

**BAZI PROBİYOTİK BAKTERİLERİN
MİKROENKAPSÜLASYONU VE MEYVE SUYUNDA
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

**MICROENCAPSULATION OF SOME PROBIOTIC
BACTERIA AND INVESTIGATION OF THEIR USE IN
FRUIT JUICE**

SENA ÇAKIR

DOÇ. DR. REMZİYE YILMAZ
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

BAZI PROBİYOTİK BAKTERİLERİN MİKROENKAPSÜLASYONU VE MEYVE SUYUNDA KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Sena ÇAKIR

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Remziye YILMAZ

Ocak 2021, 102 sayfa

Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine pek çok olumlu etkisi bulunmaktadır. Bu etkilerin insanda gözlenebilmesi için her gün düzenli olarak belirli miktarda probiyotik tüketilmesi gerekmektedir. Bu nedenle probiyotik gıdaların varlığı büyük önem taşımaktadır. Bu gıdaların üretiminden itibaren tüketilene kadar geçen depolama süresinde canlı probiyotik mikroorganizma sayısının en az 1.0×10^6 kob/g olacak şekilde korunması gerekmektedir. Ortam koşullarına oldukça duyarlı olan probiyotik mikroorganizmaların bu süreç içerisinde canlılıklarının korunması sağlıklı gıda trendinin farkında olan gıda endüstrisinde aşılması gereken zorluklardan biridir. Enkapsülasyon yöntemi probiyotiklerin dış ortam koşullarından korunmasında etkili bir yöntemdir. Ayrıca, bu organizmaların mikroenkapsülasyonu ile sindirim sistemi koşullarından belirli oranda korunmaları sağlanarak bağırsağa ulaşan canlı probiyotik sayısının yüksek tutulması da mümkündür.

Bu tez çalışmasında, bazı probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiş olup, elde edilen mikrokapsüllerin %100 portakal suyu ve %100 elmaşeftali suyunda kullanımı araştırılmıştır. Bu kapsamda, probiyotik özelliği olan *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) ve *Escherichia*

coli Nissle (EcN) suşlarının farklı polimerlerle mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mikrokapsüller daha sonra meyve suyuna ekleneceği için asit toleransı yüksek olan ksantan gam-jellan gam (XG-GG) ve sodyum aljinat-selüloz asetat fitalat (ALG-CAP) polimer karışımları tercih edilmiştir. Buna ek olarak, prebiyotiklerin probiyotik canlılığının korunmasına etkisinin gözlenmesi amacıyla polimer karışımlarına inülin (INU) de eklenerek (XG-GG-INU; ALG-CAP-INU) simbiyotik mikroenkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Probiyotik bakterilerin emülsiyon metodu ile mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiş olup, enkapsülasyon verimleri hesaplanmış ve elde edilen mikrokapsüllerin morfolojik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, enkapsülasyon işleminin probiyotik canlılığına etkisi sindirim sistemi simülasyonu ile belirlenmiştir. Bu aşamanın sonucunda elde edilen veriler ve meyve sularının özellikleri göz önünde bulundurularak, meyve suyuna eklenmek için en uygun mikrokapsüller seçilmiştir. Probiyotik mikrokapsülleri meyve suyuna eklenmiş ve örnekler 35 gün boyunca 4 °C’de depolanmıştır. Depolama süresince meyve suyu örneklerinde bulunan probiyotik canlılıklarındaki değişim belirlenmiştir. Ayrıca, elde edilen probiyotik meyve suyu örneklerinin kalite analizleri ve duyu analizi gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, emülsiyon yöntemiyle %80’in üzerinde verim ile enkapsülasyon gerçekleştirilmiş olup, elde edilen kapsüllerin mikron boyutunda ve düzensiz biçimde olduğu belirlenmiştir. Enkapsülasyon işleminin, probiyotiklerin sindirim sistemi koşullarından korunmasında etkili bir yöntem olduğu belirlenmiş; enkapsülasyonda kullanılan polimer konsantrasyonunun artması ile probiyotiklerin canlılığının olumlu yönde etkilendiği gözlenmiştir. LGG içeren meyve suyu örneklerinde 35 günlük depolama süresince canlılığın korunduğu gözlenirken, EcN içeren meyve suyu örneklerinde 35. günde belirlenen canlı mikroorganizma sayısı 10^6 kob/mL’nin altında kalmıştır. 35. günün sonunda EcN mikrokapsülü ve simbiyotik mikrokapsülü içeren örneklerdeki canlı probiyotik sayısının, serbest formda EcN içeren örneklerdekinden daha yüksek olduğunun belirlenmesi, enkapsülasyon işleminin yalnızca sindirim sistemi simülasyonunda değil, aynı zamanda meyve suyu örneklerinin depolanmasında da probiyotiklerin olumsuz ortam koşullarından korunmasını sağladığını göstermektedir. Depolama süresince meyve suyu örneklerinde kalite kriterleri açısından önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu çalışma ile LGG ve EcN mikrokapsüllerinin meyve suyu örneklerinde kullanım olanakları ortaya konmuştur. Probiyotik meyve suyu üretimi için

özellikle duyusal analiz sonuçlarının geliştirilmesine dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu çalışma ile sağlıklı/fonksiyonel gıdaya artan tüketici talebinin ardından yurt dışı pazarında yerini alan probiyotik meyve sularının ülkemizde de üretilebileceği ve yakın gelecekte pazarda yerini alacağı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik bakteriler, *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG, *Escherichia coli* Nissle, EcN, Mikroenkapsülasyon, Simbiyotik mikroenkapsülasyon, Emülsiyon metodu, Taramalı Elektron Mikroskobu, Sindirim sistemi simülasyonu, Probiyotik meyve suyu.

ABSTRACT

MICROENCAPSULATION OF SOME PROBIOTIC BACTERIA AND INVESTIGATION OF THEIR USE IN FRUIT JUICE

Sena ÇAKIR

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Remziye YILMAZ

January 2021, 102 pages

Probiotic microorganisms have many positive effects on human health. In order for these effects to be observed in humans, a certain amount of probiotics should be consumed regularly everyday. Therefore, the presence of probiotic foods is crucial. During the storage period of these foods, the number of viable probiotic microorganisms should be preserved to be at least 1.0×10^6 cfu/g. Preserving the viability of probiotic microorganisms, which are very sensitive to environmental conditions, is one of the challenges to be overcome by food industry, which is aware of the healthy food trend. Encapsulation is an effective method to protect probiotics from harsh environmental conditions during storage. In addition, by microencapsulation technology it is possible to keep the number of viable probiotic cells reaching the intestine high by protecting them from the gastrointestinal conditions.

In this thesis, microencapsulation of some probiotic microorganisms was carried out and the use of these probiotic microcapsules in 100% orange juice and 100% apple-peach juice was investigated. In this context, microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) and *Escherichia coli* Nissle (EcN) strains with different polymers was held. Since the obtained microcapsules will be added

to the fruit juice, polymer mixtures with high acid tolerance such as, xanthan gum-gellan gum (XG-GG) and sodium alginate-cellulose acetate phthalate (ALG-CAP) were preferred. In addition, synbiotic microencapsulation was performed by adding inulin (INU) to polymer mixtures (XG-GG-INU; ALG-CAP-INU) in order to observe the effect of prebiotics on preservation of probiotic viability. Microencapsulation of probiotic bacteria was performed by emulsion method, encapsulation efficiencies were calculated and morphological characterization of the microcapsules was performed. Then, the effect of the encapsulation process on viability of probiotics was determined in simulated gastrointestinal conditions. To decide the most suitable microcapsules to be added in fruit juice, the properties of fruit juices and the results from gastrointestinal simulation are both considered. Probiotic microcapsules were added to the fruit juice and samples were stored at 4 °C for 35 days. Changes in probiotic viability in fruit juice samples were determined during storage. In addition, quality analyzes and sensory analysis of the probiotic fruit juice samples were performed.

As a result, the encapsulation was carried out with a yield of over 80% with the emulsion method, with the capsules that are micron-sized and in irregular shape. It has been determined that the encapsulation process is an effective method to protect probiotics from simulated gastrointestinal conditions and the viability of probiotics was positively affected by the increase in polymer concentration used in encapsulation. While the number of viable cells were above 10^6 cfu/mL in all fruit juice samples containing LGG during the 35 days of storage; the number of viable microorganisms determined on the 35th day in fruit juice samples containing EcN remained below 10^6 cfu/mL. The determination of viability of probiotics in samples containing EcN microcapsules and EcN synbiotic microcapsules at the end of the 35th day was higher than in samples containing EcN in free form, shows that the encapsulation process not only provides a protection from simulated gastrointestinal conditions, but also protects the probiotics from severe environmental conditions during the storage of fruit juice samples. No significant change was observed in terms of quality of fruit juice samples during storage. In this study, the possibilities of using LGG and EcN microcapsules in fruit juice samples were revealed. For probiotic fruit juice production, the focus should be on improving sensory properties. With this study, it can be said that probiotic fruit juices, which take their place in the foreign market after the increasing consumer demand for

healthy/functional food, can be produced in our country and will take place in the market in the near future.

Keywords: Probiotic bacteria, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG, *Escherichia coli* Nissle, EcN, Microencapsulation, Synbiotic microencapsulation, Emulsion method, Scanning Electron Microscope, Simulated gastrointestinal system, Probiotic fruit juice.

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimin son döneminden beri geniş vizyonuyla ufkumu açan, gıda biyoteknolojisi alanına yönelmemde bana ilham kaynağı olan, tecrübe ve bilgilerinden ziyadesiyle faydalandığım, tez çalışmam boyunca karşılaştığım sorunlarda yol gösteren, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, yalnızca akademik anlamda değil, fikir ve düşünce bazında da görüşleri benim için oldukça kıymetli olan, öğrencisi olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Remziye YILMAZ'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca paylaştığı bilgi ve tecrübesiyle birlikte, sağladığı manevi destekten dolayı Uz. Meltem YILDIRIM'a, teknik desteklerinden dolayı Uz. Yelda ZENCİR'e,

Çalışmalarım boyunca manevi desteklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan gurur duyduğum FoodOmics laboratuvarı üyesi sevgili arkadaşlarım Begüm Zeynep HANÇERLİOĞULLARI, Ayşegül Bilge UĞUZ, Elif Bircan MUYANLI ve Yeşim TAŞKIN'a,

Akademik hayatım boyunca önerileriyle yolumu aydınlatan, farklı bakış açıları sayesinde doğru kararlar almamda büyük emeği olan, her koşulda beni yüreklendiren ve iyi işler yapmam için motivasyonumu artıran, desteğini her zaman yanımda hissettiğim canım teyzeciğim Esra Müjgan KARATAŞ'a,

Hayatım boyunca beni her koşulda desteklediklerini ve destekleyeceklerini bildiğim, aldığım hiçbir karardan şüphe etmeyerek bana güvenen, yüksek lisans eğitimim boyunca, özellikle de Covid-19 pandemisi döneminde deneylerimin aksamaması için yaptıkları fedakarlıkları asla unutamayacağım, bu günlere gelmemde ve bu dereceyi almamda en büyük emekleri olan, bir ferdi olduğum için her gün şükrettiğim sevgili ailem; canım anneciğim Şükran ÇAKIR'a, canım babacığim Hüseyin ÇAKIR'a ve canım kardeşim Betül ÇAKIR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı ve 1002-219O033 numaralı proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Sena ÇAKIR

