikte daha dar bir aralıkta değişim göstermiştir.

THE EFFECT OF COACERVATION TECHNIQUE ON THE VIABILITY OF MODEL MICROORGANISMS

SUMMARY

Microencapsulation technique in food industry, generally, is used to improve the functional properties and to increase the shelf life of foods by capsulating the liquid droplets, solid particles and gas components with food grade coating materials. Microencapsulation method utilized to increase the bioavailability and protecting of many bioactive material in the food industry. Research in recent years, microencapsulation method is an effective method to protect of microorganisms.

In this study, the probability of coacervation method, which is an encapsulation method not commonly used for the encapsulation of microorganisms, was investigated to increase the stability of microorganisms. *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Saccharomyces cerevisiae* CEN PK 113-7D were chosen as the experimental strains. *L. acidophilus* as a probiotic microorganism and *S. cerevisiae* as a fermentation agent are the most commonly used microorganisms in food industry.

Probiotic microorganisms are defined as live microorganisms which may confer health benefits for the host. In recent years, the commercial interest on functional foods containing live microorganisms has been increasing with relevant studies carried out on functionally proporties of probiotics in the digestive tract. *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* are two major groups of probiotic bacteria, accepted scientifically for conferring benefical effects to human gut health.

One of the most important factor limiting the use of probiotic microorganisms in food processing is the stability of microorganisms. The level of probiotic microorganisms should be $\geq 10^6$-10^7 cfu/g-ml to show the expected health effects, and keep their viability in gastrointestinal system. In addition, the microorganism have to tolerate stress factors such as high temperature, drying, freezing and low pH during food processing and storage. It was reported that one of the new methods is microencapsulation technique to enhance the survival of microorganisms used in production of probiotic food. Probiotic microorganisms are marketed in the form of tablet, powdered form or in a food matrix.

Probiotic microorganisms are natural inhabitants of the human gastrointestinal tract but they are destructed under some conditions such as use of antibiotic compounds, some certain diseases. Therefore, it is important to restore their balance in the gut, by supplying from dietary supplements or functional foods containing live probiotic cultures. Following ingestion with a food or dietary supplement the microorganisms are exposed to very harsh acidic environmental conditions in the stomach where the pH is 2.0 and thereafter bile salts present in the intestinal pathway. During food manufacturing process used, the probiotic microorganisms are also subjected to various kinds of stresses such as, heat, cold, osmotic pressure and oxygen.

The coacervation process has been described as a three step method; phase separation, deposition and solidification. The solidification of coating material,

generally by a cross-linking reaction using chemical, thermal or enzymatic methods. The formed microparticles are then collected by separating funnel.

Microcapsules were formed by using coacervation methods described in literature. Pectin and gelatin used as the wall material solution were sterilized at 121°C for 15 minutes, then pH of the solutions were adjusted to 8.0±0.1 using 1 M NaOH at room temperature. Then 5 ml of microorganism solution and the gelatin solution were stirred for 5 minutes, at the end of the period pectin solution was added. pH of the mixture was reduced to 3.50±0.01 using 1M HCl at 500 rpm. The solution was stirred for 30 minutes at the same speed for the completion of coacervate formation. Then reaction was ended by addition of 100 mL distilled water. To reach the point where the system is stable the mixture was stirred at 250 rpm for 1.5 hours. To harden the coacervate, temperature of the mixture was reduced to 5°C in an ice bath. The procedure was completed, by separating the coacervate using separatory funnel.

Protein-polysaccharide complex consisted of gelatin and pectin were used as wall material. The effect of wall material amount and ratio on coacervate formation, coacervate yield and the effect of used genipin as crosslinker agent on swelling of capsules, were investigated. Microencapsulated cells of *L. acidophilus* LA5 and *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D capsules formed under optimal conditions were investigated for the stability of passing through gastrointestinal tract and the effect of freeze-drier conditions.

The choice of ingredients for the protective matrix is an important factor in increasing the stability of the probiotic microorganisms. A variety of food materials including carbohydrates, polysaccharides, plant and milk proteins and cellulose have been used in the encapsulation matrix by researchers. After the microencapsulation process, it is important to convert the microparticles into a dried form, to ensure prolonged storage and future use in functional food or neutraceutical applications.

In this study, to determine the wall material composition gelatin and pectin were used in the ratios of 1, 2 and 4% solids and (1:1); (1:2); (2:1) wall material. According to the results obtained, 2% solids and (1:2) wall material ratio were found to be the best coacervate formation and coacervate yield was calculated approximately 26%. The mean diameters of microcapsules were 22.86 μm for empty microcapsules, 29.24 and 38.90 μm for the microcapsules including *L. acidophilus* LA5 and *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D, respectively.

The results indicated that, the free and encapsulated *L. acidophilus* LA5 registered 2.06 and 2.24 log cycle reduction, respectively, and the log cycle reduction was 1.08 and 0.95, respectively, in free and encapsulated S. cerevisiae CEN PK 113-7D after 4-h incubation at simulated intestinal fluid. The free and encapsulated *L. acidophilus* LA5 registered 3.02 and 1.93 log cycle reduction, respectively, and the log cycle reduction was 1.23 and 1.17, respectively, in free and encapsulated S. cerevisiae CEN PK 113-7D after 120 minutes incubation at simulated gastric fluid.

Microcapsules of *L. acidophilus* LA5 were freze dried to obtain better shelf stability and easy handling properties. Skim milk (10%) was chosen as cryoprotecting agents. The log cycle reduction was 2.16 and 3.67, respectively, in capsulated and free *L. acidophilus* LA5 after freze-drying.

In this study, genipin, a natural and non-toxic crosslinking reagent, was used to cross-link gelatin. It was observed that, the genipin cross-linked gelatin-pectin microcapsules turned dark-bluish color. The color was darkened with the increase of

genipin concentration or cross-linking time. Bluish color attributed to double bonds in the genipin cross-linking molecules. Under the same genipin concentration (30 mM), the cross-linking degree increased with increasing cross-linking time (0-90 h).

After freeze-drying, under the same cross-linking time (24-h), the swelling decreased and varied narrower range of capsules size, with increasing genipin concentration.

1. GİRİŞ

Gıda sektöründe enkapsülasyon uygulaması, her geçen gün daha fazla kullanılmaya ve talep edilmeye başlanmıştır. Bunun başlıca nedenleri arasında içerdiği maddelerin kararlılığının artırılması gereken hazır gıdaların yaygınlaşması, fonksiyonel ve doğal gıda pazarının büyümesi, markaların kendilerine özgü ürün çıkarma istekleri, enkapsülasyonun aynı etkiyi vermek için gerekli aktif madde miktarını azaltması (özellikle pahalı, doğal içeriklerin kullanımında) sayılabilir (Browlie, 2007).

Günümüzde fonksiyonel gıdalara olan talepteki artış nedeniyle yeni ürün üretilmesi ve mevcut ürünlerin özelliklerinin geliştirilmesi konularındaki araştırmalar ve endüstriyel rekabet büyük önem kazanmıştır. Bu kapsamda probiyotik mikroorganizmalar içeren gıdalar önemli bir yer tutmaktadır. Ancak bu mikroorganizmaların beklenen faydalı etkiyi sağlayabilmeleri için, belli bir sayının üzerinde vücuda alınmaları gerekmektedir. Probiyotik gıda üretiminin en önemli hususlardan birisi kullanılan mikroorganizmaların ürünün raf ömrü süresince canlılıklarının korunumunun sağlanabilmesidir. Probiyotik mikroorganizmaların sayılarında gerek işleme, gerekse depolama ve satış aşamalarında azalmalar ortaya çıkabilmektedir. Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda mikroenkapsülasyon yönteminin probiyotik mikroorganizmaların teknolojik özelliklerinin arttırılmasında etkili bir yöntem olabileceğini göstermektedir. Bu yöntem ile probiyotiklerin vücutta mide asitliği, safra tuzları ile çeşitli enzimlere karşı dirençli olmaları ve içinde bulundukları gıdaların üretimi ve raf ömrü süresince canlılıklarını daha iyi koruyabilmeleri sağlanabilmektedir.

1.1. Tezin Amacı

Bu tez çalışması kapsamında model mikroorganizma olarak, *Lactobacillus acidophilus* LA5 ve *Saccharomyces cerevisiae* CEN PK 113-7D gibi gıda endüstri açısından önemli iki mikroorganizmanın canlılık korunumu üzerinde koaservasyon ile mikroenkapsülasyon uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda mikroorganizmalar, kompleks koaservasyon yöntemi ile enkapsüle edilerek, simüle

edilmiş mide özsuyu ve bağırsak sıvısında canlılık korunumlarına bakılmış ve oluşturulan kapsüllerin stabilitesi araştırılmıştır. Liyofilizasyon ile kurutmanın bu mikroorganizmaların canlılık korunumuna etkileri incelenmiştir. Ayrıca, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan genipinin, kapsüllerin çapraz bağlama etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.2. Literatür Araştırması

Beslenme ile sağlıklı yaşam arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda bağırsak mikroflorasının önemi her geçen gün daha fazla vurgulanmaktadır. Bu kapsamda bağırsaklardaki bakteriyel flora büyük önem taşımaktadır. Bakteriyel flora içinde çok önemli rol oynayan probiyotik bakterilerin bağırsak florasına ve sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle bu bakterileri içeren ürünlerin üretimi ve tüketimi Dünya genelinde artış göstermiştir (Hattingh ve Viljoen 2001; Katz, 2001; Simmering ve Blaut, 2001). Probiyotik bakterilerin en yaygın kullanıldığı ürün grubu süt ve süt ürünleridir.

Probiyotik sözcüğü, eski Yunanca'da "yaşam için" anlamına gelmektedir. Probiyotik kültürler, doğal bağırsak mikroflorasını olumlu yönde değiştirerek insan ve hayvan sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan canlı mikroorganizmalardır. *Lactobacillus spp*. içeren fermente süt ürünlerini tüketen bireylerin yaşam sürelerinin uzadığına yönelik teori sayesinde probiyotik mikroorganizmalar bilim dünyasının ilgi odağı haline gelmişlerdir (Özer, 2011; Mokarram ve diğ., 2009).

Probiyotik olarak en yaygın kullanılan mikroorganizmalar bazı *Bifidobacterium*, sıklıkla bifidus olarak adlandırılır ve *Lactobacillus* cinsi bakterilerdir, özellikle *L. acidophilus* (Saarela ve diğ., 2000; Sağdıç ve *diğ.,* 2004). Çizelge 1.1'de yaygın olarak kullanılan bazı probiyotik mikroorganizmalar verilmiştir. Son yıllarda bazı maya türlerinin de probiyotik özellik gösterdiği ve bu maya türlerinin sindirim sisteminde çok yararlı etkileri olduğu vurgulanmaktadır (Chen ve diğ., 2010; Burgain ve diğ., 2011).

Çizelge 1.1: Probiyotik özellikteki mikroorganizmalar (Rokka ve Rantamäki, 2010).

Lactobacillus türleri	Bifidobacterium türleri	Diğerleri
L. acidophilus	*B. adolescentis*	*Saccharomyces cerevisiae*
L. bulgaricus	*B. lactis*	*S. boulardii*
L. casei	*B. bifidum*	*Streptococcus thermophilus*
L. paracasei	*B. infantis*	*Lactococcus lactis*
L. rhamnosus	*B. longum*	
L. gasseri	*B. breve*	
L. reuteri	*B. animals*	

1.2.1. Lactobacillus acidophilus

Lactobacillus acidophilus, dünya çapında probiyotik olarak fermente süt ürünleri üretiminde kullanılan termofilik özellikte bir laktik asit bakterisidir. 5'den daha düşük pH değerlerinde ve optimum 37°C civarındaki sıcaklıklarda gelişme göstermektedir (Murga ve diğ., 2000).

L. acidophilus suşları, düşük pH, yüksek oksidasyon-redüksiyon potansiyeline, düşük yüzey gerilimine ve sindirim enzimlerine karşı diğer probiyotik mikroorganizmalara kıyasla daha dirençli olduklarından dolayı fermente süt ürünlerinde tercih edilmektedirler (Lee, 2009; Kundakçı ve Ergönül, 2006).

L. acidophilus insan bağırsak mikroflorasında doğal olarak bulunmaktadır. Fakültatif anaerobik özellikte olan bu mikroorganizmalar, koloni oluşturdukları bağırsak epitel dokusunda tutunarak burada gelişme gösterirler ve patojenlerin yüzeye tutunmasını engelleyerek antagonistik etki gösterirler. Laktosidin, asidofilin ve laktasin B gibi doğal antimikrobiyal maddeler üreterek, bağırsak sisteminde asitliği artırmakta, ve *Salmonella spp.* ve *Escherichia coli* gibi patojen mikroorganizmaların üremelerini engelleyerek bağırsak rahatsızlıklarını azalttıkları bilinmektedir. Dolayısıyla *L. acidophilus* içeren fermente süt mamullerinin düzenli olarak tüketilmesi bu bakterilerin sindirim sistemine tutunmasını sağlamakta ve faydalı etkilerini gösterebilmektedir. Ayrıca, serum kolestrolü seviyesini düşürmekte ve antikor tepkilerini arttırmaktadır (Kundakçı ve Ergönül, 2006; Figueroa-Gonzalez ve diğ., 2011; Avonts ve diğ. 2004).

1.2.2. Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae mayası, gıda endüstrisinde şarap, bira ve distile alkollü içecekler ve mayalanmış fırıncılık ürünleri gibi üretim proseslerinde temel

fermentasyon ajanı olarak kullanılmaktadır. Biracılıkta üst fermantasyon mayası olarak tanımlanmaktadır (Rossi and Torriani, 2010).

S. cerevisiae ökaryot bir mikroorganizma olmasından dolayı, hayvan ve bitkilerin karmaşık hücre iç yapılarına sahiptir. Bu yüzden hücre döngüsünün araştırılmasında çok kullanışlıdır. Ayrıca, yüksek miktarda B grubu vitaminleri, mineraller, proteinler ve enzimler içermesinden dolayı besin takviyesi olarak tüketilmekte ve probiyotik ajan olarak da kullanılmaktadır. *S. cerevisiae*, kalın bağırsak iltihabına yol açan *Clostridium difficile* bakterisinin biyolojik kontrolünde bir probiyotik katkı olarak kullanılmaktadır (Munoz ve diğ., 2005; Posteraro ve diğ., 2005).

Uzun süreli kullanım ve tüketim nedeniyle *S. cerevisiae*' nın birçok suşu gıdalarda kullanımı açısından "Generally Recognized as Safe" (GRAS) kategorisinde tanımlanmaktadır (Johnson ve Echavarri-Erasun, 2011).

S. cerevisiae diğer mikroorganizmalara nazaran etanole daha dirençlidir. Yüksek etanol toleransı dolayısıyla, *S. cerevisiae* en önemli endüstriyel etanol üreticisidir. Yapılan çalışmalar *S. cerevisiae* suşlarının hacmen %20 etanol düzeyine kadar dayanabildiklerini göstermiştir (Çakar ve diğ., 2010).

1.2.3. Gastrointestinal sistemde probiyotik mikroorganizmalar

Fonksiyonel gıda üretiminde kullanılacak probiyotiklerden maksimum yarar sağlanabilmesi için bu mikroorganizmaların sahip olmaları istenen bazı özellikler vardır. Bunlar arasında başlıcaları kültürlerin insan kaynaklı olması, patojen olmaması, bağırsak epitel dokusuna tutunabilme özelliğine sahip olması, aside, safra tuzlarına ve teknolojik proseslere dayanıklı olması ve klinik olarak kanıtlanmış yararlı etkilere sahip olmasıdır (Hattingh ve Viljoen 2001; Rokka ve Rantamäki, 2010; Simmering ve Blaut 2001). Bunlar arasında en önemli seçim kriteri, asit ve safra tuzu toleransıdır. Bu özellik pH'nın 1,5'e kadar düşebildiği midede ve asidik ürünlerde probiyotik mikroorganizmaların canlı kalabilme kabiliyeti olarak tanımlanır (Sağdıç ve diğ., 2004).

Gastrointestinal sistem, 400'ün üzerinde canlı türüne sahip oldukça karmaşık bir ekosistemdir. Bu sistem, kompleks bir mikrobiyel floraya sahip ağız, burun ve gırtlaktan meydana gelen ağız boşluğundan başlayıp, anüste son bulmaktadır. Çizelge 1.2'de gastrointestinal sistem elemanlarındaki farklı pH aralıkları verilmiştir.

Çizelge 1.2: Gastrointestinal sistemdeki farklı pH aralıkları (Cook ve diğ., 2012).