Ocak 2021, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Probiyotikler.....	6
2.1.1. Tanımı ve Genel Özellikleri	6
2.1.2. Probiyotik Bakterilerin Çalışma Mekanizması	7
2.1.3. Simbiyotik: Probiyotik ve Prebiyotik Kombinasyonunun Olumlu Etkileri	7
2.1.4. <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG ve <i>Escherichia coli</i> Nissle Bakterilerinin Özellikleri.....	8
2.2. Enkapsülasyon.....	9
2.2.1. Tanımı ve Hedefi.....	9
2.2.2. Enkapsülasyon Yöntemleri	10
2.2.2.1. Emülsiyon Yöntemi.....	11
2.2.2.2. Ekstrüzyon Yöntemi.....	12
2.2.2.3. Sprey Kurutma	12
2.3. Enkapsülasyonda Kullanılan Polimerler	13
2.3.1. Sodyum Aljinat	13
2.3.2. Selüloz Asetat Fitalat	14
2.3.3. Ksantan Gam	14
2.3.4. Jellan Gam.....	15
2.3.5. Prebiyotikler	15
2.3.5.1. İnülin	15

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Probiyotik Mikroorganizma Suşları	19
3.1.2. Besiyerleri ve Polimerler	19
3.1.3. Kimyasallar	19
3.1.4. Ticari Meyve Suları	20
3.1.5. Ekipmanlar	20
3.1.6. Sarf Malzemeleri.....	21
3.2. Metot.....	22
3.2.1. Probiyotik Mikroorganizma Suşlarının Canlandırılması ve Stok Kültür Eldesi	22
3.2.2. Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması	22
3.2.3. Probiyotik Bakteri Çözeltisinin Hazırlanması	24
3.2.4. Probiyotiklerin Mikroenkapsülasyonu.....	24
3.2.5. Probiyotiklerin Simbiyotik Mikroenkapsülasyonu.....	26
3.2.6. Mikrokapsüllerdeki Probiyotik Canlılığının Belirlenmesi ve Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması.....	27
3.2.6.1. Probiyotiklerin Mikrokapsüllerden Salınımı	27
3.2.6.2. Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması	27
3.2.7. SEM Analizi ile Mikrokapsüllerin Morfolojik Karakterizasyonu.....	28
3.2.8. Sindirim Sistemi Simülasyonu ile Mikrokapsüllerdeki Probiyotik Canlılığının <i>in vitro</i> Koşullarda Değerlendirilmesi	29
3.2.8.1. Simüle Sindirim Sistemi Sıvılarının Hazırlanması.....	29
3.2.8.2. Sindirim Sistemi Simülasyonu	30
3.2.9. Meyve Suyu Analizleri	31
3.2.9.1. Probiyotik Meyve Suyu Numunelerinin Hazırlanması.....	31
3.2.9.2. Meyve Suyunun Depolanması Sırasında Probiyotik Canlılıklarının Belirlenmesi	32
3.2.10. Probiyotik Meyve Suyunda Kalite Analizleri.....	33
3.2.10.1. pH Analizi.....	33
3.2.10.2. Meyve Suyunda Titrasyon Asitliği	33
3.2.10.3. Renk Analizi	33
3.2.10.4. Suda Çözünür Kuru Madde Miktarı Tayini.....	34

3.2.11. Duyusal Analizler.....	34
3.2.12. İstatistiksel Analiz	34
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Probiyotik Mikroorganizma Suşlarının Canlandırılması ve Stok Kültür Eldesi..	36
4.2. Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması	38
4.3. Probiyotik Bakteri Çözeltilerinin Hazırlanması	40
4.4. Probiyotiklerin Mikroenkapsülasyonu	40
4.5. Mikroenkapsüllerdeki Probiyotik Canlılığının Belirlenmesi ve Enkapsülasyon Verimi.....	42
4.6. SEM Analizi ile Mikroenkapsüllerin Morfolojik Karakterizasyonu	45
4.7. Sindirim Sistemi Simülasyonu ile Mikroenkapsüllerdeki Probiyotik Canlılığının <i>in vitro</i> Koşullarda Değerlendirilmesi	53
4.7.1. Simüle Sindirim Sistemi Sıvılarının Hazırlanması	53
4.7.2. Sindirim Sistemi Simülasyonu	54
4.8. Meyve Suyu Analizleri.....	61
4.8.1. Meyve Suyunda Kullanılacak Mikroenkapsüllerin Seçimi	61
4.8.2. Meyve Sularının Hazırlanması.....	61
4.8.3. Meyve Suyunun Depolanması Sırasında Probiyotik Canlılıklarının Belirlenmesi.....	63
4.8.4. Probiyotik Meyve Sularında Kalite Analizleri.....	66
4.8.4.1. pH Analizi	67
4.8.4.2. Meyve Suyunda Titrasyon Asitliği	70
4.8.4.3. Renk Analizi.....	72
4.8.4.4. Suda Çözünür Kuru Madde Miktarı Tayini	76
4.8.5. Duyusal Analiz.....	78
5. YORUM.....	84
6. KAYNAKLAR.....	89
ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Probiyotik bakterilerden elde edilen saf kültürlerde ait katı besiyerlerindeki koloni görüntüleri.....	37
Şekil 4.2. Steril polimer çözeltileri.....	40
Şekil 4.3. Probiyotik bakteri çözeltilerinin hazırlanmasında hücre pelletinin eldesi.....	40
Şekil 4.4. Enkapsülasyon aşamaları.....	42
Şekil 4.5. LGG mikrokapsüllerinin ve simbiyotik mikrokapsüllerinin FIB-SEM görüntüleri.....	47
Şekil 4.6. LGG mikrokapsüllerinin ve simbiyotik mikrokapsüllerinin ESEM görüntüleri.....	49
Şekil 4.7. EcN mikrokapsüllerinin ve simbiyotik mikrokapsüllerinin FIB-SEM görüntüleri.....	51
Şekil 4.8. EcN mikrokapsüllerinin ve simbiyotik mikrokapsüllerinin ESEM görüntüleri.....	53
Şekil 4.9. Ticari %100 portakal ve %100 elma-şeftali suyu örnekleri.....	62
Şekil 4.10. Probiyotik %100 portakal ve %100 elma-şeftali sularının hazırlanması.....	63
Şekil 4.11. Portakal suyu örneklerinin depolanması sırasında LGG ve EcN canlılıkları.....	63
Şekil 4.12. Elma-şeftali suyu örneklerinin depolanması sırasında LGG ve EcN canlılıkları.....	64
Şekil 4.13. Portakal suyu örneklerinin depolanma sırasındaki pH değerleri.....	68
Şekil 4.14. Elma-şeftali suyu örneklerinin depolama sırasındaki pH değerleri.....	69
Şekil 4.15. Portakal suyu örneklerinin depolama sırasındaki titrasyon asitliği değerleri (sitrik asit cinsinden).....	71
Şekil 4.16. Elma-şeftali suyu örneklerinin depolanması sırasında titrasyon asitliği değerleri (sitrik asit cinsinden).....	72
Şekil 4.17. Depolanmanın 35. gününde LGG içeren portakal suyu ve elma-şeftali suyu örnekleri.....	73
Şekil 4.18. Portakal suyu örneklerinin depolanması sırasında L* a* b* değerleri.....	74
Şekil 4.19. Elma-şeftali suyu örneklerinin depolanması sırasında L* a* b* değerleri.....	74
Şekil 4.20. Portakal suyu örneklerinin depolama sırasında Briks değerleri.....	76
Şekil 4.21. Elma-şeftali suyu örneklerinin depolama sırasında Briks değerleri.....	77

Şekil 4.22. Duyusal analiz için Dimes İzmir'e gönderilmek üzere laboratuvarımızda hazırlanan meyve suyu numuneleri.	78
Şekil 4.23. Meyve suyu örneklerinin duyusal analizi.	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kodlama sistemi.	22
Çizelge 3.2. Enkapsülasyon matriksindeki polimer bileşeni yüzdeleri (%) (a/h).....	23
Çizelge 3.3. Enkapsülasyon bileşenlerinin oransal ifadesi.	25
Çizelge 3.4. Sindirim sistemi simülasyonunda kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.	29
Çizelge 3.5. Bu çalışmada ticari olarak sağlanan meyve suları ve besin değerleri.	31
Çizelge 4.1. Probiyotik bakterilere ait saf kültürlerinin eldesi.	37
Çizelge 4.2. Enkapsülasyon verimi (%).....	44
Çizelge 4.3. Sindirim sistemi simülasyonunda LGG canlılığının zamana göre değişimi.	55
Çizelge 4.4. Sindirim sistemi simülasyonunda EcN canlılığının zamana göre değişimi.	57
Çizelge 4.5. Portakal ve elma-şeftali suyu örneklerinin depolanmalarının 14. gününde gerçekleştirilen duyu analizi sonuçları.....	80
Çizelge 4.6. Portakal ve elma-şeftali suyu örneklerinin depolanmalarının 35. gününde gerçekleştirilen duyu analizi sonuçları.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

mL	mililitre
µl	mikrolitre
g	gram
a/h	Hacimce ağırlık
h/h	Hacimce çözelti

Kısaltmalar

LGG	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG
ATCC	American Type Culture Collection
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle
MRS	de MAN, ROGOSA and SHARPE
ALG	Sodyum Aljinat
CAP	Selüloz Asetat Fitalat
XG	Ksantan Gam
GG	Jellan Gam
INU	İnülin
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
XG-GG	Ksantan gam – Jellan gam
XG-GG-INU	Ksantan gam – Jellan gam - İnülin
ALG-CAP	Aljinat – Selüloz asetat fitalat
ALG-CAP-INU	Aljinat – Selüloz asetat fitalat – İnülin
O/W	Yağ içinde su emülsiyonu
W/O	Su içinde yağ emülsiyonu

FIB-SEM	Odaklanmış İyon Demeti Taramalı Elektron Mikroskobu
ESEM	Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu
SMS	Simüle mide sıvısı
SBS	Simüle bağırsak sıvısı
kob	Koloni oluşturan birim
SSS	Sindirim Sistemi Simülasyonu
TA	Titrasyon Asitliği
EV	Enkapsülasyon Verimi
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
SÇKM	Suda Çözünür Kuru Madde

1. GİRİŞ

Probiyotikler, 2001 yılında bir FAO/WHO panelinde, yeterli miktarda alındığında konak canlıının sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak belirtilmiştir [1]. İnsan sağlığı üzerinde, bağırsak mikroflorasının düzenlenmesi, patojen bakterilerin gelişmesinin engellenmesi, gıdaların biyoyararlanımının artırılması, allerjenlerin etkisinin azaltılması, immün fonksiyonların desteklenmesi, kolesterolün düşürülmesi, laktoz intoleransının azaltılması ve enfeksiyona karşı direncin artırılması gibi olumlu etkileri bulunan probiyotiklerin [2] bu etkileri gösterebilmesi, bağırsak sıvısına yeterli miktarda canlı hücrenin ulaşmasıyla mümkün olmaktadır.

Ancak yapılan çalışmalarda probiyotiklerin çevre şartlarına ciddi ölçüde duyarlı olduğu ve canlılıklarını büyük oranda kaybettikleri gözlenmiştir. Probiyotiklerin gıda ürünlerinde ve sindirim sisteminde canlılıklarını korumaları üzerine gerçekleştirilen çalışmalara göre; organik asitler, hidrojen iyonları, moleküler oksijen ve antibakteriyel bileşenler gibi hasar verici koşullara maruz kaldığında bu mikroorganizmaların canlılığında ciddi bir düşüş yaşanmaktadır [3]. Probiyotiklerin ortam koşullarına duyarlılığı, bu mikroorganizmaların gıda ürünlerine işlenmesini zorlaştıran bir durumdur. Çünkü gıdada depolandıkları süre içerisinde ortam koşullarından etkilenerek canlılıklarını kaybedebilmektedirler. Enkapsülasyon, probiyotiklerin olumsuz ortam koşullarından etkilenmelerinin önüne geçebilmek için uygulanan bir yöntemdir [4].