Bölge	pH	Geçiş süresi
Yemek borusu	~7,0	10-14 saniye
Mide	1,0-2,5	Yarı boşken ~80 dakika
Proksimal ince bağırsak	6,15-7,35	3,2±1,6 saat
Distal ince bağırsak	6,80-7,88	
Artan kolon	5,26-6,72	Bağırsak tahliyesine bağlı
Azalan kolon	*5,20-7,02*	olarak değişkenlik görülür

Gastrointestinal sistem elemanlarından biri olan midenin pH'ı 1-2,5 arasında değişmekte ve sahip olduğu doğal asidik koşullar patojenlere karşı bariyer işlevi görmektedir. Diğer bir sistem elemanı olan ince bağırsakta, geçişin hızlı olması, düşük pH ve safra tuzu sebebiyle bakterilerin gelişmesini destekleyecek uygun ortam sağlanamamaktadır. Kalın bağırsakta ise geçişin yavaş olması, uygun pH ve besin varlığı sebebiyle bakteriler gelişmesi için uygun bir ortamdır. İnce bağırsakta *Enterococci, Enterobacteria, Lactobacilli, Bacteroides* ve *Clostridia* 10^4-10^6 aralığında bulunurken, bu populasyon kalın bağırsakta 10^{11}-10^{12} cfu/ml' ye kadar çıkabilmektedir (Nag, 2011).

Bağırsak mikroflorasında bulunan probiyotik mikroorganizmaların, yaşlanma, stress, ilaç tedavisi, X-ışınları gibi faktörlerin etkisi ile azalması durumunda gaz, hazımsızlık, diyare, kolit gibi bağırsak rahatsızlıkları ortaya çıkmaktadır. Bu gibi dengenin bozulmasına sebep olan durumlarla karşılaşıldığında bu bakterilerin dışardan alınarak dengenin yeniden sağlanması ile sorunlar çözülebilmektedir (Sezgin ve diğ., 1994).

Potansiyel probiyotik değeri olan mikroorganizmaların belirlenmesinde en önemli parametrelerden birisi kullanılan mikroorganizmanın gastrointestinal bölgelerden geçerken metabolik aktivitesini koruyabilmesidir. Buna ilaveten son üründe ve ticari üretim esnasında suşun canlılığını ve istenen özelliklerini koruyabilmesi de oldukça önemlidir (Çakır ve Çakmakçı, 2004).

Gıda ürünlerinde bulunan probiyotik kültürlerin sayılarında zamana, pH, laktik ve asetik asitlerin konsantrasyonuna, çözünmüş oksijen, depolama sıcaklığı, rekabetçi flora, inhibitörler gibi içinde bulundukları ortam koşullarına bağlı olarak da azalmalar ortaya çıkabilmektedir (Aytuna ve diğ., 2003; Saarela ve diğ., 2000; Mokarram ve diğ., 2009). Örneğin laktik ve asetik asit konsantrasyonunun yüksek

olduğu düşük pH'ya sahip süt ürünlerinde probiyotiklerin canlılıklarını koruma oranları da düşük olmaktadır (Rokka ve Rantamäki, 2010).

1.2.4. Probiyotik mikroorganizmaların fonksiyonel etkileri

Probiyotik gıdalar, canlı mikroorganizma içeren ürün grubu olarak tanımlanır. Probiyotik mikroorganizmaların inkübasyon süreleri uzun olduğu için fermente ürünlerin üretiminde genellikle yoğurt bakterileriyle beraber kullanılırlar. Ayrıca son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte probiyotik mikroorganizmalar içeceklere katılarak, tablet şeklinde, kapsül olarak ve dondurarak kurutma yöntemleri ile de marketlerde satışa sunulmaktadır (Saarela ve diğ., 2000; Sağdıç ve diğ., 2004).

Probiyotik mikroorganizmaların kanda kolesterol düzeyini düşürme, laktoz toleransını arttırma, kolon kanseri riskini azaltma, diareyi önleme, bazı B grubu vitaminlerini, önemli sindirim enzimlerini (β-galaktosidaz) ve antimikrobiyal bileşikleri sentezleme, minerallerin yararlanılabilirliğini artırma, bağışıklık mekanizmasını güçlendirme, normal bağırsak mikroflorasını koruma, gıda kaynaklı alerjileri azaltma gibi klinik olarak kanıtlanmış birçok yararlı etkileri olduğu belirtilmektedir. Bu yararlı etkilerinin yanısıra probiyotiklerin, antikanserojen etkileri de olduğu belirtilmektedir (Holzapfel ve Schillinger, 2002; Sağdıç ve diğ., 2004; Simmering ve Blaut, 2001; Ding ve Shah, 2009).

1.2.5. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri

Probiyotik mikroorganizmalar yetişkin insanların bağırsak florasında yeterli miktarda bulundukları takdirde sindirim sisteminde yararlı ve zararlı mikroorganizmalar arasındaki dengeyi sağlayabilmektedirler (Sun ve Griffiths 2000). Bu kapsamda probiyotik bakterilerin seçiminde dikkate alınan başlıca kriterlerden biri probiyotik kültürün mide-bağırsak sisteminde canlılığını koruyabilmesidir. Ayrıca, probiyotik mikroorganizmaların terapatik ve sağlığı güçlendirici etkilerinin ortaya çıkabilmesi için probiyotik ürünlerin tüketim anında yeterli sayıda probiyotik içermesine ilaveten düzenli olarak tüketilmeleri de gerekmektedir (Ünal ve Erginkaya, 2010).

Probiyotik bir üründe bulunması gereken canlı sayısı konusunda tam bir görüş birliği bulunmamakla birlikte genellikle kabul edilen sayılar $\geq 10^6 - 10^7$ kob/g-ml düzeylerindedir. Japonya'da Fermente Sütler ve Laktik Asit Kökenli İçecekler Derneği ("Fermented Milks and Lactic Acid Bacteria Beverages Association of

Japan") canlı mikroorganizma sayısının $>10^7$ kob/g düzeyinde olmasını öngörürken, A.B.D.'de Ulusal Yoğurt Derneği ("National Yoghurt Association") bu sayının $>10^8$ kob/g olması gerektiğini belirtmektedir. Ayrıca, probiyotik ürünlerin etiketleri üzerinde "canlı ve aktif kültür" açıklamasının yer alması zorunlu kılınmıştır (Özer, 2011).

Son yıllarda Avrupa Birliği destekli araştırmalar sonucunda probiyotik içeren fonksiyonel süt ve süt ürünleri üretiminde önemli artışlar kaydedilmiştir. Süt ürünleri dışındaki gıdalarda da probiyotik kültürlerin kullanımı konusunda uygulamalar vardır (Rokka ve Rantamäki, 2010). Ülkemizde de 1990'lı yıllardan itibaren probiyotik mikroorganizmalar kullanılarak farklı ürün geliştirme çalışmalarına başlanmıştır (Çakır ve Çakmakçı, 2002). Endüstriyel üretimi yapılan başlıca probiyotik ürünler arasında taze süt (asidofilus süt), yoğurt, içecek (yakult), peynir, dondurma ve sütlü tatlılar yer almaktadır (Hattingh ve Viljoen, 2001; Simmering ve Blaut, 2001). Bu ürünlerin bazıları prebiyotik belişenler de içerebilmektedirler (Robinson ve diğ., 2000).

1.2.6. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, ilk olarak 1932 yılında İngiliz şirketi A. Boake, Roberts&Co, Ltd tarafından püskürterek kurutma tekniği kullanarak gam arabik ile kapsüle edilmiş aroma üretiminde kullanılmıştır. Enkapsülasyona olan ilgi, her geçen gün artarak devam etmektedir (Gökmen ve diğ., 2012).

Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon yöntemi, birçok biyoaktif malzemenin korunmasında ve biyoyararlılığının arttırılmasında kullanılan ve katı-sıvı malzemelerin birkaç mikrondan bir milimetreye kadar değişen boyutlardaki kapsüllere hapsedilmesini içeren bir yöntemdir. Biyoaktif malzemelerin enkapsülasyonu gıda endüstrisinde oksidatif reaskiyonları kontrol altına alabilmek, kötü koku, aroma ve rengi maskelemek, salınımı kontrol altına almak ve raf ömrünü uzatmak gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır (Burgain ve diğ., 2011) (Çizelge 1.2). Ayrıca uçucu, çabuk bozunan veya yüksek hidrofobisiteye sahip omega-3 yağ asitleri, aromalar, antioksidanlar, karotenoidler ve bitki sterolleri gibi birçok malzeme daha etkin bir biçimde gıdalara dahil edilebilmektedir (McClements, 2010; Krasaekoopt ve diğ., 2003). Modifiye kaplama materyallerinin ve yeni teknolojilerin

ortaya çıkması ile günümüzde fonksiyonelliği çok yüksek mikroenkapsüle gıdalar elde edilebilmektedir (Koç ve diğ., 2010).

Çizelge 1.3: Probiyotik enkapsülasyonunun gıda endüstrisinde sağladığı yararlar (Ünal ve Erginkaya, 2010).

Ürün	Yarar
Kurutulmuş probiyotik kültür	-Oksijene duyarlı kültürlerin üretimini sağlama -Daha düşük kontaminasyon tehlikesi -Kültürler havada kurutulabilir
Kuru sosisler	-Asidifikasyon oranını iyileştirme
Dondurma, süt bazlı ortam, kızılcık suyu	-Dondurma işlemi üzerine canlılığın korunması
Yoğurt, mayonez, süt	-Depolama sırasında canlılığın korunması

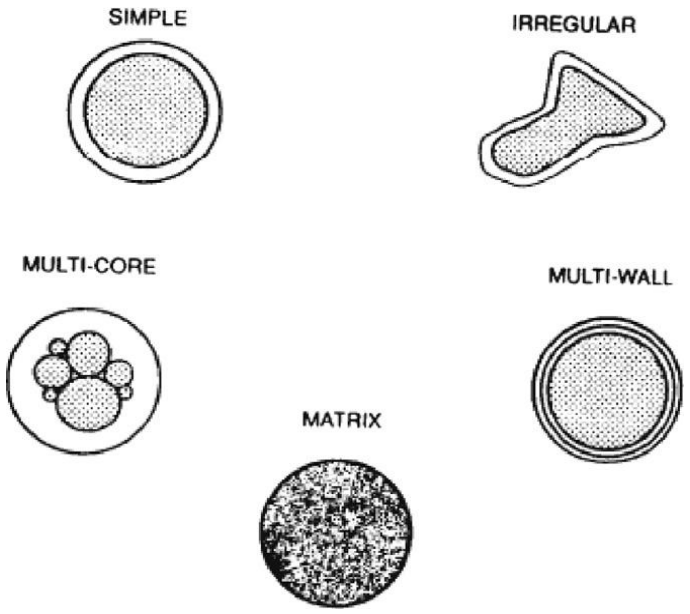
Probiyotik kültürleri içeren gıda ürünlerinin hazırlanmasında mikroenkapsülasyon, gerek depolama kolaylığı, gerekse canlılığın uzun süre korunması açısından yararlı bir yöntem olarak önem taşımaktadır (Kailasapathy, 2002; Ross ve diğ., 2005). Mikroenkapsülasyon yöntemi canlı hücrelerin genellikle karbonhidrat veya protein tabanlı bir duvar malzemesi içine hapsedilmesini içerir ve besin gibi malzemelerin serbestçe girip çıkmasına izin verirken, hücreleri dış etkilerden koruyarak hücrelerin canlılıklarını kaybetmesini önlemektedir. Bu şekilde toz forma getirilen probiyotik mikroorganizmaların kullanımı daha kolay olmakta ve raf ömrü artmaktadır (Rokka ve Rantamaki, 2010; Rodrigues ve diğ., 2011).

Mikroenkapsülasyon uygulaması ile, yüksek sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonu, düşük pH ve yüksek safra tuzu gibi olumsuz ortam koşullarında hücre canlılığının daha iyi korunması sağlanır. Bu sayede stabilitesi artan probiyotik kültürler depolama sırasında canlılığını sürdürerek, gastrointestinal sistemden geçip hedef alana ulaşabilirler (Sabikhi ve diğ., 2010).

Probiyotik mikroenkapsülasyonunda yaygın bir şekilde kullanılan yöntemler; püskürtmeli kurutma, ekstrüzyon, emülsiyon ve koaservasyondur. Püskürtmeli kurutma, sıvıların çok kısa sürede toz haline dönüştürülmesinde kullanılan bir yöntemdir. Sürekli üretim sağlaması, ucuz olması ve kolaylığıyla tercih edilirken, yüksek sıcaklıkların kullanılması bakteri canlılığını azalttığından her zaman iyi sonuçlar vermeyebilmektedir (Nag ve diğ., 2011; Kailasapathy, 2002; Nedovic ve diğ., 2011). Emülsiyon tekniğinde ise iki farklı kombinasyon vardır: su/yağ ve yağ/su emülsiyonu. Yağ/su emülsiyonu farklı kurutma yöntemleri ile kurutularak toz ürünler

elde edilebilir. Bu tekniğin kullanılması ile elde edilen kapsüllerin boyutunun geniş bir aralığa yayılması, bu tekniğin endüstriyel boyutlara uyarlanmasının zor olması ve elde edilen kapsüllerin çok büyük olması (200-1000 μm) gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır (Nedovic ve diğ., 2011; Ding ve Shah, 2009).

Tekli, çok duvarlı, düzensiz, çok çekirdekli ve matriks olmak üzere farklı şekillerde mikrokapsüller bulunmaktadır. Farklı şekil ve boyuttaki kapsüllerin oluşmasındaki en önemli neden ise, kullanılan duvar materyali ve enkaspülasyon yöntemidir. Şekil 1.1'de farklı tipteki mikrokapsüllerin morfolojisi verilmiştir.



Şekil 1.1: Farklı tipteki mikrokapsüllerin morfolojisi (Gharsallaoui ve diğ., 2007).

Hazırlanan mikroküre lerin boyutları da probiyotik canlılığının korunmasıyla ve duyusal özelliklerle ilgili önemli bir faktördür. Küçük formülasyonlar hücre korunumunda iyi performans gösterememekte, daha büyük kapsüller ise gıdanın duyusal veya tekstürel özelliğine negatif etki edebilmektedir (Gökmen ve diğ., 2012; Sandoval-Castilla ve diğ., 2010). 1000 μm üzerinde çapa sahip kapsüller ağızda hissedilebilirken, 3 μm altındaki kapsüller ise algılanamamaktadır (Singer ve Dunn, 1990). 100 μm'nin altında çapa sahip enkapsüle probiyotikler birçok ürüne direk ilave edilebilmektedir (Hansen ve diğ., 2002).

1.2.2.1. Koaservasyon

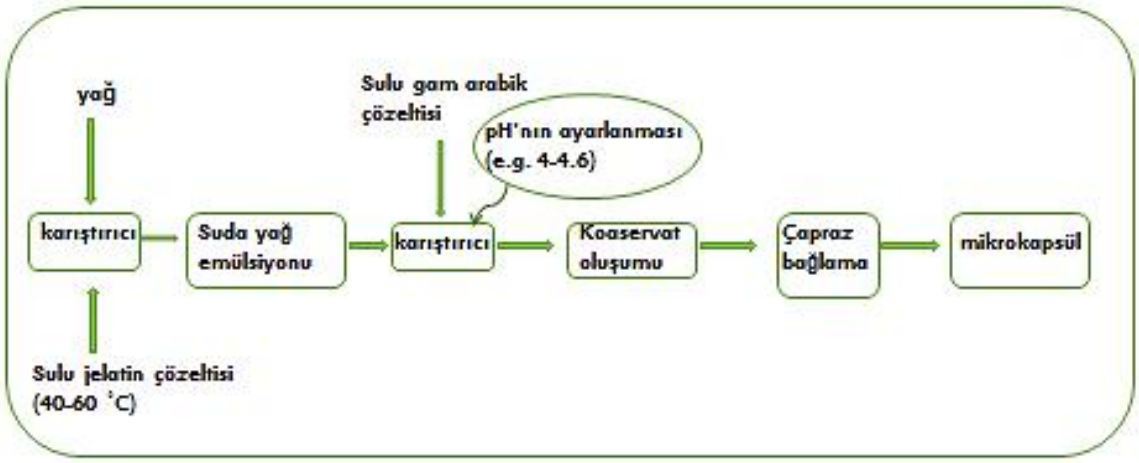
Green ve Scheicer, 1955'de basınca duyarlı karbonsuz kopya kağıdı üretimine yönelik çalışmalarında kullandıkları bu yöntem enkapsülasyon tekniğinin orjinal yöntemi olarak bilinmektedir. Yükleme kapasitesinin %99' un üzerinde olması, mekanik stres, sıcaklık ve pH değişimlerinde kontrollü salınım kolaylığı sebebiyle koaservasyon oldukça ümit verici bir enkapsülasyon teknolojisidir (Oliveira ve diğ., 2007). Çok fazla kullanılmamasının nedeni ise, işlemin çok karmaşık olması ve maliyetinin yüksek olmasıdır. Ayrıca duvar materyallerinin sabitlenmesi amacıyla sıklıkla toksik özellik gösteren gluteraldehitin kullanılması da kısıtlayıcı faktörlerden biridir (Koç ve diğ., 2010; Gouin, 2004).