Bu tez çalışmasında, probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilerek, gıdaya işlendikten sonraki depolama koşullarına, sindirim sistemindeki pH değişikliklerine ve enzimlere karşı bariyer oluşturularak korunup, canlılıklarını devam ettirmesi amaçlanmıştır.

Tüketiciler, sağlıklı yaşama yöneldikleri ölçüde sağlıklı gıda talep etmektedir. Bu durum, probiyotik gıdalar için artan ilgiyi açıklamaktadır [5,6]. Ticari açıdan probiyotikler için en iyi taşıyıcının fermente süt ürünleri olduğu belirtilmektedir. Gıda piyasasındaki probiyotik ürünlerin büyük çoğunluğunu süt ve süt ürünlerinin oluşturması; intolerans, alerji veya beslenme yönelimleri bakımından süt ve süt ürünlerini tüketmeyi tercih

etmeyen insanların probiyotik özellikteki gıdaları tüketmelerini sınırlandırmaktadır [7]. Bu bakımdan, probiyotik ürün yelpazesinin süt ve süt ürünleri dışındaki ürünleri de kapsayacak şekilde genişletilmesi önem arz etmektedir. Probiyotiklerin meyve sularına eklenmesi, probiyotik süt ürünlerinin formüle edilmesinden daha karmaşıktır. Bu durum, meyve sularında probiyotikler için gereken serbest amino asitlerin eksikliği ve yüksek asitlikten kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak, süte eklenen probiyotiklerin asit ve safra toleransının meyve suyuna eklenen probiyotiklerinkinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Mikroenkapsülasyon, son yıllarda insanların ihtiyaç duyduğu iyi beslenmeden uzun raf ömrüne kadar farklı amaçlar için kullanılabilir. Ayrıca, gıda sanayii tarafından üretilen ürünlerin potansiyelini genişletmek ve ürün portföyünü artırmak için önemli çözüm önerilerinden biri olarak görülmektedir. Mikroenkapsülasyon belirli bileşenlerin salınımını kontrol ederek gıda sanayii için raf ömrünü uzatma, lezzeti ve kaliteyi artırma, tat veya kokuları maskeleyme, fonksiyonel içerik sağlama, bileşen stabilitesi sağlama, içerik etkileşimini önleme, biyoyararlanımını artırma gibi özellikler sağlaması nedeniyle önemlidir. Enkapsülasyon teknolojisi, probiyotik canlılığı için daha uygun olan anaerobik koşulları sağlaması ve meyve suyundaki asidik koşullara karşı bariyer oluşturması bakımından; probiyotiklerin meyve suyundaki canlılıklarının korunmasını sağlayabilmektedir [8]. Meyve suları gibi süt ürünü olmayan ürünler, süt ürünlerine tolerans göstermeyen veya vejetaryen olan tüketiciler için probiyotik yiyecekler üretmeye bir alternatif olarak görülebilir. Bu bağlamda, probiyotik meyve suları, vitamin, antioksidan ve polifenoller gibi insan sağlığına pek çok faydası olan çok miktarda sağlıklı bileşenleri nedeniyle kesinlikle mükemmel alternatif fonksiyonel besinler olarak kabul edilebilir. Ayrıca herhangi bir süt alerjisi içermezler.

Bu çalışmada kullanılan probiyotiklerden biri olan *Lactobacillus rhamnosus* GG DSM33156 (LGG) suşu, 1985 yılında ideal bir probiyotiğin özelliklerini taşıyan bir laktobasil suşu arama çalışmaları sırasında yetişkin insan fekal numunesinden Sherwood Gorbach ve Barry Goldwin tarafından izole edilmiştir. LGG, Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, çubuk şeklinde, hareketli olmayan, Katalaz-negatif bir bakteridir. Probiyotik bakteriler için aranan ideal özellik mide asitliğine ve safraya dayanabilmesi ve

sindirim sistemi kanalında canlı kalıp bağırsağı kolonize edebilmesi olduğundan, bu mikroorganizmaların pH dayanıklılıkları çok önemli bir faktördür. Bu suş, asit ve safraya olan dayanıklılığı, iyi gelişme karakteristiği ve bağırsak epitel dokusuna adhezyonu sebebiyle probiyotik suş olarak belirtilmiştir. LGG, ticari olarak ulaşılabilir nitelikte çeşitli ürünlerde kullanılmıştır. Suşun faydalı etkileri üzerine pek çok klinik deneme ve insanların dahil olduğu çalışma gerçekleştirilmiştir [9].

Çalışmada kullanılan diğer bir probiyotik olan *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) Prof. Dr. Alfred Nissle tarafından Almanya'da 1917 yılında izole edilmiştir. EcN, bir *E. coli* suşu olmasına rağmen güvenli bir probiyotiktir. Bazı patojen mikroorganizmalarının konak canlıya adhezyonunu engeller [10]. EcN, birçok sindirim sistemi ile ilgili hastalıkta; diyare, Crohn hastalığı, iltihaplı bağırsak sendromu; tedavi amacıyla kullanılmaktadır [10,11].

Aljinat, farklı tipteki alglerden ekstrakte edilen bir lineer polisakarittir. Kalsiyum aljinat, probiyotik bakterilerin enkapsülasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Bakteri hücreleri etrafında kolaylıkla matris oluşturabilmesi, tüketiminin güvenli olması, ucuz olması, yüksek sıcaklık uygulaması gerektirmemesi ve bağırsakta tamamen çözünerek hapsediği hücrelerin salınımını sağlaması gibi avantajları vardır. Asit toleransının düşük olması ve asidik ortamda mekanik stabilitesini kaybetmesi bakımından probiyotiklerin ortam koşullarından korunmasında sınırlı etkinlik göstermektedir. Ayrıca, aljinatın oluşturduğu mikroyapıların gözenekli olduğu belirtilmiştir [3]. Aljinatın başka polimerlerle karıştırılmasıyla veya aljinat kapsüllerinin farklı bileşenlerle kaplanmasıyla bu dezavantajların önüne geçilebilmektedir [6]. Selüloz asetat fitalat, ilaçların bağırsakta kontrollü salınımı amacıyla eczacılıkta yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Asidik pH'da (5'den küçük) çözünme özelliği olmayan bu polimer, pH'sı 6'dan büyük olan bazik ortamda çözünür özelliktedir [3]. Aljinat ve selüloz asetat fitalat karışımının kullanıldığı bir probiyotik enkapsülasyonu çalışmasında, konsantrasyonları %0.5 ile %1 (a/h) arasında değişen selüloz asetat fitalat çözeltileri hazırlanmış; konsantrasyonları %2.25 ile %3 (a/h) arasında değişen aljinat çözeltileriyle karıştırılarak enkapsülasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Asidik koşullardaki en iyi sonucu %3 (a/h) aljinat solüsyonu içerisinde %1 (a/h) konsantrasyonunda selüloz asetat fitalat bulunan formülasyonun

verdiği belirtilmiştir [12]. Bu çalışmada, aljinatın asit toleransının artırılması ve mikrokapsüllerin meyve suyundaki stabilizasyonunun sağlanabilmesi amacıyla selüloz asetat fitalat da polimer çözeltisine eklenmiştir.

Ksantan gam ve jellan gam karışımı probiyotik enkapsülasyon çalışmalarında daha önce kullanılmıştır [3,13,14]. Bu karışımın, aljinattan farklı olarak asidik ortam koşullarına dirençli olduğu belirtilmiştir. Kalsiyum iyonları ile stabilizasyonu sağlanabilmektedir [3]. Bir çalışmada, jel oluşturma sıcaklığının düşük tutulabilmesi için düşük konsantrasyonlarda jellan gam ve ksantan gam çözeltilerinin hazırlandığı; hazırlanan %0.5'lik jellan gam çözeltisinden elde edilen kapsüllerin yumuşak ve düzensiz şekilde olduğu, bu çözeltiliye %0.5 ksantan gam çözeltisinin eklenmesiyle kapsül kalitesinin arttığı ve küresel oluşumun sağlandığı belirtilmiştir. Jellan gam, ksantan gam (%0.5-%1) çözeltisiyle karıştırıldığında bile kalsiyum iyonlarının yokluğunda %0.75 konsantrasyonuna kadar oda sıcaklığında jelleşme göstermemektedir. Bu durum, bakteri çözeltisi ile gam çözeltisinin mikroenkapsülasyon işleminden önce kolaylıkla karıştırılabilmesini sağlamaktadır. Çalışmanın sonucunda elde edilen verilere göre, %0.5-%1 aralığındaki jellan gam çözeltisi ile, yine %0.5-%1 aralığındaki ksantan gam çözeltisinin probiyotik kapsüllerinin oluşumu için en iyi konsantrasyonlar olduğu belirtilmiştir [14].

Söz konusu suşların enkapsülasyonu ile elde edilen mikrokapsüllerin meyve suyundaki stabilizasyonunun sağlanması için, enkapsülasyon ajanı olarak asit toleransı yüksek olan polimerler kullanılmıştır. Bu doğrultuda, öncelikle ksantan gam-jellan gam ve aljinat-selüloz asetat fitalat karışımıyla ayrı ayrı enkapsülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mikrokapsüllerin SEM analizi ile morfolojik karakterizasyonları yapılmış ve sindirim sistemi simülasyonunda en stabil ürünü veren polimer konsantrasyonları belirlenmiştir. Buna ek olarak, sonraki adımda, bu polimer kombinasyonlarına bir prebiyotik olan inülinin de eklenmesiyle simbiyotik enkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen simbiyotik mikrokapsüllerin de aynı şekilde SEM analizi ile morfolojik karakterizasyonları yapılmış ve sindirim sistemi simülasyonu deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında ise; elde edilen probiyotik mikrokapsülleri ve serbest formdaki probiyotikler %100 ibareli meyve suyuna ilave

edilmiştir. Hazırlanan meyve suyu numuneleri 35 gün boyunca depolanmış, bu depolama süresinde belirli aralıklarda probiyotik canlılığındaki değişim belirlenmiştir. Ayrıca, probiyotik meyve suyu örneklerinin kalite analizleri gerçekleştirilmiş olup, duyuusal kabul edilebilirliğinin belirlenmesi için duyuusal analizler yapılmıştır.

Türkiye’de 2018 yılında kişi başı tüketim miktarı yaklaşık 10 litre olan [15] ve tümüyle meyveden elde edilen % 100 meyve suları ile birden fazla meyveden oluşan meyve suları için büyüyen bir pazar bulunmaktadır. Meyve suyu sektörünün yeni ve sağlıklı ürünlere olan ihtiyacı nedeni ile küçük çapta mikrokapsül oluşturabilmesi ve gerekli görüldüğünde büyük kütlelerde üretim yapılabilmesine olanak vermesi bakımından, tez çalışması kapsamında emülsiyon yöntemi ile probiyotik bakterilerin enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki aljinat-selüloz asetat fitalat polimerleri ve ksantan gam-jellan gam polimerleriyle farklı enkapsülasyon deneyleri yapılarak, hangi polimer kombinasyonu ile elde edilecek probiyotik mikrokapsüllerin meyve suyuna işlenmesinin daha uygun olacağı çalışma kapsamında tartışılmıştır.

Probiyotik meyve suyu üretimi ulusal ve uluslararası pazarlar için de önemli ekonomik faaliyettir. Bu nedenle, üretilen ve yeni bir ürün olarak meyve suyu sektörünün ilgisini çekecek probiyotik meyve suyu ayrıca sağlıklı gıda arayışında olan tüketici talebini karşılayabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Probiyotikler

2.1.1. Tanımı ve Genel Özellikleri

Probiyotikler, konak canlıının bağırsağında yeterli sayıda bulunduğunda, ürettikleri metabolitler ile konağın sağlığı üzerine olumlu etkiler oluşturan, immün sistemini güçlendiren, patojenlerle rekabet haline girerek adhezyonlarını engelleyen mikroorganizmalardır.

Probiyotik terimi, çoğunluğunu bakterilerin oluşturduğu ve bazı mayaların da dahil olduğu mikroorganizmalar grubunu içermektedir. Laktik asit bakterileri, laktik asit bakterisi olmayan diğer bazı bakteriler ve bazı mayalar probiyotik olarak adlandırılmaktadır.

Laktik asit bakterileri, insan gastrointestinal sisteminde oluşturduğu yararlı etkilerden dolayı bilinen en önemli probiyotiklerdir. Genellikle aerobik olmayan koşullarda yaşayan, bazen aerobik koşullarda da canlılıklarını sürdürebilen, Gram-pozitif bakterilerdir. *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* gibi diğer laktik asit bakterileri, *Escherichia coli* Nissle gibi laktik asit bakterisi olmayan bakteriler ve *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* gibi bazı mayalar probiyotik olarak kabul edilmektedir [6].

Probiyotiklerin etkisi suşa özgüdür [16]. Her probiyotik türü, sağlık üzerine farklı faydaları olan çeşitli suşları kapsamaktadır. Probiyotiklerin faydaları, üretilen asitlere ve/veya bakteriyosinlere, patojenlerle rekabet halinde olmalarına ve immün sistemi kuvvetlendirmelerine bağlanmaktadır [17].

Probiyotiklerin doz seviyesi de yine mevcut suşa bağlı olmakla birlikte, günde 10^6 - 10^7 kob/g alınması yeterli kabul edilmektedir.

Probiyotiklere, gıda ürünleri, kapsül ve tablet gibi çeşitli formlarda ulaşılabilir. Vücuda alınan probiyotiklerin insan bağırsak mikroflorasında olumlu etkilerini gösterebilmesi için gastrointestinal sistemden geçerken maruz kaldığı olumsuz ortamlardan canlı olarak kurtulabilmesi gerekmektedir.

2.1.2. Probiyotik Bakterilerin Çalışma Mekanizması

Probiyotiklerin, immün sistemi kuvvetlendirme, kolesterolü düşürme, laktoz toleransını artırma ve bazı kanser türlerinden koruma gibi etkileri olduğu belirtilmiştir [5]. Probiyotiklerin etkileri 3 kategoride sınıflandırılabilir.

Birincisi, konağın savunma sisteminde yaptığı değişiklik: Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ve bu hastalıklardan korunmada, ayrıca bağırsaktaki inflamasyonların tedavisinde önem taşımaktadır [18]. Probiyotikler; ürettikleri metabolitler, hücre duvarı bileşenleri veya DNA ile immün sistem üzerinde etki gösterirler. Spesifik reseptörlerin varlığından dolayı konak hücreler bu ürünlere karşı hassasiyet göstermektedir [19]. Hedefteki hücreler, genellikle bağırsak epitel hücreleri ve bağırsakla ilişkili bağışıklık hücreleridir. Probiyotikler ile konağın bağışıklık hücreleri arasındaki etkileşimin, sinyal akışını tetikleyerek immün sistemde değişikliğe neden olduğu düşünülmektedir [20].

İkinci mekanizma; patojen ve/veya kommensal olabilecek diğer organizmalar üzerindeki direkt etkiler: Probiyotiklerin patojenler ile rekabet edebilme yetenekleri vardır ve bu şekilde patojenlerin bağırsakta adhezyonunu engelleyebilmektedirler [21].

Son olarak; probiyotiklerin toksinler gibi mikrobiyal ürünleri, konağın ürettiği safra tuzları ve gıda bileşenleri gibi ürünleri etkileme yeteneklerinin var olduğu bildirilmiştir [22].

2.1.3. Simbiyotik: Probiyotik ve Prebiyotik Kombinasyonunun Olumlu Etkileri

Prebiyotikler, yeterli miktarda tüketildiğinde, kolonda sınırlı sayıda bulunan yararlı mikroorganizmaların gelişmesini ve/veya aktivitesini artıran, insanlar tarafından

sindirilemeyen gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır [23]. Probiyotiklerin etkilerini gösterebilmeleri için bağırsağa ulaşana kadar canlılıklarını sürdürebilmeleri ve bağırsakta belirli bir sayıda bulunmaları gerekmektedir. Prebiyotikler de bu organizmaların gastrointestinal sistemde hayatta kalabilmesini, barsakta tutunabilmesini ve gelişebilmesini destekleyen gıda bileşenleridir.

Simbiyotik kavramı da; probiyotiklerin konağın bağırsağında tutunmasını ve canlılığını sürdürmesini, bağırsakta sınırlı sayıda bulunan yararlı bakterilerin gelişimini ve metabolizmalarının aktif hale gelmesini destekleyen, probiyotik ve prebiyotik karışımı olarak tanımlanmaktadır. Simbiyotik, sadece probiyotik-prebiyotik karışımını değil aynı zamanda bu iki bileşen arasındaki sinerjiyi de ifade etmektedir [23].

2.1.4. *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ve *Escherichia coli* Nissle Bakterilerinin Özellikleri

Çalışmada, bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanılan *Escherichia coli* Nissle ve probiyotik amaçlı en çok tercih edilen mikroorganizma olan *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG'nin enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu mikroorganizmalardan *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) 1985 yılında ideal bir probiyotiğin özelliklerini taşıyan bir laktobasil suşu arama çalışmaları sırasında izole edilmiştir. ATCC, 53103 kodlu bir LGG suşunu üretmeye başlamıştır. Fakat Chr. Hansen markasının ürettiği LGG suşunun genomik sekansının ATCC 53103 ile aynı olmadığı 2019 yılında ortaya konmuştur. Bu sebeple Chr. Hansen markasına ait LGG suşu DSMZ kültür koleksiyonunda 33156 koduyla saklanmaktadır [24].

LGG, Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, çubuk şeklinde, hareketli olmayan, katalaz-negatif bir bakteridir. LGG kültüre alındığında fark edilebilir bir tereyağımsı kokuyla kremsi beyaz koloniler oluşturur. LGG suşlarını ayırt etmede kullanılacak bir yöntem, Gram boyasında oluşturdukları çit şeklindeki yapılardır ve bu yapılar diğer laktobasillerde oluşmaz. Yapılan kimyasal testlere göre sellobiyoz, früktoz, glukoz, mannitol, mannoz, melezitoz, ramnoz, riboz, salisin, sorbitol, trehaloz ve ksilozu fermente edebilirken; laktoz, maltoz, sakkaroz, amigdalin, arabinoz, eritrol, glikojen,

inositol, melibiyoz ve affinoz gibi maddeleri fermente edemez [10]. Probiyotik bakteriler için aranan ideal özellik mide asitliğine ve safraya dayanabilmesi ve sindirim sistemi kanalında canlı kalıp bağırsağı kolonize edebilmesi olduğundan, bu mikroorganizmaların pH dayanıklılıkları çok önemli bir faktördür. Goderska ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmanın bulgularına göre; LGG pH 7.0 değerinde canlılığını 72 saat boyunca başlangıçtaki miktarda korurken, pH 2.0 değerinde ilk 24 saatte başlangıç miktarı 2/3 oranında azalmış; 48 saatte sıfıra düşmüştür [25].

Çalışmada kullanılan diğer probiyotik olan *Escherichia coli* Nissle (EcN), bir *E. coli* suşu olmasına rağmen güvenli bir probiyotiktir. EcN, Gram-negatif bir bakteridir ve serotip O6:K5:H1 olarak sınıflandırılır. EHEC, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Clostridium perfringens* mikroorganizmalarının saldırılarını ve konakçıya bağlanmalarına limitasyon sağlar [10]. Prof. Alfred Nissle tarafından EcN kullanılarak hazırlanan probiyotik ilaç Mutaflor 1917 yılında piyasaya arz edilmiştir ve hala kullanılmaktadır [11]. EcN; diyare, Crohn hastalığı, irritabl bağırsak sendromu gibi sindirim sistemi ile ilgili birçok hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmaktadır [10,11].

2.2. Enkapsülasyon

2.2.1. Tanımı ve Hedefi

Enkapsülasyon, bir bileşenin bir materyal içerisine hapsedilerek birkaç nanometreden birkaç milimetreye kadar büyüklükte partiküllerin elde edilmesini sağlayan mekanik veya fizikokimyasal bir proses olarak tanımlanmıştır [6,17]. Biyoaktif bileşenlerin enkapsülasyonu; oksidatif reaksiyonun kontrolü, kontrollü salınımın sağlanması, raf ömrünün uzatılması, aroma ve koku bileşenlerinin maskelenmesi gibi gıda endüstrisindeki pek çok uygulamada kullanılabilir. Probiyotiklerin enkapsülasyonu ise kontrollü salınımdan ziyade canlı hücrelerin olumsuz ortam koşullarından korunmasına yöneliktir [6].

Probiyotiklerin enkapsülasyonunda iki problemle karşılaşmaktadır. Bunlardan birincisi probiyotiklerin boyutudur. Çapları genellikle 1 ile 5 µm arasındadır ve bu durum

nanoteknolojik yöntemlerin dışarıda bırakılmasına neden olmaktadır. İkinci problem ise hücrelerin canlı kalmalarının sağlanmasıdır [26,27].

Mikroorganizmaların konakta canlı kalma ve çoğalma yetenekleri, onların probiyotik faydalarını büyük oranda etkilemektedir. Enkapsüle probiyotik hücrelerin canlılığı, kapsüllerin fiziko-kimyasal özelliklerine bağlıdır. Kaplama materyalinin tipi ve konsantrasyonu, oluşan partikül büyüklüğü, başlangıçtaki canlı hücre sayısı, kullanılan suşlar da önemli parametrelerdendir [17].

Probiyotik enkapsülasyonda odaklanılması gereken nokta sadece hücrelerin olumsuz çevre koşullarından korunması değildir. Probiyotiklerin canlı ve metabolik olarak aktif oldukları sırada salınımlarının sağlanması da bir o kadar önem arz etmektedir [28]. Elde edilen mikropartiküllerin gıda matriksinde ve üst gastrointestinal sistemde bütünlüklerini koruyabilmesi için suda çözünemez özellikte olmaları gerekmektedir. Ayrıca, mikropartiküllerin, hücrelerin intestinal fazda serbest kalabilmelerini sağlayacak özellikte olması gerekmektedir [28,29].

2.2.2. Enkapsülasyon Yöntemleri

Mikroenkapsülasyon gıda bileşenlerinin, enzimlerin, yağların, bakteri hücrelerinin ya da diğer takviye edici gıdaların içeriklerini, özel koşullar altında kontrol edilen hızlarda salınacak ve çevredeki zarar verici faktörlerin bozucu etkilerinden koruyacak şekilde küçük kapsüller içinde bir araya getirilmesidir. Mikroenkapsülasyon teknikleri gıdalarda ve hayvan beslenmesinde probiyotik mikroorganizmaların kullanılabilmesi için tercih edilen bir yöntemdir. Çünkü, bu yöntem probiyotik bakteriler için işleme, depolama ve vücuda ağızla alınımdan itibaren koruyucu bir fiziksel bariyer oluşturur [30].

Probiyotiklerin enkapsülasyonunda pek çok farklı yöntem uygulanmaktadır. Her bir yöntem, farklı büyüklükte ve farklı tipte mikrokapsüllerin oluşumunu sağlamaktadır. Örneğin, emülsifikasyon yöntemi elde edilen kapsüllerin çapı 0.2 ile 5000 µm arasında değişirken; ekstrüzyon yönteminde oluşan kapsüllerin çap uzunlukları daha küçük bir aralıkta değişmekle birlikte, 300 µm çap uzunluğunun altında partiküller elde

edilememektedir. Emülsifikasyon, ekstrüzyon ve sprey kurutma probiyotiklerin enkapsülasyonunda genel olarak uygulanan yöntemlerdir [4].