Koaservasyon basit ve kompleks koaservasyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Basit koaservasyon, elektrolit içermeyen bir çözeltinin ilave edilmesi ile (tuz veya alkol gibi) kolloidlerin etrafındaki çözgenin uçurulması metodudur. Kompleks koaservasyon ise, iki karşıt yüklü makromolekülün bulunduğu çözeltinin, ortam şartlarının değişmesi ile çözünürlüğünün azalması sonucu kompleks mikrokürelerin oluşması yöntemidir (Favaro-Trindade ve diğ., 2011).

Sistemin sıcaklık, pH veya kompozisyonu ayarlanarak, ön membran bileşiklerinin polimerik solüsyondan ayrılması ile çekirdeğin uniform bir tabaka halinde kaplanması gerçekleşir. Oluşan bu damlacıklara koaservat denir (koaservat kelimesi Latin kökenli olup 'to heap together' yani 'kümelenmek' anlamındadır) ve ön membran bileşenleri ısı, çapraz bağlama veya çözgenin uzaklaştırılması ile katılaştırılır. Jelatin ve jelatin-gam arabik gibi hidrofilik ön membran bileşenleri, sitrus yağları, bitkisel yağlar ve suda çözünebilen vitaminlerin enkapsülasyonu için kullanılmaktadır. Çekirdek materyali suda çözünebilir veya suyla karışmayan bir materyal ise, ön membran bileşenleri hidrofobiktir (Nori ve diğ., 2011; Park ve Chang, 2000; Kruif ve diğ., 2004).

Kompleks koaservasyon, polimer bakımından zengin ve polimerce fakir bölge oluşturmak üzere iki zıt yüklü polimerler arasındaki reaksiyonları içerir. Polimerce zengin bölge çekirdek materyalini kaplamak için kullanılmaktadır. Akasya gamı, pektin, aljinat ve karboksimetil selüloz gibi çeşitli negatif yüklü polisakkaritler, jelatin ve kitozan gibi, pozitif yüklü protein molekülleri ile birlikte kullanılmaktadır (Saravanan ve Rao, 2010). Kompleks koaservasyon ile aroma

mikroenkapsülasyonunda ksantan gam/jelatin, gam arabik/jelatin, soya proteini/pektin, gam arabik/albumin ve birçok doğal bileşik, protein-polisakkarit kombinasyonu rapor edilmiştir. Kompleks koaservasyonun en klasik sistemi, jelatinin pozitif polielektrot ve gam arabiğin negatif polielektrot olarak kullanıldığı sistemdir. Bu sistem karbonsuz kağıt, koku şeritleri, Fragrance numuneleri ve aroma bileşenlerinin üretiminde başarıyla kullanılmaktadır (Jun-Xia ve diğ., 2011). Şekil 1.2'de jelatin/gam arabik kompeks koaservasyon sisteminin basamakları ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil 1.2: Jelatin/gam arabik (GGA) kompleks koaservasyon yöntem basamakları (Thies, 2008).

Oliveira ve diğ.(2007) yapmış olduğu bir çalışmada, pektin ve kazein duvar materyali olarak kullanılmış, *Bifidobacterium lactis* ve *Lactobacillus acidophilus* kompleks koaservasyonla enkaspüle edilmiş ve püskürtmeli kurutma yöntemi ile kurutulmuştur. Enkaspüle edilmiş bakteriler asidik koşullarda kaplanmamış bakterilere oranla daha yüksek canlılık göstermişlerdir. *L. acidophilus* 7 ve 37°C'de 120 gün depolama boyunca canlılıklarını sürdürürken, *B. lactis* 37°C'de canlılığını hızlı bir şekilde kaybetmiştir.

Koaservasyon ile elde edilen mikrokapsüller püskürtmeli kurutma veya liyofilizasyon tekniği ile kurutulmaktadırlar. Kompleks koaservasyon genel olarak yağların mikroenkapsülasyonunda kullanılmasına rağmen ısıya duyarlı probiyotik mikroorganizmalar gibi çekirdek materyallerinin kaplanması sırasında işlem oda sıcaklığında gerçekleşebildiğinden son yıllarda bu amaçla kullanımında artış görülmüştür (Nazzaro ve diğ., 2011; Rokka ve Rantamaki, 2010).

1.2.7. Kaplama materyalleri

Çekirdek materyalinin kaplanmasında seçilen enkapsülasyon tekniği ve kaplama materyali bazı avantajlar ve dezavantajlara sebep olmaktadır. Kullanılan enkapsülasyon tekniğinin bir sonucu olarak elde edilen büyük çaplara sahip mikrokapsüller mikroorganizmalar için iyi bir koruma sağlarken, çaplarının büyük olması sebebiyle son ürünün duyusal özelliklerinde bazı dezavantajlar ortaya çıkmaktadır. Kullanılan kaplama materyalleri kapsüllerin, mide asitliğinden geçebilmesini ve aynı zamanda bağırsak sisteminde uygun bir şekilde salınım gerçekleştirmesini sağlamalıdır.

İyi bir kaplama materyali; kapsülleme esnasında kolay işlenebilmeli, emülsiyon ve dispersiyon özelliği iyi olmalı ve emülsiyon stabilitesi yüksek olmalıdır. Ayrıca, çekirdek materyali ile kaplama ve depolama esnasında çekirdek materyalinin özelliklerini bozacak şekilde reaksiyona girmemesi gerekmektedir. Sayılan bütün özellikleri taşıyan tek bir kaplama materyali olmadığı için, diğer kaplama materyalleri ile kombine halde veya oksijen tüketici, antioksidanlar, şelat ajanları veya biyosurfektanlarla birlikte kullanılmaları da mümkün olabilmektedir (Koç ve diğ., 2010; Ünal ve Erginkaya, 2010; Gökmen ve diğ., 2012).

Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyon ile muhafazasında çeşitli kaplama malzemeleri kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılacak olan duvar materyalleri seçilirken, yumuşak olmasına ve toksik olmamasına dikkat edilmelidir. Aljinat, kitozan, ksantan gam, selüloz asetat fitalat, peyniraltı suyu tozu proteini, jelatin ve karregenan probiyotik enkapsülasyonunda kullanılan kaplama malzemelerinden birkaçıdır. Toksik etkisinin olmaması, mikroorganizmalar gibi duyarlı materyallerin kaplanmasında $CaCl_2$ ile yumuşak matris oluşturması, mikroorganizmaların kolaylıkla kaplanması, ucuz olması ve kolay bulunması sayesinde bu alanda en çok kullanılan malzemelerden biri sodyum aljinattır (Kailasapathy, 2002; Rodrigues ve diğ., 2010; Ding ve Shah, 2009; Chávarri ve diğ., 2010; Nazzaro ve diğ., 2009).

Probiyotik mikroorganizmalar aljinat solüsyonuna karıştırılıp, bir ekstruder ile $CaCl_2$ solüsyonuna damlatılarak mikrokapsüllerin hazırlanması en bilenen ve kolaylığı için tercih edilen yöntemdir (Gonzales-Sanchez ve diğ., 2010). Fakat aljinattan hazırlanan mikrokürelerin asidik koşullardaki dayanıksızlığı gastrointestinal geçiş sırasında

zarar görmelerine yol açabildiğinden yeni malzemeler ve yeni üretim teknikleri araştırılmaya başlanmıştır (Ding ve Shah, 2009). Aljinatın nişasta (Sabikhi ve diğ., 2010), pektin (Sandoval-Castilla ve diğ., 2010) ve ksantan-inulin (Nazzaro ve diğ., 2009) gibi malzemelerle karıştırılması, kitozan (Brinques ve Ayub, 2011; Chavarri ve diğ., 2010) veya polilisin-palmiye yağı (Ding ve Shah, 2009) gibi malzemelerle kaplanması sunulan çözüm yollarından bazılarıdır. Ayrıca peyniraltı suyu proteinleri (Doherty ve diğ., 2010), gellan zamkı (Nag ve diğ., 2011), L-karragenan (Rodrigues ve diğ., 2011) ve kazein (Heidebach ve diğ., 2010) gibi bazı değişik malzemeler de aljinata alternatif olarak sunulmuştur.

1.2.2.2. Jelatin

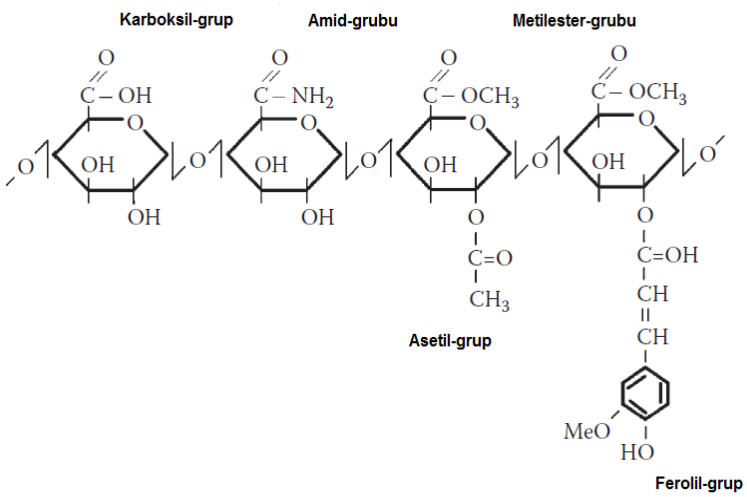
Jelatin, kollajenin kimyasal ve fiziksel degradasyonu veya ısı ile denatürasyonu sonucu elde edilen hayvansal kaynaklı bir proteindir. Jelatinin tipi, kullanılan kollajenin kaynağına ve hidrolitik muameleye bağlı olarak farklılık gösterir. A tipi jelatin kollajenin asit ile hidroliz sonucu oluşurken, B tipi jelatin kollajenin alkali ile hidrolizi sonucu oluşur. A tipi jelatinin izoelektrik noktası 7-9 iken, B tipi jelatinin izoelektrik noktası 4,7-5,4'dür (GMIA, 2013).

Jelatin çok yönlü fonkisyonel özelliklere sahiptir ve suda yüksek viskoziteli çözelti oluşturabilmektedir. Jelatin, ucuz olması, kolay bulunması, doğal kaynaklardan elde edilmesi, tatsız ve kokusuz olması, gıda katkısı olarak kullanım açısından sorun oluşturmaması sebebiyle, bakteri, ilaç ve enzim enkapsülasyonunda kaplama materyali olarak kullanımı uygun olan bir malzemedir (Annan ve diğ., 2007; Rokka ve Rantamäki, 2010).

Jelatin ısıyla geri dönüştürülebilir jeller yapan ve probiyotik enkaspülasyonunda tek veya başka bileşenlerle birlikte kullanılan bir protein gamdır. Amfoterik yapısı sebebiyle, jellan gam gibi aniyonik polisakkaritlerle birleşmek için iyi bir materyaldir. Bu hidrokolloidler taşıdıkları negatif yüklerden dolayı birbirlerini iterler ve ancak 6'dan yüksek pH'larda karışabilirler. Jelatinin net yükü pH ayarlanırken izoelektrik noktasının üzerinde pozitif olmaya başlar ve bu negatif yüklü jellan gam ile güçlü bir etkileşim oluşmasına sebep olur (Burgain ve diğ., 2011).

1.2.2.3. Pektin

Pektin α-(1,4)-D-glikozidik bağları ile bağlı galaktronik asit zincirlerinden oluşan bir heteropolisakkarittir. Şekil 1.3'de pektinin kimyasal yapısı gösterilmektedir. Pektin düşük konsantrasyonlarda dahi stabil emülsiyon oluşturabilen bir polimerdir. Pektinin emülsiye edici özelliği, pektin zincirinde bulunan protein kalıntılarından ve kimyasal yapısında yüksek miktarda asetil grupları içermesinden ileri gelmektedir (Gharsallaoui ve diğ., 2007).



Şekil 1.3: Pektinin kimyasal yapısı (Endress ve Mattes, 2009).

Ticari pektinin önemli bir bölümü, methanol ile kısmen esterlenmiş polimerize galaktronik asittir. Ticari pektin düşük-metoksilli ve yüksek-metoksilli pektin olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Gastrointestinal sistemdeki enzimlerle parçalanmayarak, bağırsaklara geçen pektinin, gastrik boşalma, mide ülseri, glukoz ve insülin seviyesini düzenleme, safra asidini bağlama, serum kolesterol seviyesini düşürme, bağırsak yaralarını iyileştirme ve kolon kanserini önleme gibi sağlığa faydalı etkileri bulunmaktadır. Pektinler arasında, elmadan elde edilen pektin sitrus meyvelerinden elde edilen pektinlere kıyasla *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa,* ve *Escherichia coli* üzerinde daha güçlü bakteriyostatik etki göstermektedir (Dumitriu, 2002).

Pektin, balık yağı gibi lipofilik gıda bileşenlerinin püskürtmeli kurutma ile mikroenkaspülasyonunda uygun bir duvar materyali olarak kullanılmaktadır. Bu durum, püskürtmeli kurutma yönteminin, pektinin fonksiyonel özellikleri üzerinde önemli bir etki oluşturmadığını göstermektedir (Gharsallaoui ve diğ., 2007).

Bifidobacterium lactis yüksek-metoksilli pektini kullanarak gelişme gösterirken *B. pseudolongum*, *B. bifidum* Bb12, *Lactobacillus plantarum* 0207, *L. casei* ve *L. acidophilus* düşük-metoksilli pektini kullanarak daha iyi gelişme göstermektedir (Endress ve Mattes, 2009).

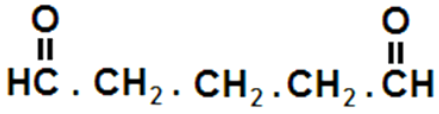
Antonov ve diğ.(1996) yapmış oldukları çalışmada pektin-jelatin faz davranışının iyonik güce, pH'ya ve pektinin esterleşme derecesine bağlı olduğunu göstermişlerdir. İki biyopolimer arasındaki uygunluğun, pektinin esterleşme derecesi ve ester gruplarının konsantrasyonlarının artmasına ve sıcaklık, iyonik güç ve pH azalmasına bağlı olarak arttığı görülmüştür.

1.2.8. Çapraz bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcılara olan ilginin artmasının en önemli nedeni, stabil ve biyo-uyumlu ürünler elde edilebilmesidir. Ancak bunu yaparken herhangi bir toksik etki göstermemelidir. Fiziksel çapraz bağlama metodları arasında kurutma, ısıtma gibi işlemlerin yanı sıra gama veya uv-radyasyona maruz bırakma işlemleri de bulunmaktadır. Kimyasal çapraz bağlama metodlarında ise aminoasitlerin hidroksil, karboksil ve amino grupları bağlanmaktadır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılar formaldehit, gluteraldehit, poliaminler, enzimler (trans-glutaminaz) ve bazı doğal bileşiklerdir (Yoa ve diğ., 2004; Leclercq ve diğ., 2009).

1.2.2.4. Gluteraldehit

Klinik olarak, biyolojik doku fiksasyonunda gluteraldehit en yaygın kullanılan çapraz bağlayıcı ajandır. Fakat gluteraldehitin biyolojik dokuları sertleştirme eğiliminde olduğu rapor edilmiştir. İlaveten, gluteraldehit ile sabitlenen dokularda sitotoksisite, fibrozis, adezyon ve kalsifikasyon rapor edilmiştir (Sung ve diğ., 2000). Şekil 1.4'de gluteraldehitin kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 1.4: Gluteraldehitin kimyasal yapısı (Sung ve diğ., 2000).

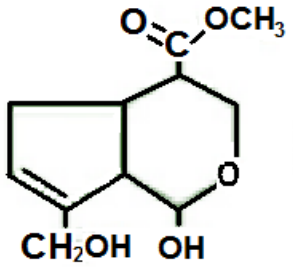
Biyolojik dokuların sabitlenmesinde formaldehit, gluteraldehit ve epoksi bileşikler gibi bazı kimyasalların çapraz bağlayıcı olarak kullanım alanı olmasına rağmen, bu

amaçla genellikle gluteraldehit kullanılmaktadır. Çünkü, çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehitin fonksiyonu, stabilitesi ve güvenilirliğini değerlendirmek için birçok çalışma yapılmış ve uzun süre kullanımıyla ilgili yeterli klinik bilgi ve deneyim elde edilmiştir. Fakat gluteraldehit hala sitotoksik ve kalsifikasyon gibi dezavantajlar göstermektedir ve ayrıca insanlarda heterotopik bağışıklık tepkisi üzerindeki etkileri hakındaki bilgiler ise yetersiz düzeydedir. Bu yüzden yeni bir alternatif sabitleyici ajan geliştirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple, doğal çapraz bağlayıcı ajan olarak genipin kullanımıyla ilgili girişimler mevcuttur (Yoo ve diğ., 2011).