2.2.2.1. Emülsiyon Yöntemi

Emülsiyonlar eczacılıkta ve gıda endüstrisinde belirli bileşenlerin stabilitesinin, çözünürlüğünün ve fizyolojik aktivitelerinin artırılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Emülsiyon, birbirine karışmayan iki sıvının bir stabilizatör ajan yardımıyla birbiri içerisinde dağılmasıdır [31]. Bununla birlikte, bir katılaştırıcı ajan dispers faz damlacıklarının sürekli fazdan ayrımını sağlayabilir [32]. Eğer dispers faz sulu ise emülsiyon, yağ içinde su (W/O) emülsiyonu olarak; tam tersi durumda ise emülsiyon, yağ içinde su (O/W) emülsiyonu olarak adlandırılır. İki durum da, yalnızca iki fazdan oluşur ve basit emülsiyonlar olarak adlandırılır. Bir faz daha eklenmesiyle; su içinde yağ içinde su (W/O/W) ya da yağ içinde su içinde yağ (O/W/O) şeklinde çift emülsiyonlar oluşturulabilmektedir [33].

Bu emülsifiye sistemler probiyotik bakterilerin korunmasında enkapsülasyon yöntemi olarak kullanılabilir. Bakteri hücrelerinin hidrofilik karakterlerinden dolayı, sulu dispers faz içeren (W/O veya W/O/W) emülsiyonlar probiyotiklerin enkapsülasyonunda tercih edilmektedir [34].

Emülsiyon yöntemi ile oldukça küçük çapta kapsüller üretilebilmektedir. Bu yöntemde, emülsiyon oluşumu için soya, mısır, parafin yağı gibi sıvı yağlar kullanılmaktadır. Yöntem kapsamında, az miktarda hücre-polimer karışımı, fazla miktardaki yağ eklenmekte ve yağ içinde su emülsiyonu elde edilinceye kadar uygun hızda sürekli olarak karıştırılmaktadır. Yağ içinde su emülsiyonu oluştuktan sonra, çözeltiye kalsiyum klorür eklenmesiyle suda çözünebilir polimerler suda çözünemez hale gelmektedir [35]. Daha iyi bir emülsiyon oluşturulabilmesi için yağ fazına Tween 80 gibi emülsifiye ediciler de eklenebilmektedir. Emülsifiye ediciler, su ve yağ fazları arasındaki yüzey gerilimini düşürerek daha küçük çapta kapsüllerin oluşumunu sağlamaktadır [3].

2.2.2.2. Ekstrüzyon Yöntemi

Ekstrüzyon metodu, probiyotik canlı hücrelerin mikroenkapsülasyonunda, enkapsülasyon materyali olarak hidrokolloidlerin kullanıldığı fiziksel bir tekniktir. Hücreleri içeren çözeltinin bir enjektörden yüksek basınç ile geçirilmesi prensibine dayanır [6]. Basit, uygulaması kolay, düşük maliyet gerektiren bir teknik olmasının yanısıra diğer yöntemlere göre ılımlı bir yöntem olmasından dolayı enkapsüle edilen mikroorganizmalar canlılıklarını büyük oranda koruyabilmektedirler [35,36]. Yöntem, probiyotik bakteri içeren hidrokolloid çözeltinin küçük bir açıklıktan çapraz bağlama/sertleşme çözeltisine damlalar halinde damlatılması ile hidrokolloid çözeltisinin jelleşmesi prensibine dayanır [36–38].

Avantajlarının yanında, yavaş gerçekleştirilen bir işlem olması sebebiyle büyük hacimlerde üretime izin vermemesi, 500 µm'den küçük kapsül oluşumunun sağlanmasında yetersiz kalması, yalnızca düşük veya orta viskozitede hidrokolloid çözeltilerinin kullanılabilmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır [39].

Elde edilen kapsüllerin büyüklüğünü, polimer çözeltisinin beslendiği açıklığın çapı, bu açıklıkla çapraz bağlama çözeltisinin arasındaki uzaklık ve hidrokolloid-probiyotik çözeltisinin viskozitesi ve akış hızı etkilemektedir [40].

2.2.2.3. Sprey Kurutma

Sprey kurutma yöntemi düşük maliyeti, yüksek verimi ve kısa sürede büyük hacimde üretim yapılmasına imkân sağlaması bakımından gıda endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Sprey kurutma tekniği, çözelti formundaki enkapsülasyon polimerinin atomize edilerek yüksek sıcaklıktaki gazla karşılaşması ve hızlı bir şekilde kuruması prensibine dayanır [41]. Probiyotik bakterilerin sprej kurutma ile enkapsülasyonunda çeşitli enkapsülasyon materyalleri kullanılabilir. Çözünürlüğü yüksek, yüksek konsantrasyonlarda düşük viskozite sağlayan, hızlı kuruma özelliğine sahip polisakkaritler, bu yöntemde kullanıma uygundur [42].

Hava akış hızı, beslemenin sıcaklığı, hava giriş ve çıkış sıcaklığı prosesin optimizasyonunda önemli koşullardır. Bu teknikte, sıcaklık parametresi oldukça önemlidir, çünkü yüksek sıcaklıklar bakterinin hücre membranına zarar verip canlılıkta ciddi bir düşüşe sebep olabilirken; düşük sıcaklıklar ise suyun evaporasyonunu yavaşlatarak mikrokapsüllerin agregasyonuna sebep olabilmektedir [43].

2.3. Enkapsülasyonda Kullanılan Polimerler

Enkapsülasyon sonrası elde edilen kapsüllerin özelliklerini direkt olarak etkilemesi bakımından probiyotiklerin enkapsülasyonunda kullanılan polimerler oldukça önemlidir. Bu polimerler, oluşan kapsüllerin büyüklüğünü, morfolojisini, stabilitesini ve geçirgenliğini etkilemektedir. Bu polimerlerin, mikrobiyal hücreleri çevresel koşullara karşı koruyabilecek özellikte olması ve kontrollü salınımına olanak sağlaması gerekmektedir. Ayrıca, insanlar tarafından tüketilecekleri ve/veya gıda ürünlerine işlenecekleri için toksisite barındırmaması gerekmektedir [43–45].

Enkapsüle edilecek bileşen, taşıyıcı ve koruyucu bir matriks içerisinde dağılmış halde bulunmaktadır. Gıda endüstrisinde kullanılacaksa, bu taşıyıcı materyal mutlaka gıda kaynaklı olmalıdır ve enkapsüle edilen bileşeni koruyacak bir bariyer oluşturabilmelidir.

Farklı polisakkaritler, proteinler ve lipidler probiyotik mikroorganizmaların enkapsülasyonunda kullanılmaktadır. Genellikle suda çözünebilen doğal bileşenler bu amaçla kullanım için tercih edilmektedir. Çünkü bu polimerler ekstrüzyon ve emülsiyon gibi göreceli olarak daha ılımlı yöntemlerin uygulanmasına olanak sağlarken, aynı zamanda hücresel bütünlüğün sağlanmasını da desteklemektedir [36]. Probiyotiklerin enkapsülasyonunda en sık kullanılan polimerler; aljinat, jellan gam, selüloz asetat fitalat, ksantan gam, kitozan ve süt proteinleridir [6].

2.3.1. Sodyum Aljinat

Aljinat değişik türdeki alglerden ekstrakte edilen, β -D-mannuronik asit ve α -L-guluronik asitten oluşan bir polisakkarittir. Aljinatın kaynağına bağlı olarak, polimer zincirinin

kompozisyonu değişiklik göstermektedir. Bu da aljinatın destek materyali olarak fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir.

Aljinat hidrojelleri hücre enkapsülasyonunda çok sık kullanılmaktadır. Probiyotiklerin enkapsülasyonunda toksik olmaması, düşük maliyeti ve biyouyumluluğu açısından genellikle kalsiyum aljinat tercih edilmektedir [35]. Aljinatın asidik ortama karşı duyarlı olması gibi bazı dezavantajlar da söz konusudur [46]. Bu durum, mikropartiküllerin mide asidinde bütünlüğünü korumasını engeller. Ayrıca aljinatla elde edilen mikropartiküller gözenekli yapı göstermektedirler. Bu da hücrelerin olumsuz koşullardan korunması amacına ters düşen bir durumdur [47]. Bu gibi dezavantajlar, aljinatın diğer polimer bileşenlerle karıştırılması, kapsülün başka bir polimerle daha kaplanması veya farklı katkıları eklenerek aljinatın yapısal modifikasyonunun sağlanması sonucunda aşılabilmektedir [35]. Örneğin, aljinatın nişasta veya selüloz asetat fitalat gibi polimerlerle karıştırılması sık kullanılan bir yöntemdir ve probiyotik enkapsülasyonunun etkisini artırdığı gösterilmiştir [35].

2.3.2. Selüloz Asetat Fitalat

Bu polimerin özelliği, asidik koşullarda çözünemeyip ($\text{pH} < 5$) pH 'ın 6'dan büyük olduğu koşullarda çözünebilmesidir. Bu durum biyoaktif bileşenlerin hedef organ olan bağırsağa güvenli bir şekilde taşınabilmesinde büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, yavaş çözünme özelliğinden dolayı kontrollü salınımına da olanak sağlamaktadır. Tüketiminin güvenli olmasından dolayı ilaç endüstrisi tarafından kullanılan bir bileşen olan CAP [46], probiyotiklerin enkapsülasyonunda kullanıldığında simüle sindirim sistemi koşullarında iyi bir koruma sağlamaktadır [48].

2.3.3. Ksantan Gam

Ksantan gam (XG), *Xanthomonas campestris* tarafından endüstriyel olarak üretilen bir ekzopolisakkarittir. 1969 yılında FDA tarafından toksik olmadığı ve biyolojik olarak parçalanabildiği onaylanmıştır. 2:2:1 oranında glukoz, mannoz ve glukuronik asit içeren tekrar eden pentasakkarit birimlerinden oluşan bir heteropolisakkarittir. Soğuk ve sıcak suda çözünebilme özelliği olan bu bileşen, gıda sektöründe kıvam artırıcı olarak

kullanılmaktadır [49,50]. Ksantan gamın başka polisakkaritlerle sinerji halinde kullanımı, partikül özelliklerinin daha da iyileştirilmesini sağlayabilmektedir. Ksantan gam-jellan gam karışımı probiyotiklerin enkapsülasyonunda kullanılmıştır ve bu karışımın aljinatın aksine asidik koşullara yüksek tolerans gösterdiği bildirilmiştir [6,14,51]. Kitozan-ksantan gam karışımı, *Bifidobacterium* BB01'in depolanmasında ve sindirim sistemi simülasyonunda iyi bir koruma sağlamıştır [52]. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in enkapsülasyonunda aljinata ksantan gam eklenmesiyle, oluşan kapsüllerin yapısının ksantan gamın hidroksil grupları ile aljinatın karboksilat grupları arasında bağ oluşması sebebiyle değiştiği ve bu sayede probiyotik bakterilerin korunmasında daha iyi performans gösterdiği belirtilmiştir [53].

2.3.4. Jellan Gam

Jellan gam, endüstriyel üretimi *Pseudomonas elodea* ve *Sphingomonas elodea* tarafından gerçekleştirilen, suda çözünebilir, negatif yüklü, lineer bir polisakkarittir. Sırasıyla D-glukoz, L-glukuronik asit, D-glukoz ve L-ramnoz monomer dizilerinden oluşan tetrasakkarit birimlerinin tekrarladığı bir heteropolisakkarittir. Asidik pH'larda stabil olan jellan gam, aynı zamanda ısıya dayanıklı ve pozitif yüklü polimerlerle iyonik bağ oluşturabilen, toksik olmayan bir polimerdir. Jelleşme özelliği sayesinde sert ve yarı saydam jellerin oluşturulması mümkündür [54]. Jellan gam, whey protein izolatu ve selüloz asetat fitalatın kullanıldığı *Lactobacillus casei* BNCC 134415 suşunun dondurarak kurutma yöntemi ile enkapsülasyonunda, bu polimerlerin soğuk depolama, pastörizasyon ve simüle sindirim sistemi koşullarında immobilize probiyotiklerin hücre canlılığını desteklediği ortaya konmuştur [55]. Jellan gam, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus casei* Shirota'nın ekstrüzyon tekniğiyle enkapsülasyonunda; jelatin, fruktooligosakkaritler ve peptidlerle birlikte kullanıldığında probiyotiklerin çevresel stres koşullarından korunmasını desteklemiştir [56].

2.3.5. Prebiyotikler

2.3.5.1. İnülin

İnülin, bitkilerden izole edilen β -glukozidik bağlarla bağlı fruktoz monomerlerinden oluşan lineer bir polisakkarittir. β -konfigurasyonundan dolayı sindirim sisteminde

hidroliz edilemez [57]. Probiyotik mikroorganizmaların enkapsülasyonunda kullanıldığında, depolamada ve sindirim sistemi simülasyonu gibi çevresel stress koşullarında daha iyi stabilite sağlanmaktadır [58,59].

Bir gıdanın probiyotik olarak adlandırılması için, depolama süresince üründeki canlı probiyotik hücre sayısının belirli bir seviyeye kadar korunabilmesi gerekmektedir. Probiyotik bakterilerin asidik ortam koşullarından olumsuz etkilenmesi, meyve suyu gibi asitliği yüksek gıda ürününe işlenmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca, probiyotiklerin insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerini gösterebilmeleri için bağırsağa ulaşan canlı hücre sayısının belirli bir seviyenin üzerinde olması gerekmektedir. Tüketilen probiyotikler sindirim sisteminde ilerlerken bağırsağa ulaşana kadar canlılığını olumsuz etkileyebilecek çeşitli ortamlara maruz kalmaktadır.

Probiyotiklerin enkapsüle edilip gıda ürünlerine eklendiği yapılan son çalışmalar incelendiğinde; bir çalışmada, alıç çileği çayında mikroenkapsüle *L. rhamnosus* GG'nin keten tohumu müsilağı ile muhafaza stabilitesini belirlemeyi amaçlamıştır. *L. rhamnosus* GG 4 °C'de 4 hafta depolamadan sonra yüksek yaşayabilme yeteneği gösterdiği bildirilmektedir (7.5 log hücre/mL aljinat, pektin, keten tohumu zankı ile mikrokapsüllemiş simüle mide sindirim altında alıç meyve çayı zankı keten tohumu). Mikroenkapsüle *L. rhamnosus* GG keten tohumu müsilağı içeren örnekler, 4 haftalık depolamadan sonra 4 °C ve 25 °C sıcaklıkta serbest *L. rhamnosus* GG hücrelerine kıyasla daha yüksek toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasitesine sahip olduğu anlaşılmıştır [60]. Araştırmacılar bir başka yaygın ile keten tohumu müsilağının *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG'nin ko-ekstrüzyon yöntemi ile mikrokapsülasyonu üzerindeki koruyucu etkisini değerlendirmişlerdir [61]. Eşzamanlı ve karışık akışlı sprey kurutmanın canlılık, büyüme kinetiği ve biyofilm oluşumu üzerine etkisini araştıran bir çalışmada ise *L. rhamnosus* GG suşu Balık jelatin ve maltodekstrin ile mikroenkapsüle edilmiştir. Her durumda, mikrokapsüllemenin, probiyotik hücrelerin büyüme kinetiğini değiştirmediği bulunmuştur. Ayrıca farklı materyal kullanarak gerçekleştirilen enkapsülasyon sonrası probiyotik hücrelerin (%) hücre sağkalımı 81.02 ± 0.19 , 20.88 ± 0.03 ve 10.20 ± 0.02 oranında etkilenmiştir. Elde edilen mikroenkapsüle bakteri örneklerinde ortalama partikül boyutu (μm) sırasıyla 54.73 ± 1.40 , 22.51 ± 0.34 ve 10.53 ± 0.06 olarak

bulunmuştur [62]. Probiyotik içeren mikrokapsüllenmiş fermente meyve suyu üretimi, depolama stabilitesi ve *in vitro* sindirimini araştıran bir başka çalışmada ise *Lactobacillus plantarum* P8 (LP) ve *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) suşları kullanılmış ve iki suş arasında LP, daha yüksek bir hayatta kalma oranına ve safra tuzlarına karşı daha iyi bir toleransa (%1.2) sahip olduğu bulunmuştur [63]. Bir başka çalışmada ise, LGG, aljinat boncuklar içinde emülsiyon ve ekstrüzyon teknikleri kullanılarak mikrokapsüllenmiş, karakterize edilmiş ve nişasta hidrolizatı içine aşılanmıştır. Depolama sırasında (4 °C, 90 gün), ayrıca mide ve bağırsak koşullarında (*in vitro* ve *in vivo*) LGG'nin hayatta kalma oranları ölçülmüştür. Serbest LGG hücreleri, depolamanın ilk 30 günü içinde canlılıkta hızla azalırken, kapsüllenmiş hücreler, yaşama kabiliyetinde aşamalı ancak önemsiz bir azalma göstermiştir. LGG hücreleri, serbest LGG için 5 log kob/mL'nin üzerinde ve 60 günlük depolamanın sonunda mikrokapsül LGG ise 7 log kob/g'nin üzerinde canlılığı sürdürdüğü saptanmıştır. Kapsüllenmiş LGG, simüle edilmiş mide ve bağırsak sıvılarında 120 dakika sonra sırasıyla % 77.4 sağkalıma sahip olduğu ve mikrokapsül LGG'nin gastrointestinal koşullardan geçiş sırasında daha iyi direnç gösterdiği belirlenmiştir [64]. İran'da tüketilen geleneksel bir içecekte ise 42 gün depolama boyunca serbest ve enkapsüle edilmiş *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus*'un simüle edilmiş gastrointestinal koşullarda hayatta kalma oranı araştırılmıştır. Serbest bakteri içeren içeceklerde pH ve asitlik değişiklikleri mikrokapsüllü ve kontrol gruplarına göre daha fazla olmuştur. Serbest probiyotik bakterilerin daha fazla aktivitesi (42 günlük bir süre boyunca, özellikle 21. günden sonra), ürün içinde daha fazla asit ve metabolit oluşturarak, organoleptik özellik açısından etkilenmiştir, ancak mikrokapsül bakteri içeren içecek örneklerinde asitlik, pH ve organoleptik özellikleri önemli ölçüde değişmediği saptanmıştır [65].

Yukarıda verildiği gibi, literatürde birçok çalışma, meyve ve sebzeler gibi süt ürünü olmayan gıda matrislerinde probiyotiklerin canlılığını bildirmiştir. Bununla birlikte, süt ürünü olmayan seçeneklerde probiyotiklerin kullanım olanaklarını araştıran ve mide-bağırsak yolundan geçiş sırasında probiyotiklerin direncini değerlendiren daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, probiyotiklerin asit toleransı yüksek olan GRAS sınıfından polimerlerle enkapsüle edilmesiyle, meyve suyundaki probiyotik canlılığının istenen seviyede tutulabileceği, ayrıca bu kapsüllerin tüketiminden itibaren bağırsağa ulaşana kadar probiyotik canlılığının büyük oranda korunabileceği ortaya konmuştur.

Bu çalışmanın amacı, insan bağırsağındaki mikrobiyal dengeleri iyileştirebilir nitelikte probiyotik bakteriler kullanarak meyve suyu üretimi için mikroenkapsülasyon yönteminin etkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla, öncelikle probiyotiklerin asit toleransı yüksek polimerler kullanılarak mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirmek; sindirim sistemi simülasyonunda ve meyve suyunda depolama süresince probiyotik canlılığının etkin bir şekilde korunmasını sağlamak, ayrıca elde edilen meyve suyu örneklerinin tüketim bakımından kabul edilebilirliğini ortaya koymak hedeflenmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Probiyotik Mikroorganizma Suşları

Lactocaseibacillus rhamnosus GG DSMZ 33156 (LGG) probiyotik bakterisi Chr. Hansen firmasından orijinal paketi içinde liyofilize şekilde sağlanmıştır. *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) suşu Mutaflor firmasından tablet halinde temin edilmiştir.

3.1.2. Besiyerleri ve Polimerler

LGG suşunun canlandırılmasında MRS Broth (de MAN, ROGOSA and SHARPE) besiyeri (Sigma), mikrobiyolojik sayımlarının gerçekleştirilmesinde MRS Agar besiyeri (Sigma) kullanılmıştır. EcN probiyotik suşunun canlandırılmasında ise Lauryl-Sulfate Broth (Merck) kullanılmış olup, bu besiyerine Agar (BioShop) eklenerek mikroorganizma sayımları gerçekleştirilmiştir.

Mikroorganizma sayımlarında peptonlu su (Merck) kullanılarak dilüsyonlar yapılmıştır.

Mikroenkapsülasyon işleminde, sodyum aljinat (ALG), selüloz asetat fitalat (CAP), ksantan gam (XG), jellan gam (GG) (Sigma Aldrich) polimerleri kullanılmıştır. Simbiyotik mikroenkapsülasyonda inülin (INU) (Raftiline GR, Dora) de polimer çözeltilisine eklenmiştir. Mikroenkapsülasyon işleminde ticari mısırozü yağı (Evin) kullanılmıştır.

3.1.3. Kimyasallar

Probiyotik çözeltilerinin oluşturulmasında ve mikrokapsüllerin yıkanmasında sodyum klorür (NaCl) çözeltisi (Merck) kullanılmıştır. Enkapsülasyon işleminde Tween 80 (BioShop), kalsiyum klorür (CaCl₂) çözeltisi (BioShop) kullanılmıştır.

Enkapsülasyon veriminin belirlenmesi amacıyla mikrokapsüllerin salınımlarında ve sindirim sistemi simülasyonunda fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) tabletleri (OXOID) kullanılmıştır.

Sindirim sistemi simülasyonunda, simüle mide sıvısının (SMS) hazırlanmasında pepsin, simüle bağırsak sıvısının (SBS) hazırlanmasında ise pankreatin ve safra tuzları Sigma Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir.

HCl (Sigma) ve NaOH (Merck) çözeltileri çalışma boyunca gerekli pH ayarlamalarında kullanılmıştır. Potansiyometrik yöntemle sitrik asit tayininde fenolfitalein (Carlo Erba) indikatörü kullanılmıştır.

Tüm çözeltilerin hazırlanmasında distile su kullanılmıştır. Meyve suyu analizleri için Dimes %100 portakal suyu ve %100 elma-şeftali suyu kullanılmıştır.

3.1.4. Ticari Meyve Suları

Çalışmada kullanılmak üzere, ilave şeker ve katkı maddesi bulunmayan, “%100 Meyve Suyu” ibareli %100 meyve oranına sahip Dimes markasına ait meyve suları tercih edilmiştir. Bu amaçla, %100 portakal suyu ve %100 elma-şeftali suyu olmak üzere iki farklı tipteki meyve suyu ticari olarak temin edilmiştir. Çizelge 3.5.’te ticari olarak sağlanan meyve sularının bileşimi verilmiştir.