Gluteraldehit kolay temin edilebilmesi, ucuz olması ve sulu çözeltilerinin kollajen dokular üzerinde kısa zamanda etkin bir çapraz bağlama gösterebilmesi sebebiyle yaygın kullanılan bir çapraz bağlayıcı ajandır (Bigi ve diğ., 2002).

1.2.2.5. Genipin

Genipin, geleneksel Çin ilaçlarında bulunan ve *Gardenia jasminoides Ellis* meyvesinden elde edilen doğal bir bileşiktir (Lau ve diğ., 2010). Aminoasit ve proteinlerle reaksiyona girerek koyu mavi pigmentler oluşturur. Oluşan pigmentler gıda boyalarının üretiminde kullanılır. Ek olarak, enzimatik bozunmaya karşı direnç gösteren stabil çapraz bağlayıcı ürünler elde edilmiş olur. Genipin doğal olması ve düşük toksisite göstermesi sebebiyle tercih edilmektedir. Genipinin, gluteraldehitten 10,000 kez daha az toksik olduğu tespit edilmiştir (Yoa ve diğ., 2004; Elzoghby ve diğ. 2011). Kapalı formülü $C_{11}H_{14}O_5$ olan genipinin kimyasal yapısı ise Şekil 1.5'de verilmiştir.



Şekil 1.5: Genipinin kimyasal yapısı (Yuan ve diğ., 2007).

Genipin, Çin'in tıp alanında kolestaz ve hepatit için bir tedavi olarak kullanılmasının yanısıra son yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmalarda, genipinin tip 2 diyabet tedavisinde etkili olduğu görülmüştür. Genipinin, Japonya,

Kore, Tayvan ve Güneydoğu Asya'da eczacılık ve gıda sektöründe kullanımı onaylanmıştır (Annan ve diğ., 2007).

Genipin, renklendirici özelliği sebebiyle doğal boyar madde olarak gıda sektöründe kullanım alanı bulmaktadır. Genipin renksiz bir maddedir, ancak proteinler ve aminoasitlerle reaksiyona girdiğinde mavi renk oluşumu görülmektedir. Genipinin bu davranışı tekstil ve gıda sektöründe doğal boyar madde olarak kullanımına olanak sağlamıştır. Birçok çalışmada genipinin gluteraldehite oranla daha düşük sitotoksisite ve genotoksisite gösterdiği görülmüştür (Yoo ve diğ., 2011).

Annan ve diğ.(2007) yapmış olduğu çalışmada farklı genipin konsantrasyonlarının (0-10 mM) mikroküre boyutu ve *Bifidobacterium lactis* Bb-12'nin canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Mikroküre boyutu ve bakteri canlılığı üzerinde artan genipin konsantrasyonlarının önemli ölçüde bir etkisi görülmezken, mikrokapsüllerin simüle edilmiş mide özsuyundaki stabilitesi artan genipin konsantrasyonuyla birlikte artış göstermiştir.

Bigi ve diğ.(2002) yapmış olduğu çalışmada, farklı genipin konsantrasyonları kullanılarak çapraz bağlanan jelatin filmlerinin termal, mekanik, şişme ve salınım özellikleri üzerinde genipin konsantrasyonunun etkileri incelenmiştir. Çapraz bağlama derecesi, çapraz bağlama yapılmadan önceki ve yapıldıktan sonraki serbest aminoasit miktarları arasındaki fark olarak değerlendirilmiş, ve genipin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak, çapraz bağlama etkinliğinin yaklaşık %85'e kadar arttığı görülmüştür. Genipin ile stabilize edilen jelatin filmlerden elde edilen sonuçlara göre, çapraz bağlamanın kollajen biyomalzemeler için yararlı bir uygulama olduğu görülmüştür.

1.2.3. Liyofilizasyon

Liyofilizasyon, donmuş örnekteki buzun vakum altında süblimasyon sonucu uzaklaştırılarak kurutulması işlemidir. Liyofilizasyon ile yüksek kaliteli ve daha sağlam kapsüller elde edilmektedir. Çok zaman alması ise bir dezavantaj olarak görülmektedir (Cook ve diğ., 2012; Leclercq ve diğ., 2009).

Liyofilizasyon, mikroorganizmaların kurutulmasında kullanılan, yüksek oranda canlılık korunumu sağlayan (>%60) hassas bir yöntem olmasına rağmen, dondurma aşamasında yüksek ozmotik basınç oluşması sebebiyle bazı duyarlı proteinlerin denatürasyonu sonucu canlılığın azalmasına neden olabilir. Dondurarak kurutmanın

negatif etkileri, bazı donmaya karşı koruyucu (krayoprotektan) maddelerin ilave edilmesi ile azaltılabilmektedir. Uygun krayoprotektanlar ortama ilave edilerek probiyotiklerin adaptasyonunu kolaylaştırmakta ve hücre içinde birikerek dış ortamla olan ozmotik basınç farkını azaltmaktadır. Kullanılacak olan krayoprotektanın gıda kaynaklı olması, toksik olmaması, kolay bulunması, ucuz olması, yenilebilir olması gibi özelliklere sahip olması gerekir. Bu amaçla yağsız süt tozu, gliserol, bakteriyel selüloz, aljinat kullanılan bazı kryoprotektanlardandır (Capela ve diğ., 2006; Jagannath ve diğ., 2010; Semyonov ve diğ., 2010).

2. MATERYAL METOD

2.1. Materyal

Lactobacillus acidophilus LA5, *Saccharomyces cerevisiae* CEN PK 113-7D, MRS Broth, YPD Broth (10g yeast ekstrakt, 10g pepton, 20g D-glikoz; 1L distile su), bakteriyolojik agar, bakteriyolojik pepton, yağsız süt tozu, gliserol, pektin, jelatin, HCl, NaOH, ninhidrin, genipin, pepsin, bovine bile, KCl, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, NaCl kullanılan kimyasal ve mikrobiyolojik malzemelerdir. Bu malzemelerin temin edildikleri kaynaklar Ek 1'de, kullanılan cihazların listesi ise Ek 2'de verilmiştir.

2.2. Kültür Canlandırma

Liyofilize halde temin edilen *L. acidophilus* LA5 100 mL MRS broth içinde 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen mikroorganizmalar 4°C'de 3000×g hızda 5 dakika santrifüj edilerek çökertilmiş ve besiyeri kalıntılarını temizlemek için steril pepton solüsyonu (%0,1 pepton+ %0,85 NaCl) ile iki kere yıkanarak santrifüj işlemi tekrar edilmiştir (Mokarram ve diğ., 2009).

S. cerevisiae CEN PK 113-7D için, %30 gliserol çözeltisinde -80°C' de saklanan kültürden 0,2 mL, 10 mL YPD broth içine aktarılmış ve 30°C'de 16 saat inkübe edildikten sonra, gelişen mikroorganizmalar 6000 g hızda 10 dakika santrifüj edilerek çökertilmiş ve besiyeri kalıntılarını temizlemek için %0,85'lik tuzlu su çözeltisi ile iki kere yıkanarak santrifüj işlemi tekrar edilmiştir (Duongthingoc ve diğ., 2013).

2.3. Mikroorganizma Sayımı

L. acidophilus LA5 canlılığını belirlemek için anaerobik koşullarda MRS agar besiyerine dökme yöntemi ile ekim yapılmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra sayılmıştır. Dilüsyon hazırlamak için peptonlu su kullanılmış ve çalışmalar iki paralelli olarak yürütülmüştür. Sayım yapılırken 20-350 arasında koloni içeren petriler dikkate alınmıştır (Semyonov ve diğ., 2010; Sabikhi ve diğ., 2010).

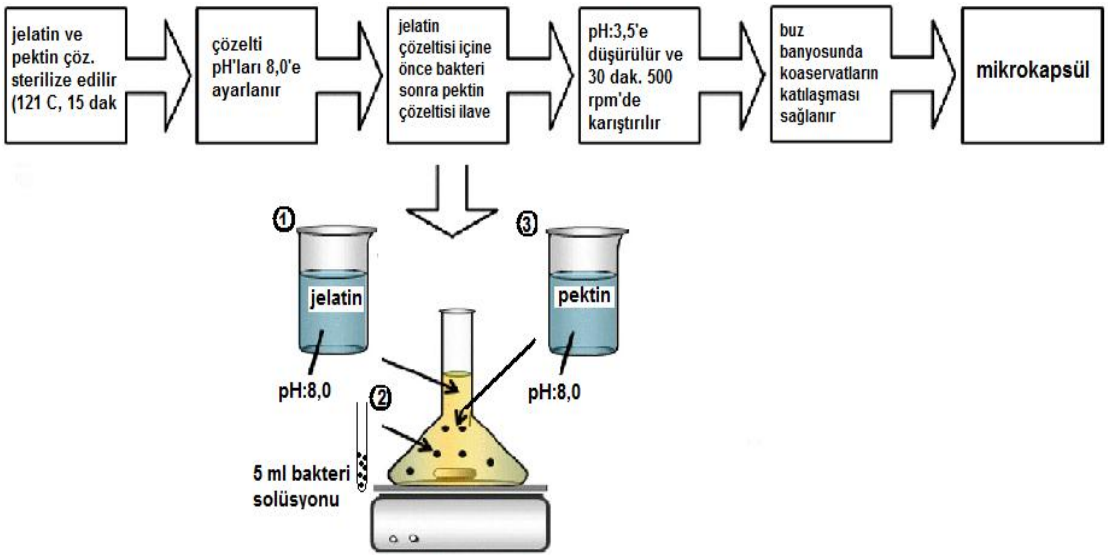
S. cerevisiae CEN PK 113-7D canlılığını belirlemek için, aerobik koşullarda YPD agar besiyerine yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve 30°C'de 48 saat inkübe

edildikten sonra sayım yapılmıştır. Dilüsyon hazırlamak için %0,85'lik steril tuzlu su çözeltisi kullanılmıştır (Duongthingoc ve diğ., 2013). Sayım yapılırken 15-150 arası koloni içeren petriler dikkate alınmıştır. Mikroorganizma sayısı hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır (Gürgün ve Halkman, 1990):

$$\frac{kob}{mL/g} = \frac{Koloni\ sayısı \times Seyreltme\ faktörü}{Petriye\ ekilen\ miktar}$$

2.4. Mikrokapsül Hazırlanması

Mikrokapsüller, Oliveira ve diğ.(2007) ve Saravanan ve Rao (2010)'nun kullandıkları yöntemlerin modifikasyonu sonucu elde edilen kompleks koaservasyon yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Duvar materyali olarak kullanılan pektin ve jelatin solüsyonu 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra oda sıcaklığına gelen solüsyonların pH'ları, 1M NaOH kullanılarak 8,0±0,1'e ayarlanmıştır. Daha sonra 5 mL mikroorganizma solüsyonu jelatin çözeltisine eklenmiş ve 5 dakika karıştırıldıktan sonra ayarlı pektin çözeltisi ilave edilerek 500 rpm karıştırma hızında 1M HCl kullanılarak karışımın pH'sı 3,50±0,01'e düşürülmüştür. Koaservat oluşumunun tamamlanması için karışım bu aşamada 30 dakika boyunca karıştırılmış ve 100 mL distile su eklenerek koaservasyon işlemi tamamlanmıştır. Sistemin kararlı bir noktaya ulaşabilmesi için 1,5 saat 250 rpm'de karıştırılmaya devam edilmiş ve oluşan koaservatların sertleşmesi için karışımın sıcaklığı buz banyosu içinde 5°C'ye düşürülerek 1 saat süreyle karıştırılmıştır. Prosedür tamamlandıktan sonra solüsyon ayırma hunisine alınarak oluşan koaservatların ayrılması sağlanmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Jelatin-pektin kompleks koaservasyon yöntem basamakları.

2.4.1. Katı miktarının etkisi

Duvar malzemesi miktarının mikrokapsül oluşturma verimine ve boyutlarına etkisini araştırmak üzere %1, %2 ve %4'lük (g duvar malzemesi/100 mL çözelti) toplam duvar malzemesi kullanılarak mikrokapsüller oluşturulmuştur.

2.4.2. Jelatin:pektin oranının etkisi

Jelatin:pektin (j:p) oranının mikrokapsül oluşturma verimine ve boyutlarına etkisini araştırmak üzere 2:1, 1:1 ve 1:2 (g:g) oranları kullanılarak mikrokapsüller oluşturulmuştur.

2.5. Kapsül Veriminin Belirlenmesi

Toplam katı miktarı ve jelatin:pektin oranının koaservasyon işlemi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla kapsül verimi hesaplanmıştır. Toplanan koaservatlar kurutulmuş ve aşağıda verilen formül kullanılarak verim hesaplanmıştır (Jun-xia ve diğ., 2011):

$$Kapsül\ verimi = \frac{(Kapsüllerin\ kuru\ ağırlığı)}{(Kullanılan\ duvar\ materyallerinin\ kuru\ ağırlığı)} \times 100$$

2.6. Genipin ile Çapraz Bağlanma Derecesi

Genipin proteinlerin amino grupları ile reaksiyona girerek mavi-mor renk meydana getirmektedir. 30 mM genipin konsantrasyonunda farklı süreler boyunca (0, 20, 42, 66 ve 90 saat) muamele edilen kapsüllerin renginde meydana gelen değişim incelenerek sürenin çapraz bağlanma üzerine etkisi incelenmiştir.

2.7. Enkapsülasyon İşleminin Canlılık Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Enkapsülasyon işleminin canlılık üzerine etkisini belirlemek amacıyla enkapsülasyon öncesi ve sonrası canlı mikroorganizma sayımı yapılmıştır ve aşağıda verilen formül kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır (Annan ve diğ., 2007):

$$Enkapsülasyon\ verimi = \frac{(N)}{(N_0)} \times 100$$

Formülde kullanılan N_0; başlangıçta ilave edilen mikroorganizma sayısı, N ise enkapsülasyon işlemi sonrası kapsüllerin parçalanması sonucu açığa çıkan mikroorganizma sayısıdır. Enkapsülasyon sonrası mikroorganizma sayımı yapılabilmesi için 1 mL mikrokapsül 9 mL peptonlu su içinde 30 saniye boyunca bir

homojenizatör yardımıyla mikrokapsüllerin salınımı gerçekleştirilmiş ve sayım yapılmıştır (Bölüm 2.3).

2.8. Liyofilizasyon İşleminin *L. acidophilus* LA5'in Canlılığı Üzerine Etkisi

Mikrokapsüller, daha uzun raf ömrü ve kullanım kolaylığı sebebiyle liyofilizasyon yöntemi ile kurutulmuştur. Liyofilizasyon yönteminin mikroorganizma canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla kompleks koaservasyon ile elde edilen mikrokapsüller koaservasyon sonrası steril petri kutularına alınarak -20°C'de 24 saat dondurulduktan sonra -30°C'de 0,37 mbar basınçta 24 saat kurutulmuştur (Semyonov ve diğ., 2010).

Krayoprotektan olarak %10'luk yağsız süt tozu kullanılmıştır. Liyofilizasyon yöntemi ile kurutulan mikrokapsüllerden 0,1 gram 9,9 mL peptonlu su içinde çözüldükten sonra bir homojenizatör yardımıyla salındıktan sonra sayım yapılmıştır (Bölüm 2.3).

2.9. Enkapsüle *L.* a*cidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nin Simüle Edilmiş Mide Özsuyunda Canlılık Korunumunun İncelenmesi

Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonunda temel amaçlarından biri, mideden geçiş boyunca maruz kaldığı yüksek asidik koşullara dayanıklı olmasıdır. Bu sebeple in-vitro koşullarda hazırlanan mide özsuyunda serbest ve enkpasüle haldeki *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D inkübe edilmiştir. Simüle edilmiş mide özsuyu (SGF: simulated gastric fluid), % 0,2 sodyum klorür ve % 0,3 pepsin (837 units/mg of protein) içeren çözeltinin pH'sı HCl ile 2,0'ye ayarlanarak hazırlanmıştır. 1 mL kapsüllenmiş ve serbest haldeki *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D 9 mL vücut sıcaklığına ısıtılan SGF ile karıştırılarak, 37°C'de 30, 60 ve 120 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürelerin sonunda tüpler alınarak enzimatik reaksiyonu sonlandırmak ve kapsüllerin daha kolay bir şekilde salınımını gerçekleştirmek amacıyla 0,1 N NaOH ile pH değeri 7'ye ayarlanmış ve sayım yapılmıştır (Bölüm 2.3) (Nag ve diğ., 2011).