3.1.5. Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan bazı ekipman ve ilgili marka ve modeller aşağıda verilmiştir:

- Manyetik karıştırıcı (Thermomac TM-12)
- Çalkalamalı inkübatör (SI-300R, Medline Scientific)
- Hassas terazi (Yıldırım KD-TBC)
- Etüv (Memmert DIN 12880-KL)
- Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C) (Vestel NF450)
- Vorteks (Biosan V-1 plus)
- Mikrosantrifüj cihazı (NF800, Nüve)
- Liyofilizatör (Martin Christ)

- FIB-SEM – Odaklanmış İyon Demeti Taramalı Elektron Mikroskobu (GAIA 3, Tescan)
- Püskürtmeli kaplama Cihazı 1 (KAP-1) (ACE600, Leica)
- ESEM – Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (FEIQuanta 200 FEG, Thermo Fisher Scientific Co.)
- Püskürtmeli Kaplama Cihazı 2 (KAP-2) (Precision Etching and Coating System 682, Gatan Inc.)
- pH metre (Ohaus)
- El refraktometresi (ATC BX90)
- Spektrofotometre (CM-3600d, Konica Minolta)

3.1.6. Sarf Malzemeleri

Probiyotik suşlarının depolanmasında 2 mL’lik cryo tüpler (Greiner Bio-One) kullanılmıştır. Polimer çözeltilerinin sterilizasyonunda, enkapsülasyonun yıkama aşamasında, enkapsülasyon veriminün belirlenmesinde ve sindirim sistemi simülasyonunda, meyve suyu örneklerinin depolanmasında ve meyve suyunda canlılık analizlerinde 50 mL’lik santrifüj tüpleri (ISOLAB; LP ITALIANA) kullanılmıştır. 15 mL’lik santrifüj tüpleri (ISOLAB; LP ITALIANA) meyve sularının depolanmasında kullanılmıştır.

Deney tüpleri ve eppendorf tüpleri probiyotik çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Cam beher ve manyetik balık enkapsülasyonda kullanılmıştır. 96 kuyulu steril doku kültürü petripleri (Biofil) kullanılarak sindirim sistemi simülasyonu ve canlılık analizlerinde dilüsyonlar yapılmıştır. 90 mm’lik steril petri kutuları (ISOLAB) agarlı besiyeri hazırlanmasında ve mikrobiyolojik analizlerde kullanılmıştır. Parafilm LGG suşunun katı besiyerinde gelişimi için anaerobik koşulların sağlanması amacıyla kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Probiyotik Mikroorganizma Suşlarının Canlandırılması ve Stok Kültür Eldesi

Liyofilize haldeki probiyotik suşlarının canlandırılması amacıyla; LGG 10 mL MRS Broth besiyerine, EcN 10 mL Lauryl Sulfate Broth besiyerine ekilmiştir ve 37 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 1 gün sonunda elde edilen kültürler sırasıyla MRS agar ve Lauryl Sulfate agar besiyerlerine tek koloni düşürme yöntemiyle ekilmiştir [66]. Lauryl Sulfate agara ekimi yapılan EcN kültürü aerobik koşullarda 37 °C’de 24 saat, MRS agar besiyerine ekimi yapılan LGG suşu ise anaerobik koşullarda 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmış olup, inkübasyon sonunda her probiyotik suş için saf koloni izolasyonu sağlanmıştır. Koloniler öze yardımı ile cryo tüplere aktarılmıştır. Tüm bu işlemler aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen saf kültürlerin kayıt altında tutulması amacıyla, izolasyonun gerçekleştirildiği laboratuvar, tarih, kaynak, suş numarası, izolasyonu gerçekleştiren kişiye ait bilgileri içeren HU kodu verilmiştir [67]. Kodlama sistemine ilişkin bilgiler Çizelge 3.1.’de verilmiştir. HU kodlarıyla kayıt altına alınan izolatlar cryo tüpler içerisinde -20 °C’de depolanmaktadır.

Çizelge 3.1. Kodlama sistemi.

Üniversite	Laboratuvar	Yıl	Kişi	Taksonomik Grup	Kaynak	Petri No	Suş No
HU (Hacettepe Üniversitesi)	F - FoodOmics	19	S - Sena	O- <i>Lactobacillus</i> P- <i>Escherichia</i>	T- Ticari	1	001

3.2.2. Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması

Polimer çözeltilerinin hazırlanmasında polimerlerin farklı özelliklerinden dolayı farklı uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Aljinat, XG ve GG polimerleri ve inülin, çözeltilerinde yüksek sıcaklığa maruz kalmaları durumunda jelleşme özelliği göstermektedirler. Fakat CAP materyali için böyle bir durum söz konusu değildir. CAP’ın çözdürülmesinde, bu polimerin farklı pH derecelerine karşı gösterdiği farklı tepkilerden yararlanılmıştır.

XG-GG ve XG-GG-INU çözeltilerinin hazırlanmasında, Çizelge 3.2.'de belirtilen konsantrasyonlara göre hesaplanıp tartımları yapılan polimerler, bir beherin içerisinde distile suyla karıştırılıp, aynı zamanda 80-90 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Tüm polimerler tamamen çözüne kadar karıştırma işlemi devam etmiştir.

Çizelge 3.2. Enkapsülasyon matrisindeki polimer bileşeni yüzdeleri (%) (a/h).

	Polimer Çözeltisi	ALG	CAP	XG	GG	INU
Mikrokapsül	3ALG:1CAP	3	1			
	1XG:1GG			1	1	
	3ALG	3				
	3ALG:0.75CAP	3	0.75			
	0.5XG:1GG			0.5	1	
Simbiyotik Mikrokapsül	3ALG:1CAP:2INU	3	1			2
	1XG:1GG:2INU			1	1	2

ALG-CAP ve ALG-CAP-INU polimer çözeltilerinin hazırlanmasında ise öncelikle CAP polimerleri çözdürülmüştür. Bunun için, Çizelge 3.2.'de belirtilen konsantrasyonlara göre hesaplanıp tartılan CAP, bazik ortamda çözünme özelliğinden yararlanılarak PBS çözeltisinde (pH 8) tamamen çözdürülmüştür ve çözeltinin son pH değeri 7.2'ye ayarlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiliye Çizelge 3.2.'deki konsantrasyonlara uygun olacak şekilde tartılan sodyum aljinat polimeri eklenmiştir. XG-GG polimerlerinde de olduğu gibi 80-90 °C'ye ısıtılan çözelti aljinat tamamen çözüne kadar karıştırılmıştır. Elde edilen çözeltiler santrifüj tüplerine alınarak enkapsülasyonda kullanılmak üzere sterilize edilmiştir.

3.2.3. Probiyotik Bakteri Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG hücreleri MRS Broth besiyerinde, *E. coli* Nissle hücreleri Lauryl Sulfate Broth besiyerinde 37 °C’de 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra, enkapsülasyon aşamasında kullanılacak probiyotik çözeltisinin hazırlanması için Çizelge 3.3.’te belirtilen oranda taze probiyotik kültürü 5000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası yüzeyde biriken süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti steril %0.85 NaCl çözeltisi ile tekrar süspansiyon edilmiştir. 1 kez daha 5000 rpm’de 20 dk santrifüj edilen tüplerde yüzeyde kalan süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti steril %0.85 NaCl çözeltisi ile tekrar süspansiyon edilmiştir. Bu işlemler aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen probiyotik çözeltisindeki canlı hücre sayısının belirlenmesi amacıyla *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG’nin MRS agar besiyerine, *E. coli* Nissle’in Lauryl Sulfate agar besiyerine aseptik koşullarda yüzeye yayma yöntemi [66] ile ekimleri yapılmıştır. Probiyotik çözeltisi hazırlandıktan hemen sonra enkapsülasyon işleminde kullanılmıştır.

3.2.4. Probiyotiklerin Mikroenkapsülasyonu

Probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu için emülsiyon yöntemi kullanılmıştır. Enkapsülasyon işlemi için, Sultana ve arkadaşlarının (2000) çalışmalarında takip ettiği enkapsülasyon yöntemi bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2.’de belirtilen farklı konsantrasyondaki polimer çözeltileri kullanılarak farklı enkapsülasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Önceden hazırlanan steril polimer çözeltilerinin 4 °C’de depolandıkları süre içerisinde viskozite artışına bağlı olarak probiyotik çözeltisiyle homojen karışım oluşturulmasında zorluk yaşanmıştır. Polimer-probiyotik homojen karışımının sağlanabileceği akışkan bir yapının elde edilebilmesi amacıyla, steril polimer çözeltisi probiyotik mikroorganizmaların gelişmesinde optimum sıcaklık olan 37 °C’de enkapsülasyondan hemen önce 20 dakika boyunca bekletilmiştir.

Emülsiyon metodu çoğaltılabilen (scale-up) bir metod olmasından dolayı, enkapsülasyona katılan bileşenleri ihtiyaç dahilinde oransal olarak artırılıp

azaltılabilmektedir. Enkapsülasyon bileşenlerinin oransal ifadeleri Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir. Enkapsülasyon verimin belirlenmesinde ve sindirim sistemi simülasyonunda değerlendirilecek mikrokapsüllerin üretiminde 10 g mikrokapsül elde edilecek şekilde daha küçük katlarda çalışılabilirken, meyve suyu analizleri gibi büyük kütlede mikrokapsül üretiminin gerektiği çalışmalarda enkapsülasyon bileşeni oranları sabit tutularak büyük miktarlarda mikrokapsül elde edilebilmiştir.

Çizelge 3.3. Enkapsülasyon bileşenlerinin oransal ifadesi.

Enkapsülasyon Bileşenleri	Oranı
Mısırözü Yağı	50 X mL
Tween 80	100 X µl (%0.2 h/h)
Polimer Çözeltisi	5X mL
Probiyotik çözeltisi	2X mL
0.3 M CaCl ₂ çözeltisi	100 X mL

Enkapsülasyonun ilk aşamasında, polimer çözeltisinin bulunduğu santrifüj tüpüne Çizelge 3.3'te verilen oranlara uygun olarak hazırlanan probiyotik çözeltisi eklenmiştir. Tüp içerisinde bulunan polimer çözeltisi ile probiyotik çözeltisi 5 dakika boyunca çalkalanarak homojen polimer-probiyotik karışımı elde edilmiş olup, enkapsülasyonun diğer aşamasına geçilmiştir.

Daha önceden sterilize edilmiş olan behere steril mısırözü yağı, Tween 80 ve steril manyetik balık aseptik koşullarda eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı kullanılarak mısırözü yağı ile Tween 80'in homojen olarak karışması sağlanmıştır. Polimer-probiyotik karışımı, beher içerisindeki yağa bunzen beki alevi altında eklenerek 650 rpm'de 20 dakika süreyle karıştırılmıştır. Bu süre içerisinde karışım tamamen emülsifiye olup kremi bir yapı oluşmuştur. 20 dakikanın sonunda steril CaCl₂ çözeltisi beherin kenarından sızdırılarak hızlı bir şekilde emülsiyona eklenmiş ve emülsiyon kırılmıştır. Bu şekilde, faz ayrımının

gerçekleşmesi sağlanmış olup mikrokapsüllerin CaCl_2 fazına geçmesi beklenmeden manyetik balık beherden çıkarılmıştır. Steril alüminyum folyo ile üzeri kapatılan beher, yağ fazındaki mikrokapsüllerin CaCl_2 fazına geçmesi ve sertleşmesi için $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 saat boyunca bekletilmiştir. 2 saatlik bekleme süresinin sonunda, enkapsülasyon işlemiyle elde edilen mikrokapsüllerin beherin dibinde toplandıkları görülmektedir.