2.10. Enkapsüle *L.* a*cidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nin Simüle Edilmiş Bağırsak Sıvısında Canlılık Korunumunun İncelenmesi

Simüle edilmiş bağırsak sıvısı (SIF: simulated intestinal fluid) (6,5 g/L NaCl, 0,835 g/L KCl, 0,22 g/L $CaCl_2$ ve 1,386 g/L $NaHCO_3$) %0,3 oranında safra tuzu içerecek şekilde hazırlanan solüsyonun pH değeri 7,5'a ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika

otoklavlanmıştır. 1 mL kapsüllenmiş ve serbest haldeki *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D 9 mL SIF ile karıştırılarak 37°C'de 1, 2 ve 4 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası sayım yapılmıştır (Bölüm 2.3) (Chavarri ve diğ., 2010).

2.11. Mikrokapsül Boyutunun Belirlenmesi

Mikrokapsül boyutunun belirlenmesi amacıyla rastgele seçilen 100 kapsülün optik mikroskop (×40 zoom) kullanılarak çapları ölçülmüştür ve ortalama kapsül çapı hesaplanmıştır. Düzensiz kapsüller ölçülürken en geniş çap dikkate alınmıştır (Chavarri ve diğ., 2010).

2.12. Islanabilirlik

Islanabilirlik su veya çözgen varlığında kapsüllerin şişme kapasitesi olarak tanımlanmaktadır (Leclercq ve diğ., 2009). Çapraz bağlanan kapsüllerin liyofilizasyon sonrası, sulu ortamdaki kapsül boyutu üzerinde konsantrasyonun farklılığı incelenmiştir. Kapsül stabilitesini arttırmak amacıyla çapraz bağlayıcı olarak farklı konsantrasyonlarda (5, 7,5, 10, 15 ve 20 mM) hazırlanan genipin çözeltileri kullanılmış ve oluşturulan mikrokapsüller sürekli bir çalkalayıcı altında genipin ile muamele edildikten sonra liyofilize edilmiştir. Kurutulmuş kapsüller sulu ortamda bekletilerek hidrasyon tamamlandıktan sonra optik mikroskopta (×40 zoom) görüntülenmiş ve kapsül çapları ölçülerek şişme oranı hesaplanmıştır.

2.13. İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri, SPSS Statistics Version 21 (IBM) programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler arasındaki farklılık Tek-Yollu ANOVA yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Işlemler arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Farklılıklar %95 önem düzeyinde ($p \leq 0,05$) belirlenmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Kapsül Veriminin Belirlenmesi

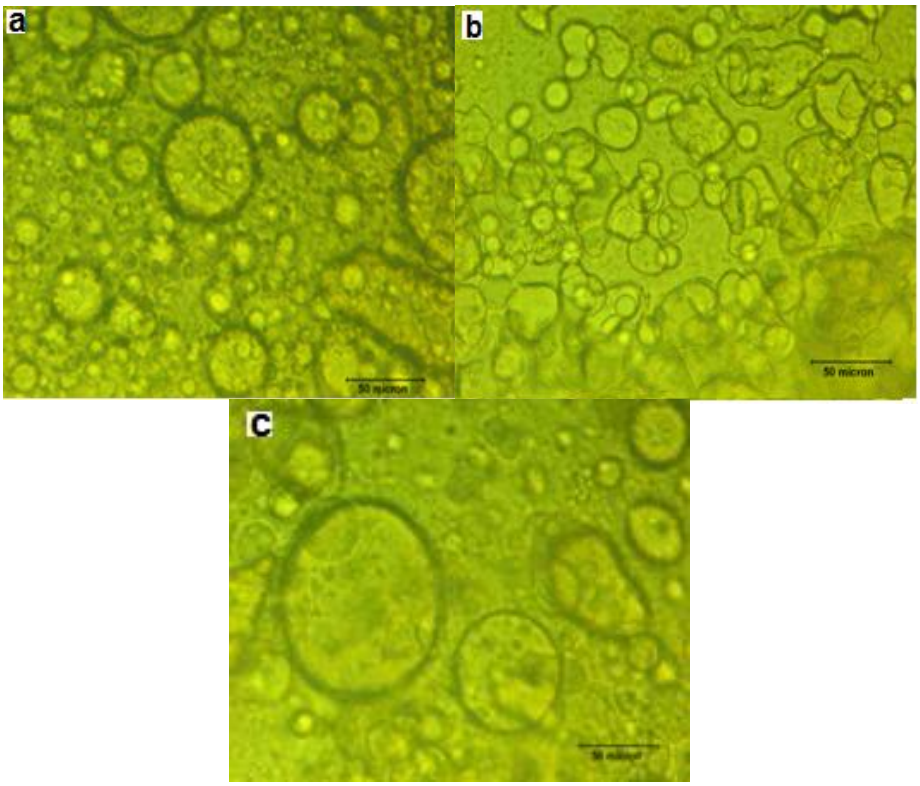
Kompleks koaservasyon kolay bir yöntem olmasına rağmen, koaservat oluşum pH'sı, polimer konsantrasyonu ve negatif yüklü polimerin, pozitif yüklü polimere oranı gibi koşulların optimize edilmesi oldukça zordur (Saravanan ve Rao, 2010). Mikrokapsüllerin boyutu ve morfolojisi kullanılan kaplama materyali oranları ile ayarlanabilmektedir. Bu açıdan farklı jelatin/pektin oranları kullanılarak kapsül oluşturulmuştur. Öncelikle, kapsül oluşturulurken çekirdek materyali kullanılmamış, boş kapsül oluşturulmuştur. Bu şekilde kapsül oluşumunun ve verimin en yüksek olduğu kaplama materyali oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu denemelerde, toplam kaplama materyali %1-2-4 (g/100mL) olacak şekilde ayarlanmıştır. Çizelge 3.1'de değişik koşullarda elde edilen kapsüllerin verim sonuçları verilmiştir. Bölüm 2.5'de belirtildiği şekilde hesaplanan kapsül verimleri %22 ile %36 arasında değişmektedir.

Çizelge 3.1: Kapsül veriminin kaplama materyali miktar ve oranları ile değişimi.

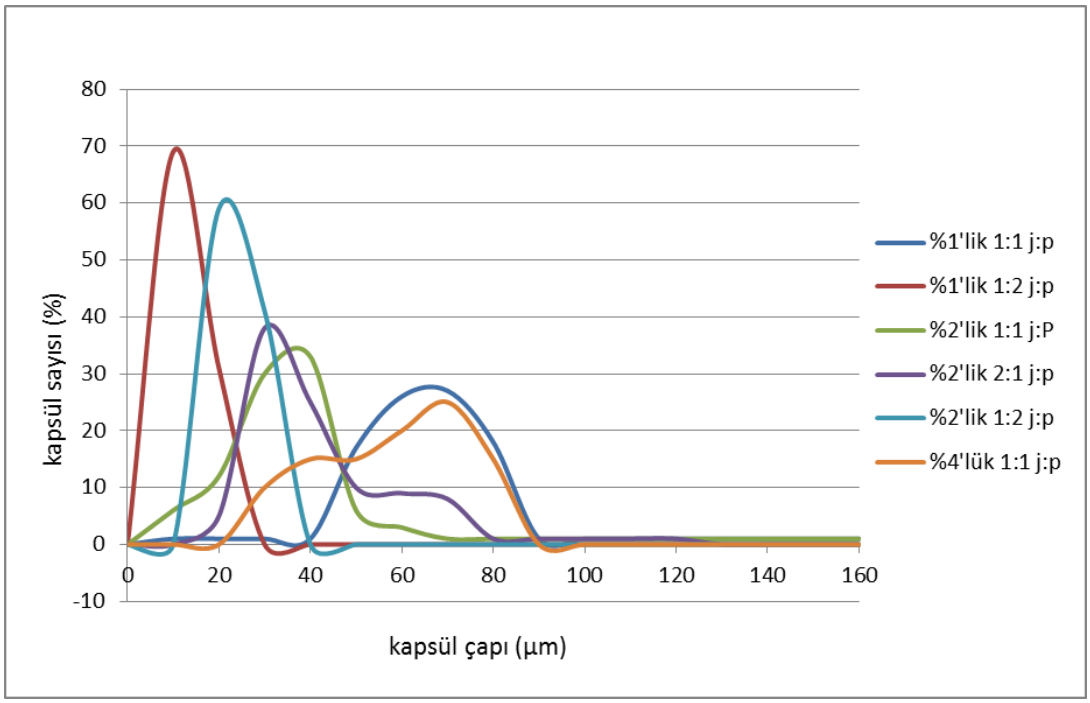
Toplam katı miktarı (w/v)	J:p	Kapsül verimi (%)
%1'lik	1:1	30,45±11,52
	1:2	22,43±0,52
	2:1	-
%2'lik	1:1	33,78±0,35
	1:2	26,28±0,49
	2:1	35,90±4,43
%4'lük	1:1	34,87±3,11
	1:2	-
	2:1	-

%1 w/v, 2:1 (j:p), %4 w/v, 1:2 (j:p) ve 2:1 (j:p) oranlarında duvar malzemesi içeren 3 örnekte kapsül oluşumu görülmemiştir. En yüksek kapsül verimi yaklaşık %36 ile %2 w/v, 2:1 (j:p) ve %35 ile %4 w/v, 1:1 (j:p) kaplama oranlarında görülmüştür. Çizelge 3.1'de belirtilen verim değerleri, optik mikroskop altındaki görüntüler incelenerek değerlendirildiğinde, verim yüksek görünse bile düzgün koaservat

eldesinin her zaman mümkün olmadığını göstermiştir (Şekil 3.1). Yüksek verimli olarak tespit edilmiş bazı örneklerde az sayıda kapsül oluşumu görülürken (Şekil 3.1a), bazılarında kapsül oluşumu tam olarak gerçekleşmemiş (Şekil 3.1b), bazı örneklerin ise kapsül çaplarında yüksek oranda değişkenlik görülmüştür (Şekil 3.1c). Bu nedenle, değerlendirme yapılırken optik mikroskop altındaki görüntüler verim değerleriyle beraber dikkate alınmıştır. Şekil 3.2'de farklı kaplama materyali miktar ve oranlarında elde edilen kapsüllerin boyut analizi yapılmıştır. En fazla kapsül oluşumunun görüldüğü, dar boyut dağılımı gösteren ve düzgün çeperli kapsüllerin oluştuğu oranın duvar materyali olarak seçilmesinin uygun olduğuna karar verilmiştir.

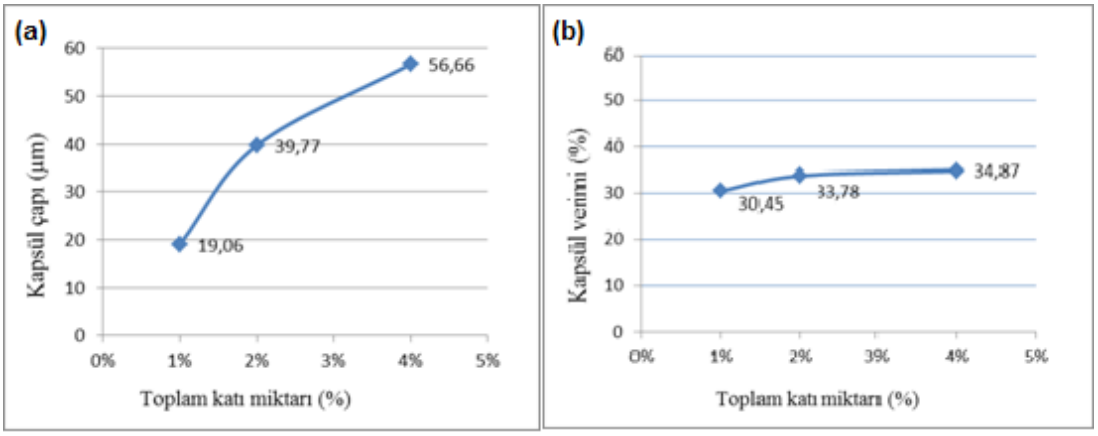


Şekil 3.1: (a) %2 w/v, 1:1 (j:p); (b) %1 w/v, 1:2 (j:p); (c) %2 w/v 2:1 (j:p) oranında kaplama malzemesi içeren kapsüllerin optik mikroskoptaki görüntüsü (×40 zoom).



Şekil 3.2: Kaplama materyali miktar ve oranları ile kapsül çaplarında meydana gelen değişim.

Hesaplanan verim değerleri, şekilde gösterilen dağılım ile birlikte değerlendirildiğinde kapsül oluşumu gözlenen %2'lik 1:1 ve 2:1 j:p oranlarında oluşturulan kapsüllerin verimleri, diğer örneklere oranla daha yüksek gözükmekle birlikte, kapsül çapı dağılımının geniş bir aralıkta değiştiği görülmüştür. En düzgün dağılım %1'lik 1:2 j:p ve %2'lik 1:2 j:p oranlarına sahip iki örnekte görülmüştür. Bu iki örnekten, verimi yüksek olan kaplama materyali olarak seçilmiştir.



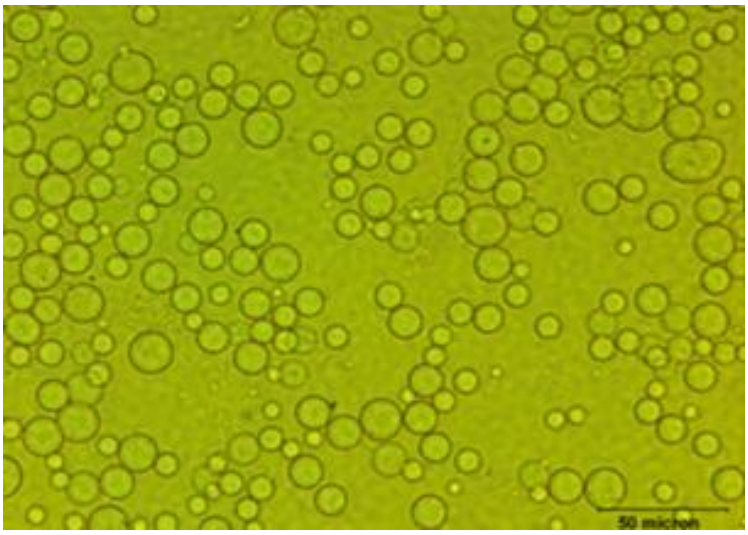
Şekil 3.3: (a) Kapsül çapı ve (b) koaservat veriminin toplam katı miktarı ile değişimi.

Karışımdaki toplam katı miktarı arttıkça buna bağlı olarak oluşan kapsüllerin çapı da artmaktadır. Şekil 3.3a ve 3.3b'de artan kaplama materyali miktarı ile kapsül çapı ve veriminde meydana gelen değişiklik gösterilmiştir. Şekilde (1:1) (jelatin:pektin)

oranında elde edilen değerler kullanılmıştır. %0,5 jelatin konsantrasyonunda oluşturulan kapsüllerin çapı 19,06 µm iken %2 jelatin konsantrasyonunda oluşturulan kapsüllerin çapı 56,66 µm olarak ölçülmüştür. Karışımdaki jelatin miktarının artması sonucu ortaya çıkan yüksek viskozite, karıştırma hızına karşı gösterilen direncin artmasına sebep olduğu için oluşan kapsül çapları da artmaktadır. Annan ve diğ.(2007); Bifidobacterium lactis Bb-12'nin yağ içinde su emülsiyonu kullanılarak yapılan enkapsülasyonunda kaplama materyali olarak jelatini kullanmışlar ve %10 jelatin konsantrasyonunda (300 bloom) kapsül çapı 59,7 µm olarak ölçülmüş iken jelatin konsantrasyonu %19 olduğunda kapsül çapı 96,9 µm olarak ölçülmüştür.

Jun-xia ve diğ.(2011) çalışmalarında, portakal yağının kompleks koaservasyon yöntemi ile enkapsülasyonunda duvar materyali olarak soya fasulyesi protein izolatı ve gam arabik kullanmışlardır. Farklı kaplama materyali oranlarında (2:5, 4:5, 1:1, 7:5, 9:5 w/v) hesaplanan koaservat veriminin yaklaşık %26 ile %39 arasında değişmekte olduğu görülmüştür.

En düzgün çeperli, dar boyut dağılımı olan ve çok sayıda kapsül oluşumu %2 w/v, 1:2 (j:p) oranında görülmüştür ve bu örneğin verimi yaklaşık %26 olarak hesaplanmıştır. Şekil 3.4'de %2 w/v, 1:2 (j:p) oranında hazırlanan boş mikrokapsüller görülmektedir.



Şekil 3.4: %2 w/v, 1:2 (j:p)'lik boş mikroküreler (×40 zoom).

3.2. Genipin ile Çapraz Bağlanma Derecesi

Çapraz bağlayıcı olarak genipin tercih edilmesinin en önemli sebebi, gluteraldehitin aksine toksik olmaması ve doğal kaynaklardan elde edilmiş olmasıdır.

Yuan ve diğ.(2007); 1 mM genipin konsantrasyonunda 8 saatlik süre çapraz bağlanmış kitozan mikroküre lerinin çapraz bağlanma derecesini yaklaşık %33-34 olarak bulmuşlardır. Ayrıca, muamele süresi arttıkça çapraz bağlanma derecesinde önemli bir artış olmadığını gözlemlemişlerdir.

Genipin ile çapraz bağlanan kapsüllerin mavimsi bir renge dönüştüğü görülmektedir. Artan genipin konsantrasyonu ve süre ile rengin koyulaştığı görülmektedir. Mavimsi renk, genipin ile çapraz bağlanan moleküllerde bulunan çift bağlar sebebiyle oluşmaktadır (Yuan ve diğ., 2007).



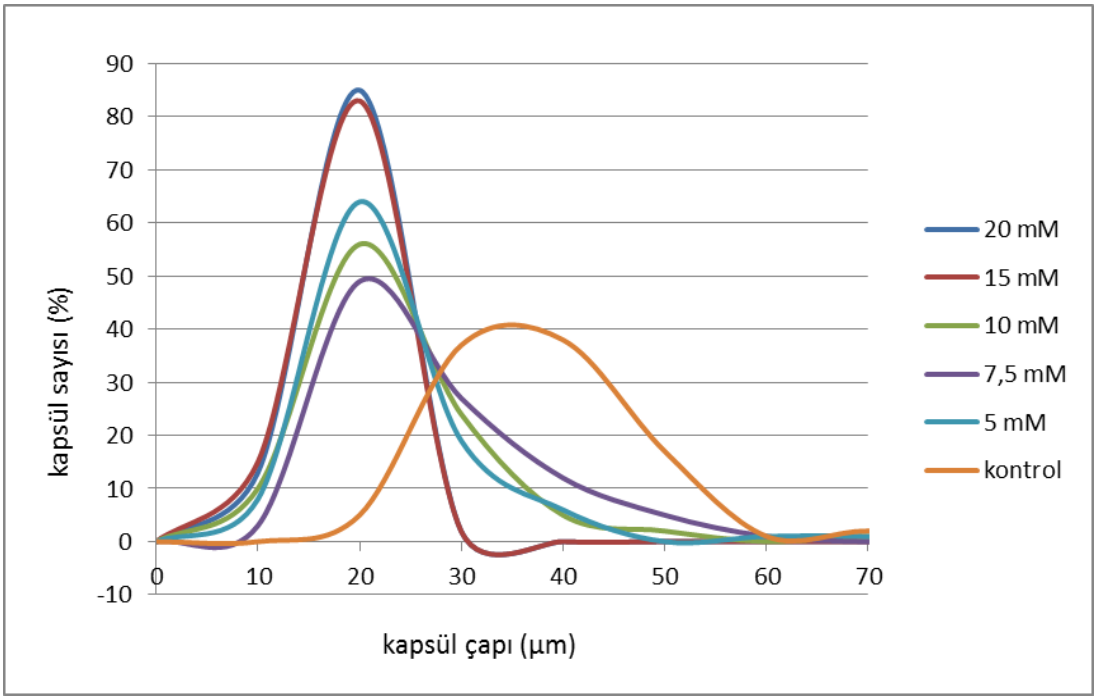
Şekil 3.5: 30 mM genipin ile farklı sürelerde çapraz bağlanan mikrokapsüller.

Aynı genipin konsantrasyonunda süre arttıkça çapraz bağlanma derecesi de artmaktadır. Şekil 3.5'de görüldüğü gibi süre arttıkça oluşan mavi rengin yoğunluğu da artmaktadır. Renkte meydana gelen bu değişim kapsüllerin çapraz bağlandığını göstermektedir.

Yuan ve diğ.(2007) yapmış olduğu çalışmada kitozan ile oluşturulan mikroküre lerin çapraz bağlanma derecesi üzerine süre ve konsantrasyonun etkisini incelemek için, aynı sürede farklı genipin konsantrasyonları (0,5, 1 ve 2 mM) ve 0,5 mM genipin konsantrasyonunda farklı süreler (4, 8 ve 16 saat) denemişlerdir. 0,5 mM konsantrasyonda 4 ve 8 saat süre muamele edilen örneklerde artan süre ile çapraz bağlanma derecesinde artış gözlenmiştir.

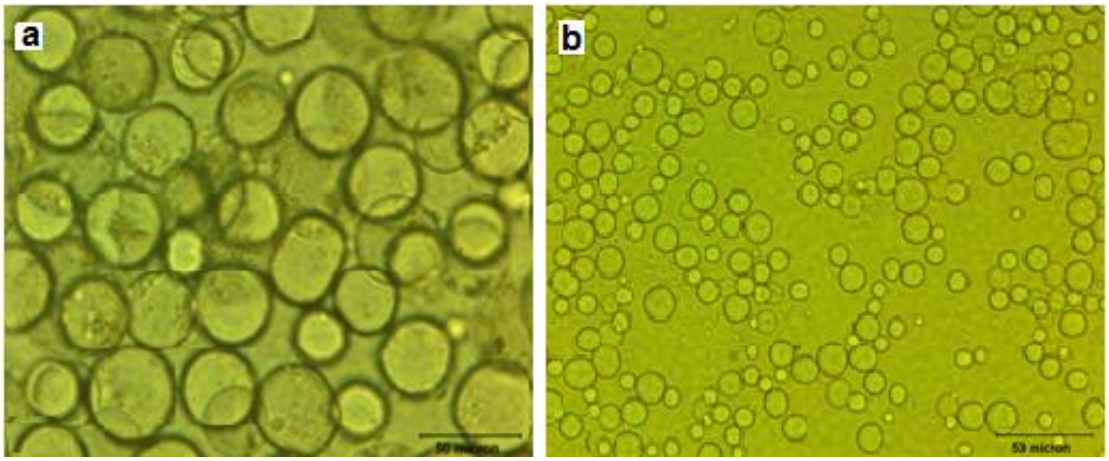
3.3. Genipin Varlığının Kapsül Boyutuna Etkisi

Genipin konsantrasyonu arttıkça, jelatin mikroküre lerinin su alarak şişmesi, çözünmesi ve ıslanabilirliği azalmaktadır. Böylece, kapsüllerin şeklinde ve boyutunda gözlemlenen değişiklikler daha düşük seviyelerde olmaktadır (Muzarelli, 2009). Koaservasyon ile elde edilen mikrokapsüllerin farklı konsantrasyonlarda genipin ile çapraz bağlanması sonucu su alarak şişmesi kontrol edilmiştir. Şekil 3.6'da 20, 15, 10, 7,5, ve 5 mM genipin konsantrasyonunda 24 saat muamele edilen kapsüllerin liyofilizasyon sonrası sulu ortamda sahip oldukları çaplar verilmiştir. Şekil 3.7'de ise genipin ile muamele edilmeyen kapsüllerin ve 20 mM genipin ile çapraz bağlanan örneklerin optik mikroskop görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.6: Genipin ile çapraz bağlanan kapsüllerin boyut dağılımı.

Yapılan analizler sonucunda elde edilen verilere göre; 5, 7,5, 10, 15 ve 20 mM genipin konsantrasyonu ile muamele edilen kapsüllerin sulu ortamda sahip oldukları çapların, genipin ile muamele edilmeyen kapsüllere oranla daha dar bir aralıkta değiştiği ve genipin konsantrasyonunun artması ile kapsül çaplarında meydana gelen değişimin daha düşük seviyelerde olduğu görülmüştür.

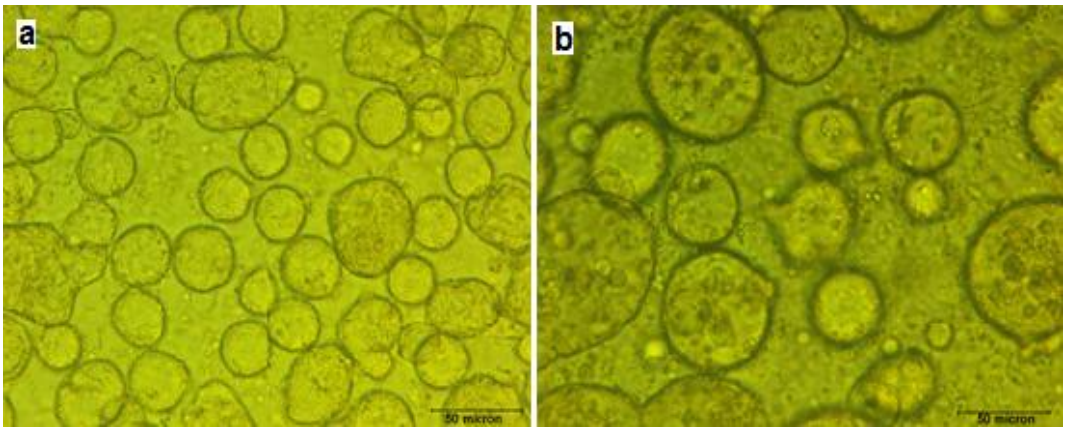


Şekil 3.7: (a) Genipinsiz (b) 20 mM genipin ile muamele edilen kapsüllerin liyofilizasyon sonrası sulu ortamda optik mikroskoptaki görüntüsü (×40 zoom).

Annan ve diğ.(2007); *Bifidobacterium lactis* Bb-12'nin enkapsülasyonunda yağ içinde su emülsiyonu tekniğini kullanarak oluşturdukları jelatin mikrokapsüllerini farklı konsantrasyondaki (0-10 mM) genipin ile çapraz bağlamışlar ve genipin konsantrasyonunun artması ile kapsül çaplarında önemli bir değişiklik olmadığını, ancak artan genipin konsantrasyonu ile mide asitliğine direncin arttığını rapor etmişlerdir.

3.4. *L.acidophilus* LA5 ve *S.cerevisiae* CEN PK 113-7D İçeren Mikrokapsüllerin Boyutları

Mikroorganizma kullanılmadan gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında tespit edilen %2 w/v, 1:2 (j:p)'lik oran *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D içeren mikrokapsüllerin oluşturulmasında kullanılmıştır. Mikroorganizmanın enkapsülasyonunun beklendiği gibi oluşan mikroküre boyutlarını etkilediği görülmüştür (Şekil 3.8a ve 3.8b). Şekil 3.4'de görünen aynı koşullarda hazırlanmış mikrokürelerle karşılaştırıldıklarında boyutların *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D içeren mikrokapsüllerde sırasıyla %28 ve %70 oranında artış görülmüştür.



Şekil 3.8: (a) *L.acidophilus* LA5 ve (b) *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D içeren mikrokapsüllerin optik mikroskoptaki görüntüsü (×40 zoom).

3.5. Enkapsülasyon İşleminin *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D 'nın Canlılık Korunumuna Etkisinin İncelenmesi

Başlangıç mikroorganizma sayısı, enkapsülasyon işlemi sonunda *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D için sırasıyla 1,04 ve 1,95 log birim azalma göstermiştir. Enkapsülasyon verimi ortalama *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D için sırasıyla %90,70 ve %81,31 olarak bulunmuş olup bu sonuç, enkapsülasyon prosesinde ilave edilen bakterilerin %90,70 ve %81,31 oranında canlılığını koruyarak, geri alınabildiklerini göstermiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2: Koaservasyon işlemi boyunca *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nın canlı kalma oranı.

Mikroorganizmalar	Mikroorganizma sayısı (log_{10}(kob/g)		Enkapsülasyon verimi (%)
	Başlangıç	Kapsüllenmiş	
L.acidophilus LA5	11,21±0,41	10,17±0,54	90,70±1,61
S. cerevisiae CEN PK 113-7D	10,41±0,04	8,46±0,01	81,31±0,26

Ortalama değer±standart sapma, (n=2).

Mokarram ve diğ.(2009) yapmış oldukları çalışmada *L. acidophilus* PTCC1643 ve *L. rhamnosus* PTCC1637' un enkapsülasyonunda emülsiyon yöntemini kullanarak kapsül oluşturmuşlardır. Oluşturulan bu kapsüllerin içine hapsedilen başlangıçtaki bakteri sayısı 9,04-10,2 (log kob mL^{-1}) iken enkapsülasyon işleminden sonra bakteri sayısı 9,02-10,1 (log kob g^{-1} kapsül) olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda enkapsülasyon işleminde yaklaşık %99,8 oranında başarı sağlandığı rapor edilmiştir.

Ding ve Shah (2009) kalsiyum aljinat ile emülsiyon yöntemi kullanılarak oluşturulan kapsüllerin içinde probiyotik bakterileri hapsetmişler ve homojenizasyon işleminin

kapsül çaplarına olan etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla 8 farklı probiyotik türü kullanmışlar ve bu bakterilerden biri olan *L. acidophilus*'un enkapsülasyon verimi yaklaşık %84,84 olarak bulunmuştur.

Xing ve diğ.(2004) yapmış oldukları çalışmada kapsaisinin kompleks koaservasyon ile enkapsülasyonunda kaplama materyali olarak jelatin ve akasya gamı kullanmışlar ve elde edilen sonuçlara göre enkapsülasyon verimini yaklaşık %88,21 olarak bulmuşlardır.

3.6. Liyofilizasyon İşleminin Enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in Canlılık Korunumuna Etkisi

Kapsüller, daha uzun raf ömrü ve kullanım kolaylığı sebebiyle liyofilizasyon yöntemi kullanılarak kurutulmuştur. Krayoprotektan olarak %10'luk yağsız süt tozu kullanılmıştır. Enkapsüle ve serbest *L.acidophilus* LA5'in liyofilizasyon sonrası sırasıyla, 2,16 ve 3,67 log birim azalma gösterdiği görülmüştür (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3: Liyofilizasyon işleminin *L. acidophilus* LA5'in canlılığına etkisi.

Mikroorganizma	**Mikroorganizma sayısı (log_{10}(kob/g)**	
	Liyofilizasyon Öncesi	**Liyofilizasyon Sonrası**
Serbest *L. acidophilus* LA5	11,62±0,02	7,95±0,02
Enkapsüle *L. acidophilus* LA5	10,69±0,13	8,53±0,04

Ortalama değer±standart sapma, (n=2).

Liyofilizasyon yöntemi, suyun süblimasyon ile uzaklaştırılması sebebiyle canlı hücrelerde sıcaklığın sebep olduğu hasarı minimuma indirerek, probiyotik mikroorganizmalar gibi hassas biyoaktif materyallerin korunmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Ancak bu, bütün organizmalar için aynı ölçüde canlılık korunumu sağlamamakta, hücre membranındaki farklılıklar sebebiyle *Lactobacillus* cinsi bakteriler liyofilizasyon boyunca *Bifidobacterium* cinsi bakterilere oranla işlemden olumsuz olarak etkilenmektedir. Canlılık korunumundaki bu farklılık krayoprotektan varlığında dahi görülmektedir. Capela ve diğ.(2006) yapmış oldukları çalışmanın sonuçlarına göre krayoprotektan olarak Unipectin™ RS 150 kullanımı *B. longum* üzerinde %80 canlılık korunumu sağlarken *Lactobacillus* türleri üzerinde bu oran %30 civarında kalmaktadır. Heidebach ve diğ.(2010) tarafından yapılan çalışmada, *Lactobacillus* F19 ve *Bifidobacterium* Bb12 ile yağ içinde su emulsiyonu kullanılarak yapılan enkapsülasyon sonrası liyofilize edilen kapsüller

karşılaştırıldığında *Lactobacillus* F19'un *Bifidobacterium* Bb12'ye kıyasla daha düşük oranda canlılık gösterdiği belirtilmiştir.

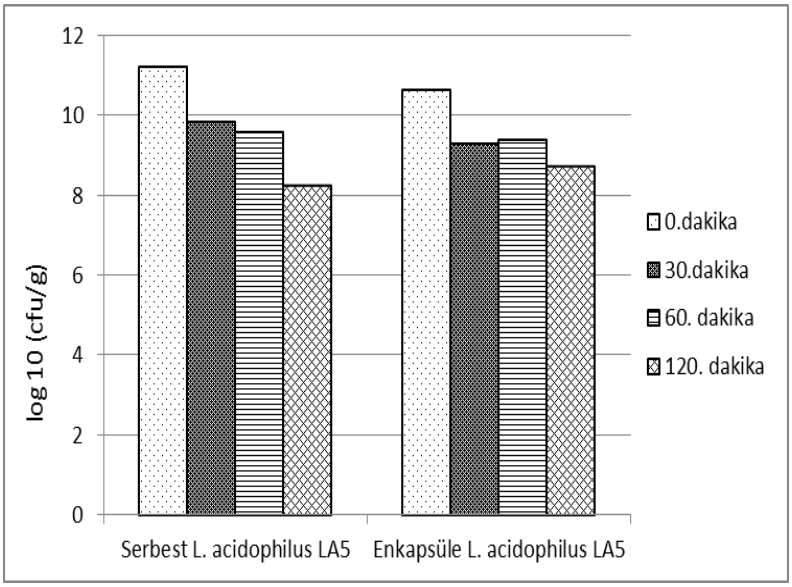
3.7. Enkapsüle *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nın Simüle Edilmiş Mide Özsuyunda Canlılık Korunumunun İncelenmesi

Probiyotik ürünlerde karşılaşılan en önemli problem mikroorganizmaların mide asitliğinde canlılıklarını koruyamamasıdır. Elde edilen sonuçlara göre, SGF içinde serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in sayısı 120 dakika inkübasyon sonunda sırasıyla 3,02 ve 1,93 log birim azalma gösterirken, *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D serbest ve enkapsüle olanlarda sırasıyla 1,23 ve 1,17 log birim azalma göstermiştir (Çizelge 3.4 ve 3.5). Şekil 3.9'da *L. acidophilus* LA5'in sayısında görülen azalma inkübasyon süresinin artması ile birlikte artış göstermiştir. Şekil 3.10'da görüldüğü gibi başlangıç *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D sayısı SGF içinde 30 dakika inkübasyon sonunda görülen azalma ile kıyaslandığında, inkübasyon süresinin artması ile önemli bir değişiklik göstermemiştir.

Çizelge 3.4: SGF içinde serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in canlılık korunumu.

Mikroorganizma	**Mikroorganizma sayısı (log_{10}(kob/g)**			
	0.dakika	**30.dakika**	**60. dakika**	**120. dakika**
Serbest *L. acidophilus* LA5	$11,22\pm0,58^{a}$	$9,87\pm0,86^{b}$	$9,59\pm0,33^{b}$	$8,20\pm0,14^{c}$
Enkapsüle *L. acidophilus* LA5	$10,53\pm0,24^{x}$	$9,17\pm0,01^{y}$	$9,28\pm0,12^{y}$	$8,60\pm0,38^{z}$

Ortalama değer±standart sapma, (n=2).
Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar biribirinden farklıdır ($p<0,05$).

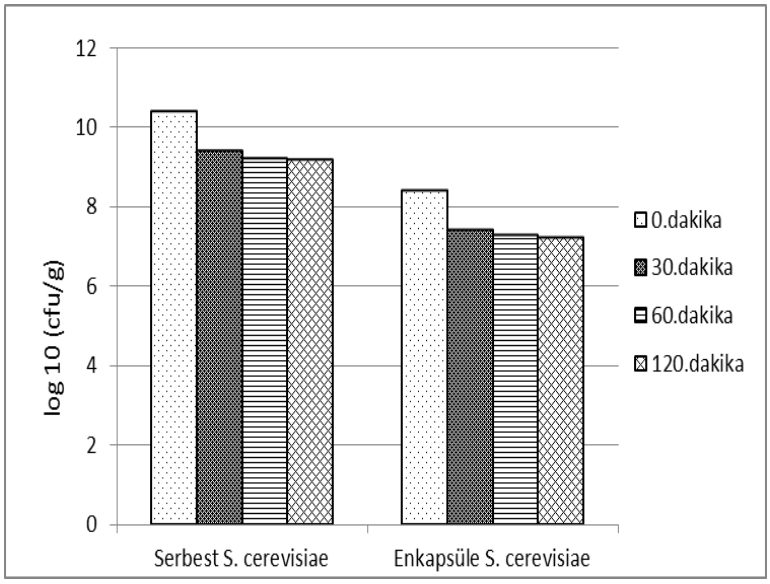


Şekil 3.9: SGF'nin serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in canlılığına etkisi.

Çizelge 3.5: SGF içinde serbest ve enkapsüle *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nin canlılık korunumu.

Mikroorganizma	Mikroorganizma sayısı (log_{10}(kob/g)			
	0.dakika	**30.dakika**	**60. dakika**	**120. dakika**
Serbest *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D	$10,41\pm0,05^{a}$	$9,39\pm0,22^{b}$	$9,21\pm0,05^{b}$	$9,18\pm0,03^{b}$
Enkapsüle *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D	$8,41\pm0,05^{x}$	$7,43\pm0,09^{y}$	$7,29\pm0,21^{y}$	$7,24\pm0,11^{y}$

Ortalama değer±standart sapma, (n=2).
Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar biribirinden farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 3.10: SGF'nin serbest ve enkapsüle *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nin canlılığına etkisi.

Liong ve Shah,(2005) yapmış oldukları çalışmada, serbest *L. acidophilus* ATCC 4962 pH 2'de 2 saat inkübasyon sonunda dahi canlılığını $>10^{7}$ kob/mL düzeyinde koruduğu görülmüştür.

Sabikhi ve diğ.(2010) emülsiyon yöntemi ile kaplama malzemesi olarak sodyum aljinat ve nişasta kullanmışlar ve *L. acidophilus* LA1'i enkaspüle etmişlerdir. Kapsüllerin mide asitliğine dayanıklılığını gözlemlemek için pH'ı 1,0, 1,5 ve 2,0'ye ayarlanmış çözeltilerde kapsülleri 1, 2 ve 3 saat inkübe ederek sonuçları değerlendirmişlerdir. pH 2'de serbest *L.acidophilus* LA1'in başlangıca göre canlılığında 5,67 log birim azalma görülürken enkapsüle *L.acidophilus* LA1'de 2,30 log birim azalma görülmüştür. Elde edilen bu veriler doğrultusunda, pH'ın düşmesi ve inkübasyon süresinin artması ile canlılıkta da azalma görüldüğü rapor edilmiştir.

Oliviera ve diğ.(2007) kompleks koaservasyon yöntemini kullanarak *L. acidophilus* (LAC 4)'ü enkapsüle etmiş ve "Spouted-bed drying" yöntemi ile kapsülleri kurutmuşlar ve kapsüllerin farklı pH'lara (1,0, 3,0 ve 7,0) direncini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, serbest *L. acidophilus* (LAC 4) pH 1'de 3 log birim azalma ve pH 3'de 1 log birim azalma göstermiştir. Enkapsüle *L. acidophilus* (LAC4) ise pH 3'de 2,7 log birim azalma ve pH 1'de canlılığını tamamen kaybettiği görülmüştür. Enkaspüle *L. acidophilus*'un daha az canlılık göstermesi, bakterilerin kurutma aşamasında zarar görmelerinden dolayı asit koşullarına oldukça hassas hale gelmeleri şeklinde açıklanmıştır. Aynı şekilde; *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium spp*. enkapsülasyonunda kaplama materyali olarak aljinat ve nişasta kullanımı ile elde edilen kapsüllerin mide asitliğine ve safra tuzlarına karşı direnç göstermedikleri görülmüştür (Sultana ve diğ., 2000).

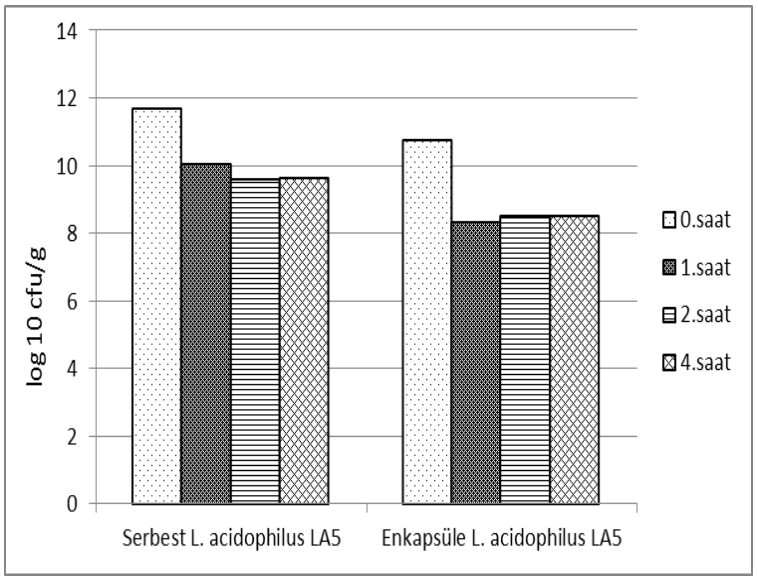
3.8. Enkapsüle L. acidophilus LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nın Simüle Edilmiş Bağırsak Sıvısında Canlılık Korunumunun İncelenmesi

SIF ile muamele edilen serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in canlılığında 4 saat sonunda sırasıyla 2,06 ve 2,24 log birim azalma görülürken, *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nin canlılığında 4 saat sonunda serbest ve enkapsüle olanlarda sırasıyla 1,08 ve 0,95 log birim azalma görülmüştür (Çizelge 3.6 ve 3.7). Şekil 3.11 ve 3.12'de görüldüğü gibi *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nın başlangıç sayısı SIF içinde 1 saat inkübasyon sonunda görülen azalma ile kıyaslandığında, inkübasyon süresinin artması ile önemli bir değişiklik göstermemiştir.

Çizelge 3.6: SIF içinde serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in canlılık korunumu.

Mikroorganizma	**Mikroorganizma sayısı (log_{10}(kob/g)**			
	0.saat	**1.saat**	**2.saat**	**4.saat**
Serbest *L. acidophilus* LA5	$11,70\pm0,01^{a}$	$10,03\pm0,16^{b}$	$9,60\pm0,38^{b}$	$9,64\pm0,06^{b}$
Enkapsüle *L. acidophilus* LA5	$10,75\pm0,28^{x}$	$8,33\pm0,25^{y}$	$8,52\pm0,07^{y}$	$8,51\pm0,24^{y}$

Ortalama değer±standart sapma, (n=2).
Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar biribirinden farklıdır ($p<0,05$'den küçüktür).

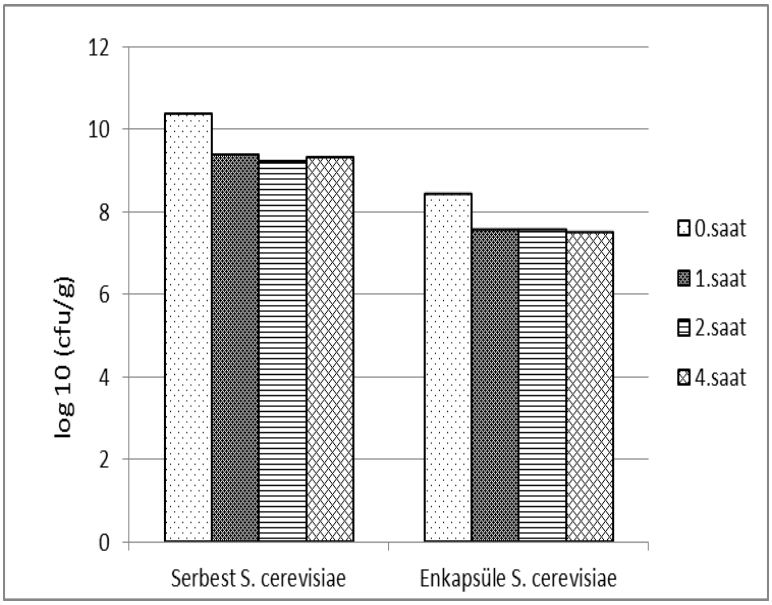


Şekil 3.11: SIF'ın serbest ve enkapsüle *L. acidophilus* LA5'in canlılığına etkisi.

Çizelge 3.7: SIF içinde serbest ve enkapsüle *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nın canlılık korunumu.

Mikroorganizma	**Mikroorganizma sayısı (log_{10}(kob/g)**			
	0.saat	**1.saat**	**2.saat**	**4.saat**
Serbest *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D	$10,41\pm0,04^{a}$	$9,41\pm0,05^{b}$	$9,26\pm0,05^{b}$	$9,33\pm0,09^{b}$
Enkapsüle *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D	$8,46\pm0,01^{x}$	$7,58\pm0,05^{y}$	$7,59\pm0,04^{y}$	$7,51\pm0,01^{y}$

Ortalama değer±standart sapma, (n=2).
Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar biribirinden farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 3.12: SIF'ın serbest ve enkapsüle *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D'nın canlılığına etkisi.

İn-vitro koşullarda yapılan bazı araştırmalar sonucunda *S. boulardii'* nin sıcaklığa, asidik pH'ya ve %0,3'lük safra tuzu konsantrasyonuna karşı dirençli oldukları görülmüştür (Fietto ve diğ., 2004; Kühle ve diğ., 2005).

Sabikhi ve diğ.(2010) emülsiyon yöntemi ile kaplama malzemesi olarak sodyum aljinat ve nişasta kullanmışlar ve *L. acidophilus* LA1'i enkaspüle etmişlerdir. Kapsüllerin safra tuzlarına karşı dayanıklılığını gözlemlemek için % 1, 1,5 ve 2 konsantrasyonlarında hazırlanan safra tuzu çözeltisinde 30 dakikadan 3 saate kadar inkübe ederek sonuçları değerlendirmişlerdir. %2'lik safra tuzu konsantrasyonunda 3 saatin sonunda başlangıçtaki *L.acidophilus* LA1'in sayısında serbest ve enkapsüle halde olmak üzere sırasıyla 5,47 ve 2,16 log birim azalma olduğu görülmüştür. Sürenin ve safra tuzu konsantrasyonunun artması ile *L. acidophilus* LA1'in canlılığında azalma görülmüştür.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gıda endüstrisinde kullanılan mikroorganizmaların, olumsuz çevresel koşullara karşı, canlılıklarının korunumu amacıyla literatürde en yaygın kullanılan uygulamalar; mikroenkapsülasyon ve liyofilizasyondur. Liyofilizasyon, donmuş örnekte, vakum altında, suyun süblimasyon yolu ile uzaklaştırılması ilkesine dayanmakta ve mikroorganizmalar üzerinde zararlı etkisi oldukça düşük bir kurutma yöntemi olarak bilinmektedir. Enkapsülasyon tekniğinin amacı ise, mikroorganizmaların etrafında 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. Başarılı bir uygulama ile, mikroorganizmaların üründe neden olabilecekleri bozulmalar önlenmekte, mikroorganizmalar depolama süresince canlılıklarını en yüksek seviyede koruyabilmektedirler.

Bu tez çalışması kapsamında; gıda endüstrisi açısından iki önemli mikroorganizma (*L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 117-3D) yeni bir uygulama olarak kabul edilen kompleks koaservasyon yöntemi kullanılarak enkapsüle edilmiştir. Elde edilen mikrokapsüllerin mide asitliğine ve safra tuzlarına direnci incelenmiştir. Ayrıca doğal bir çapraz bağlayıcı olarak gıda endüstrisinde kullanılmaya başlanan genipin ile çapraz bağlanan mikrokapsüllerin sıvı ortamda şişme aktivitesi incelenmiş ve çapraz bağlanması sonucu meydana gelen renk değişimi gözlenmiştir.

Genipin ile çapraz bağlanan kapsüllerin liyofilizasyon sonrası sıvı ortamda şişmesi artan genipin konsantrasyonu ile birlikte azalmaktadır. Bu durum, kapsüllerin çapraz bağlandığını ve genipinin jelatin-pektin kapsüllerini çapraz bağlamada uygun bir çapraz bağlayıcı ajan olduğunu göstermektedir. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan genipinin, gıda endüstrisinde boyar madde olarak kullanım alanı bulmasından dolayı son ürünün renginde özellikle süt ve ürünleri gibi açık renkli formülasyonlarda, renk değişimlerine sebep olacağı dikkate alınmalıdır.

Tez çalışması sonucunda, kompleks koaservasyon yönteminin ve kullanılan kaplama materyallerinin *L. acidophilus* LA5 ve *S. cerevisiae* CEN PK 113-7D enkapsüle

edilmesinde uygun olduğu, ancak farklı ortam koşullarında stabilitenin düşük olduğu gözlenmiştir.

Yapılacak çalışmalarda, kapsüllerin genipin gibi doğal kaynaklı çapraz bağlayıcılar kullanarak çapraz bağlanması ile mikroorganizmaların stabilitelerinin araştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir. Bu kapsamda gıda işleme ve muhafazası sırasında karşılaşılabilecek stres koşullarına karşı mikroorganizmaların dirençlerinin araştırılması da üzerinde durulması gereken önemli hususlar olarak göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca, çapraz bağlama ürün yapım ve depolama aşamalarında canlılığın korunmasını arttırmalı, fakat mikrokapsüllerin bağırsakta çözünerek içeriklerini salmasını engelleyici bir nitelik taşımamalıdır. Bunun için gerekli olan, en uygun çapraz bağlama derecesinin araştırılması da önemlidir.

KAYNAKLAR

Annan, N. T., Borza, A., Moreau, D. L., Allan-Wojtas, P. M. and Hansen, L. T. (2007). Effect of process variables on particle size and viability of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in genipin-gelatin microspheres, Journal of Microencapsulation, **24**(2): 152–162.

Antonov, Y. A., Lashko, N. P., Glotova, Y. K., Malovikova, A., and Markovich, O. (1996). Effect of the structural features of pectins and alginates on their thermodynamic compatibility with gelatin in aqueous media, Food Hydrocoll. **10**(1):1.

Avonts, L., Uytven, E. V., Vuyst, L. D. (2004). Cell growth and bacteriocin production ofprobiotic Lactobacillus strains in different media, International Dairy Journal **14**: 947–955.

Aytuna, H., Köksoy, A. ve Aran, N. (2003). Süt ve süt ürünlerinde probiyotik bakterilerin canlılıklarının korunumu. Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu 22-23 Mayıs, İzmir, Sf. 375-380.

Bigi, A., Cojazzib, G., Panzavoltaa, S., Roveria, N. and Rubinia K. (2002). Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. Biomaterials, **23**: 4827–4832.

Brinques, G.B., and Ayub, M. A. Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yoghurt. Journal of Food Engineering, **103**: 123-128.

Browlie, K. (2007). Marketting perspective of encapsulation technologies in food applications, in "Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems". JM Lakkis (Ed.), Blackwell Published, UK.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. and Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. Journal of Food Engineering, **104**: 467–483.

Capela, P., Hay, T. K. C. and Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International **39**: 203–211.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C., Marzo, F. and Villarán, M. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. International Journal of Food Microbiology, **142**: 185-189.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D. and Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. Journal of Controlled Release **162**: 56–67.

Çakar, Z. P., Tamerler, C., Sezgin, T. ve Alkım, C. (2010). Yönlendirilmiş evrim yolu ile *Saccharomyces cerevisiae* mayasına birden fazla endüstriyel strese karşı direnç kazandırılması ve direnç mekanizmasının moleküler düzeyde karakterizasyonu, Proje No: 105T314 (Kariyer Projesi).

Çakır, İ. ve Çakmakçı, M. L. (2002). Probiyotik teknolojisi ve Türkiye'deki durumu, Türkiye 7. Gıda Kongresi. Ankara Üniversitesi Basımevi, Sf. 179-186.

Çakır, İ. ve Çakmakçı, M. L. (2004). Probiyotikler: tanımı, etki mekanizması, seçim ve güvenilirlik kriterleri. Gıda Dergisi, Sayı 29 (6): 427-434.

Ding, W. K. and Shah, N. P. (2009). An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. Journal of Food Science, **74**: M53-M61.

Doherty, S. B., Gee, V. L., Ross, R. P., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. and Brodkorb, A. (2010). Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. Journal of Microbiological Methods, **80**: 231–241.

Dumitriu, S. (2002). Polysaccharides as Biomaterials in "Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded". (Ed. Dumitriu S.) Marcel Dekker Inc., eBook ISBN: 978-0-203-90467-1.

Duongthingoc, D., George, P.,Gorczyca, E. and Kasapis, S. (2013). Studies on the viability of *Saccharomyces boulardii* within microcapsules in relation to the thermomechanical properties of whey protein, Food Hydrocolloids, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.024.

Endress, H. U. and Mattes, F. (2009). Fiber Ingredients in "Food Applications and Health Benefits". (Ed. Cho S. S. ve Samuel P.) CRC Press, eBook ISBN: 978-1-4200-4385-3.

Elzoghby, A. O., El-Fotoh, W. S. A. and Elgindy, N. A. (2011). Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. Journal of Controlled Release, **153**: 206-216.

Favaro-Trindade, C. S., Heinemann R. J. B. and Pedroso D. L. (2011). Developments in probiotic encapsulation. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 6, No. 004.

Fietto, J. L. R., Araújo, R. S., Valadão, F. N., Fietto, L. G., Brandão, R. L., Neves, M. J. (2004). Molecular and physiological comparisons between Saccharomyces cerevisiae and *Saccharomyces boulardii*. Canadian Journal of Microbiology, **50:** 615-621.

Figueroa-Gonzalez, I., Quijano, G., Ram´ırez G. And Cruz-Guerrero, A. (2011). Probiotics and prebiotics – perspectives and challenges, Wiley Online Library, (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.4367

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. and Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food

ingredients: An overview. Food Research International, **40:** 1107-1121.

GMIA(2013). Gelatin Handbook. Alındığı Tarih: 18.04.2013, adres: http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA_Gelatin_Manual_2012.pdf

Gonzales-Sanchez, F., Azaola, A., Gutierrez-Lopez, G., Hernandez-Sanchez, H. (2010). Viability of microencapsulated Bifidobacterium animalis ssp. lactis BB12 in kefir during refrigerated storage. International Journal of Dairy Technology, **63**: 431-436.

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

Gökmen, S., **Palamutoğlu, R. ve Sarıçoban, C.** (2012). Gıda endüstrisinde enkapsülasyon uygulamaları. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, **7**(1): 36-50.

Gürgün, V. ve Halkman, A. K. (1990). Standarda Dayalı Sayım Yöntemleri. Alındığı Tarih: 29.04.2013, adres: http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/DosyaGoster.aspx?DIL=1&BELGEANAH=2919&DOSYAISIM=110030300.pdf

Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin Y. L. and Paulson A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiology, **19**: 35-45.

Hattingh, A. L. and Viljoen, B. C. (2001). Yoghurt as probiotic carrier food. International Dairy Journal, **11**: 1-17.

Heidebach, T., Forst, P. and Kulozik, U. (2010). Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. Journal of Food Engineering, **98**: 309-316.

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

Jagannath, A., Raju, P.S. and Bawa, A.S. (2010). Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. LWT - Food Science and Technology, **43**: 1197-1203.

Johnson E. A. and Echavarri-Erasun C. (2011). Yeast Biotechnology in "PART | II Importance of Yeasts" Elsevier B.V.

Jun-xia, X., Hai-yan, Y. and Jian, Y. (2011). Microencapsulation of Sweet Orange Oil By Complex Coacervation With Soybean Protein Isolate/Gum Arabic, Food Chemistry, **125**: 1267-1272.

Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. Curr. Issues Intest. Microbiology, **3**; 39-48.

Katz, F. (2001). Active cultures add function to yogurt and other foods. Food Technology, **55**: 46-49.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H.(2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal, **13**: 3–13.

Kruif, C. G., Weinbreck, F. and Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. Current Opinion in Colloid & Interface Science, **9**: 340-349.

Koç, M., Sakin, M. ve Ertekin, F. (2010). Mikroenkapsülasyon ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, **16**(1): 77-86.

Kundakçı, A., ve Ergönül, B. (2006). Probiyotik Gıda Nedir? Ne Degildir? Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.

Kühle A. V. A., Skovgaard, K. and Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. International Journal of Food Microbiology, **101**: 29-39.

Lau, T. T., Wang, C. and Wang, D. A. (2010). Cell delivery with genipin crosslinked gelatin microspheres in hydrogel/microcarrier composite. Composites Science and Technology; **70**: 1909–1914.

Leclercq, S., Harlander, K. R. and Reineccius, G. A. (2009). Formation and characterization of microcapsules by complex coacervation with liquid or solid aroma cores. Flavour and Fragrance Journal, **24**; 17-24.

Lee, Y. K. (2009). Handbook of probiotics 2nd ed. Hoboken, N.J. John Wiley & Sons. pp. 441–443. ISBN 978-0-470-13544-0 0470135441.

McClements, D. J. (2010). Design of Nano-Laminated Coatings to Control Bioavailability of Lipophilic Food Components. Journal of Food Science, **75**; 30-42.

Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Habibi Najafi, M. B., Shahidi, F. (2009). The İnfluence of Multi Stage Alginate Coating on Survivability of Potential Probiotic Bacteria In Simulated Gastric And İntestinal Juice, Food Research International, **42**: 1040-1045.

Patricia Munoz P., Bouza, E., Cuenca-Estrella, M., Eiros, J. M., Pe´ rez, J. M., Sanchez-Somolinos, M., Rincon C., Hortal, J. and Pelaez T. (2005). Saccharomyces cerevisiae Fungemia: An Emerging Infectious Disease, Clinical Infectious Diseases, **40**:1625–34.

Murga M. L. F., Valdez, G. F., and Disalvo A. E. (2000). Changes in the Surface Potential of Lactobacillus acidophilus under Freeze–Thawing Stress, Cryobiology **41**: 10-16.

Nag, A. (2011). Development of a microencapsulation technique for probiotic bavteria *Lactobacillus casei* 431 using a protein-polysaccharide complex. Masters of Technology in Food Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Nag, A., Han, K. S. and Singh, H. (2011). Microencapsulation of probiotic bacteria using pH induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. International Dairy Journal, **21**: 247-253.

Nazzaro, F., Fratianni, F, Coppola, R, Sada, A. and Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. Journal of Functional Foods, **1**: 319-323.

Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F. and Coppola, R. (2011). Microencapsulation in food science and biotechnology, Current Opinion in Biotechnology, **23**: 1–5.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. and Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications, Procedia Food Science, **1**: 1806-1815.

Nori, M. P., Favaro-Trindade, C. S., Matias de Alencar, S., Thomazini, M., De Camargo Balieiro, J. C. and Contreras Castillo, C. J. (2011). Microencapsulation of Propolis Extract By Complex Coacervation, LWT - Food Science and Technology, **44**: 429-435.

Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, L. A. P., Freitas, O., and Favaro-Trindade, C. S. (2007). Microencapsulation of B. lactis (BI 01) and L. Acidophilus (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying, Drying Technology, **25**: 1687–1693.

Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, J. C., Freitas, O. and Favaro-Trindade C. S. (2007). Stability of Microencapsulated B. Lactis (BI 01) And L. Acidophilus (LAC 4) By Complex Coacervation Followed By Spray Drying, Journal of Microencapsulation, **24**(7): 673-681.

Park, J. K. and Chang, H. N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. Biotechnology Advances, **18**: 303–319.

Posteraro, B., Sanguinetti, M., Romano, L., Torelli, R., Novarese, L. and Fadda, G. (2005). Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of Saccharomyces cerevisiae. International Journal of Food Microbiology **103**: 295-304.

Robinson, R.K., Batt, C.A. and Patel, P. (2000). Encyclopedia of Food Microbiology, UK: Academic Press.

Rodrigues, R., Rocha-Santos, T., Sousa, S., Gomes, A. M, Pintado, M., Malcata, X., Lobo, J. M. S., Silva, J., Costa, P., Amaral, M. H. and Freitas, A. C. (2011). On the viability of five probiotic strains when immobilised on various polymers. International Journal of Dairy Technology, **64**: 137-144.

Rokka, S. and Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Challenges for industrial applications, European Food Research Technology **231**: 1–12.

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

Rossi, F. and Torriani, S. (2010). Saccharomyces in "Molecular Detection of Foodborne Pathogens", Taylor and Francis Group (Ed. Dongyou Liu) CRC Press, eBook ISBN: 978-1-4398-1241-9

Saarela, M., Mogensen, G., Fonde´n, R., Matto, J. and Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology **84**; 197–215.

Sabikhi, L., Babu, R., Thompkinson, D. K. and Kapila, S. (2010). Resistance of Microencapsulated Lactobacillus acidophilus LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. Food Bioprocess Technology, **3**: 586-593.

Sağdıç, O., Küçüköner, E. ve Özçelik, S. (2004). Probiyotik ve prebiyotiklerin fonksiyonel özellikleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, **35**(3-4): 221-228.

Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J. and Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lactobacillus casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, Food Research International, **43**: 111-117.

Saravanan, M. and Rao, K., P. (2010). Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. Carbohydrate Polymers, **80**: 808-816.

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.

Simmering, R. and Blaut, M. (2001). Pro- and prebiotics- the tasty guardian angels. Applied Microbiology and Biotechnology, **55**: 19-28.

Singer, N. S. and Dunn, J. M. (1990). Protein microencapsulation-The principle and the process. Journal of The American College of Nutrition, **9**(4): 388-397.

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

Sun, W. and Griffiths, M. W. (2000). Survival of Bifidobacteria in yogurt and stimulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. International Food Microbiology, **61**: 17-25.

Sung, H. W., Liang, I. L., Chen, C. N., Huang, R. N. and Liang, H. F. (2000). Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). National Science Council of Taiwan, Republic of China, 538-546.

Thies, C. (2008). Microencapsulation of Flavors by Complex Coacervation, in "Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems" (Ed. Lakkis JM.), Blackwell Published UK.

Ünal, E. ve Erginkaya, Z. (2010). Probiyotik Mikroorganizmaların Mikroenkapsülasyonu, Gıda Dergisi, **35(**4): 297-304

Xing, F., Cheng, G., Yang, B. and Ma, L. (2004). Microencapsulation of capsaicin by the complex coacervation of gelatin, acacia and tannins. Journal of Applied Polymer Science, **91**(4): 2669-2675.

Yao, C. H., Liu, B. S., Chang, C. J., Hsu, S. H. and Chen, Y. S. (2004). Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. Materials Chemistry and Physics, **83**: 204-208.

Yoo, J. S., Kim, Y. J., Kim, S. H. and Choi, S. H. (2011). Study on Genipin: A New Alternative Natural Crosslinking Agent for Fixing Heterograft Tissue. Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, **44** (3): 197–207.

Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Utturkar, G., Haggard, W. O., Yang, Y., Ong, J. L. and Bumgardner, J. D. (2007). The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. Carbohydrate Polymers, **68**: 561-567.

EKLER

EK 1: Kimyasal ve mikrobiyolojik sarf malzemeleri
EK 2: Ekipmanlar

EK 1

***L. acidophilus* LA5:** Peyma-Chr. Hansen Peynir Mayaları A.Ş. (İstanbul)

***S.* cerevisiae CEN PK 117-3D:** İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Jelatin: SİGMA, Gelatin from bovine skin, Type B-225 bloom strenght

MRS Broth: LAB094

Pepton: LAB MC024

Litmus milk: Fluka Analytical 17158

Agar: Acumedia

Gliserol: Sigma-Aldrich Chemicals

Genipin: Wako Chemicals

Hidroklorik Asit, Sodyum Hidroksit: Merck Chemicals

Sodyum Klorür: Sigma-Aldrich Chemicals

Potasyum Klorür: Sigma-Aldrich Chemicals

Kalsiyum klorür: Sigma-Aldrich Chemicals

Sodyum bikarbonat: Sigma-Aldrich Chemicals

Pepsin: Sigma-Aldrich Chemicals, 1:10.000 From porcine stomach mucosa

Bile bovine: MERCK Chemicals

EK 2

Santrifüj cihazı	:Beckman Coulter Allegra 25R Centrifuge
Optik mikroskop	:Olympus BX60, Nikon
Manyetik karıştırıcı	:Dragon-Med, M-10008
Mikropipetler	:Eppendorf AG, 2500 µL, 1000 µL, 100 µL
Tartı	:Precisa, XB220A
Freeze-Drier	:Christ Alpha 1-2 LD Plus
Derin dondurucu	:Arçelik, 1061 M Buzdolabı
Otoklav	:Tuttnauer Systec 3870 ELVC
Spektrofotometre	:Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer
pH metre	:Inolab, 720
Çalkalayıcı	:Heidolph, Duomaxx 1030
Su banyosu	:Huber, Compatible Control CC1
Distile su cihazı	:Elga Labwater, USF Elga UHQ-PS-MH

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Zehra GÜLSÜNOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi: Kartal - 04.08.1987

Adres:İ.T.Ü. Kimya-Metalurji Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Maslak/İstanbul

E-Posta: gulsunoglu@itu.edu.tr

Lisans: Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği

Yayın ve Patent Listesi:

1. Gülsünoğlu Z., Yaman-Keskin Ö. and Şahin-Yeşilçubuk N., 2012. *Çevresel Bir Kontaminant: Dioksin ve Dioksin Benzeri Bilesiklerin İnsan Sağlığına Etkileri*, 11. Gıda Kongresi, Hatay, Türkiye, 10-12 Ekim.
2. Yaman-Keskin Ö. and Gulsunoglu Z., 2012. *Quality Management Systems in Dairy Industry.* International Conference on Industrial Engineering and Operations Management (IEOM), Istanbul, Turkey, July 3-6.