Enkapsülasyonun son aşamasında, mikrokapsüllerin yağ damlacıklarından tamamen ayrılması ve mikrokapsüllerle interaksiyona girmemiş olan fazla CaCl_2 moleküllerinin uzaklaştırılması amacıyla yıkama işlemi yapılmıştır. Bu amaçla, steril pipetler kullanılarak beherde bulunan yağ fazı ve mikrokapsüllerin üzerindeki berrak CaCl_2 fazı uzaklaştırılmış, beherin dibinde kalan mikrokapsül bulamacı steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Yeni tüpteki mikrokapsüllerin üzerine %0.85 (a/h) NaCl çözeltisi eklenmiş, tüm karışım yavaşça alt üst edilerek karıştırılmıştır. Bu karışım santrifüj tüpünde 20 dakika bekletildikten sonra, yüzeye çıkan yağ damlacıkları ile berrak NaCl çözeltisi pipetlelenerek uzaklaştırılmıştır. Tüpün dibinde kalan mikrokapsül bulamacı yeni bir steril santrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine steril %0.85 (a/h) NaCl çözeltisi eklenerek yıkanmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak mikrokapsüllerin yağ fazından ve fazla CaCl_2 moleküllerinden tamamen arınması sağlanmıştır. Elde edilen mikrokapsüller, steril tüplerde parafilmle mühürlenerek 1 gün sonrasında kullanılmak üzere $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de depolanmıştır.

3.2.5. Probiyotiklerin Simbiyotik Mikroenkapsülasyonu

Çalışmanın bu kısmında, prebiyotiklerin probiyotik canlılığına etkisinin incelenmesi amacıyla, enkapsülasyon polimerleri ile prebiyotik maddeler birlikte kullanılarak simbiyotik enkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2.4'te belirtilen enkapsülasyon aşamasında, canlılık ve morfolojik karakterizasyon değerlendirmelerine göre en başarılı sonucu veren polimer karışımına (ALG-CAP veya XG-GG), %2 (a/h) inülin eklenerek, aynı teknikle enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Simbiyotik enkapsülasyonla elde edilen mikrokapsüllerdeki probiyotiklerin canlılığı Bölüm 3.2.3'te belirtildiği gibi yüzeye yayma yöntemi ile belirlenmiş olup,

mikrokapsüllerin morfolojik karakterizasyonu Bölüm 3.2.7’de belirtildiği gibi FIB-SEM ve ESEM cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Enkapsülasyon ve simbiyotik enkapsülasyon sonucu elde edilen mikrokapsüller; probiyotik canlılığı, enkapsülasyon verimi ve morfolojik karakterizasyon bakımından değerlendirilmiştir.

Simbiyotik mikroenkapsülasyon sadece sindirim sistemi simülasyonunda en iyi sonucu veren polimer konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Polimer çözeltileri hazırlanırken %2 (a/h) oranında inülin de karışıma eklenmiştir.

3.2.6. Mikrokapsüllerdeki Probiyotik Canlılığının Belirlenmesi ve Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması

3.2.6.1. Probiyotiklerin Mikrokapsüllerden Salınımı

Mikrokapsüllerdeki probiyotik canlılığının belirlenmesi için öncelikle probiyotiklerin mikrokapsüllerden salınımı gerçekleştirilmiştir. Bunun için, mikrokapsüllerin dışını çevreleyen Ca molekülleri ile çapraz bağ oluşturarak mikrokapsüllerin parçalanmasına yardımcı olan, ayrıca mikrokapsüllerden salınan mikroorganizmaların canlılığının olumsuz etkilenmeyeceği çevresel koşulları sağlayan pH 7.2 PBS çözeltisi kullanılmıştır. 10 mL steril PBS pH 7.2 çözeltisine 1 g mikrokapsül bulamacı eklenmiştir. Elde edilen karışım çalkalamalı inkübatörde 37 °C sıcaklıkta 120 rpm’de 2 saat boyunca çalkalandıktan sonra, steril peptonlu su kullanılarak örneklerin seri dilüsyonları yapılmıştır [12]. LGG için MRS agar besiyerine, EcN için ise Lauryl Sulfate agar besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile gerekli dilüsyonlardan ekim yapılmıştır [66]. Kapsüllerdeki canlı probiyotik mikroorganizma sayısı, koloni oluşturan birim (kob) cinsinden belirlenmiştir.

3.2.6.2. Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması

Enkapsülasyon verimi, enkapsülasyona dahil edilen mikroorganizmaların ne kadarının başarılı şekilde enkapsüle edildiğini ifade eden oransal bir göstergedir. Enkapsülasyonda

kullanılan probiyotik çözeltilisindeki toplam canlı mikroorganizma sayısının, enkapsülasyon sonrası elde edilen toplam mikrokapsül kütlelerine bölünmesiyle, 1 g mikrokapsülde teorik olarak bulunması gereken mikroorganizma sayısı elde edilmiştir. Bu değer başlangıç canlı hücre sayısıdır. PBS çözeltilisinde mikrokapsüllerin parçalanmasıyla salınan probiyotikler ise enkapsülasyon sonrası canlı kalan mikroorganizma sayısını vermektedir. Bu değer ise mikrokapsüllerden salınan canlı hücre sayısıdır. Buna göre; başlangıç hücre sayısı ile mikrokapsüllerdeki canlı hücre sayısının oranlandığı aşağıdaki denklem kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır [35,68].

Her mikrokapsül örneği için 2 farklı santrifüj tüpünde mikrokapsüllerdeki probiyotiklerin salınımı gerçekleştirilerek 2 biyolojik tekrar gerçekleştirilmiştir. Her santrifüj tüpünden 2 farklı dilüsyon serisi hazırlanarak 2 teknik tekrar yapılmıştır. Toplam tekrar sayısı n=4'tür. Enkapsülasyon veriminin hesaplanmasına ilişkin denklem verilmiştir.

$$EV = (N / N_0) * 100$$

N: Mikrokapsüllerden salınan canlı hücre sayısı

N₀: Başlangıç canlı hücre sayısı

3.2.7. SEM Analizi ile Mikrokapsüllerin Morfolojik Karakterizasyonu

SEM görüntüleri elde edilmek istenen mikrokapsül örnekleri -40 °C'de, 0.070 mbar vakum altında 36 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen probiyotik mikrokapsüllerinin morfolojik karakterizasyonu iki farklı Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. Bu cihazlar Odaklanmış İyon Demeti Taramalı Elektron Mikroskobu (FIB-SEM) ve Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobudur (ESEM). SEM analizi için bir miktar probiyotik mikrokapsül numunesi örnek tutucu üzerine yerleştirilip ve üzeri FIB-SEM cihazında gerçekleştirilen analizler için 6nm; ESEM cihazında gerçekleştirilen analizler için 10 nm kalınlığında altın-paladyum ile iki farklı kaplama cihazında (KAP-1; KAP-2) kaplanmıştır. Yüksek vakum altında 2-5 kV arasında en net görüntü elde edilene kadar büyütme yapılarak mikrokapsüllerin FIB-SEM ve ESEM görüntüleri elde edilmiştir. Farklı polimerlerin kullanıldığı enkapsülasyon deneyleri sonucunda elde edilen mikrokapsüllerin boyutları ve morfolojik özellikleri bu görüntüler göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Elde edilen kapsüllerin mikron

boyutunda olup olmaması, düzensiz yapıda ve şekilde kapsüllerin bulunup bulunmadığı SEM görüntülerinin değerlendirilme kriterlerindedir.

3.2.8. Sindirim Sistemi Simülasyonu ile Mikrokapsüllerdeki Probiyotik Canlılığının *in vitro* Koşullarda Değerlendirilmesi

3.2.8.1. Simüle Sindirim Sistemi Sıvılarının Hazırlanması

Sindirim sistemi simülasyonunda kullanılmak üzere, simüle mide sıvısı (SMS) ve simüle bağırsak sıvısı (SBS) çözeltileri iki farklı sindirim sistemi simülasyonu çalışması göz önünde bulundurularak bazı modifikasyonlarla hazırlanmıştır [69,70]. Sindirim sistemi simülasyonunda, LGG için SMS pH değeri 3, EcN için SMS pH değeri 2.5 olarak belirlenmiştir. SBS pH değeri ise, her iki mikroorganizma için de 8'e ayarlanmıştır. Uygulamadaki bu farklılığın sebepleri Bölüm 4.7.1'de detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

Her iki çözelti için gerekli bileşenler ilgili pH değerine sahip steril PBS çözeltilerinde çözdürülmüştür. SMS ve SBS çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan sindirim sistemi bileşenleri ve konsantrasyonları Çizelge 3.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Sindirim sistemi simülasyonunda kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.

Çözelti	Bileşen	Konsantrasyon (mg/mL)
Simüle Mide Sıvısı	Pepsin	0.8
Simüle Bağırsak Sıvısı	Pankreatin	1
	Safra Tuzları	0.4

SMS çözeltisinin hazırlanması için öncelikle deneyde kullanılacak mikroorganizmaya göre pH'sı ayarlanmış olan PBS çözeltisi sterilize edilmiştir. Simülasyonun hemen öncesinde, steril PBS çözeltisine aseptik koşullar altında pepsin eklenmiştir. Çözeltinin son pH ayarlaması yapılarak, aseptik koşullar altında her bir steril deney tüpüne bu sıvıdan 5 mL aktarılmıştır.

SBS çözeltisinin hazırlanmasında ise pH 8'e ayarlanmış PBS çözeltisine, Çizelge 3.4.'te belirtilen konsantrasyonda safra tuzları eklenmiş ve çözdürülmüştür. Sterilize edilen safra tuzlu pH 8 PBS çözeltisine, simülasyondan hemen önce aseptik koşullar altında pankreatin eklenmiş ve çözdürülmüştür.

3.2.8.2. Sindirim Sistemi Simülasyonu

Sindirim simülasyonunun ilk aşaması olan mide simülasyonunda, farklı tüplerdeki 5 mL SMS çözeltisine mikrokapsül örneklerinden 1 g, serbest probiyotik çözeltilerinden ise 100 µl eklenmiştir. Santrifüj tüpleri içerisindeki örnekler 37 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 90 dakika boyunca 80 rpm'de çalkalanmıştır. Mide simülasyonunun 0., 45. ve 90. dakikalarında (T1, T2, T3) SMS çözeltisinden örnek alınarak seri dilüsyonları yapılmış ve ilgili katı besiyerlerine yüzeye yayma yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiştir.

Sindirim sisteminin ikinci aşaması olan bağırsak simülasyonuna geçişte, önceden hazırlanmış olan SBS çözeltisinden 5 mL alınarak mide simülasyonundan çıkmış örnekler 1:1 oranında eklenmiş ve karıştırılmıştır. Çözeltinin son pH'ı, 1 M steril NaOH çözeltisi kullanılarak 8'e ayarlanmıştır. Bu şekilde pepsin inaktivasyonu sağlanmış ve bağırsak koşulları simüle edilmiştir. Santrifüj tüpleri içerisindeki örnekler 37 °C'deki çalkalamalı inkübatörde 90 dakika boyunca 100 rpm'de çalkalanmıştır. Bağırsak simülasyonunun 0., 45. ve 90. dakikalarında (T4, T5, T6) SBS çözeltisinden örnek alınarak seri dilüsyonları yapılmış ve ilgili katı besiyerlerine yüzeye yayma yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiştir [69,70].

Serbest ve mikrokapsüllerde immobilize edilen probiyotiklerin canlı kalma yüzdesi (survival rate %) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Canlı kalma yüzdesi (\%)} = (N/N_0) \times 100$$

N; sindirim sistemi koşullarına maruz kaldıktan sonra (T2, T3, T4, T5, T6) canlı kalan hücre sayısı (kob/mL, g) iken, N₀ ise sindirim sistemi koşullarına maruz kalmadan önceki canlı hücre sayısıdır (T1) (kob/mL, g).

Her mikrokapsül örneği ve serbest probiyotik çözeltisi için 2 farklı santrifüj tüpünde sindirim sistemi simülasyonu gerçekleştirilerek 2 biyolojik tekrar gerçekleştirilmiştir. Her santrifüj tüpünden 2 farklı dilüsyon serisi hazırlanarak 2 teknik tekrar yapılmıştır. Toplam tekrar sayısı n=4'tür.

3.2.9. Meyve Suyu Analizleri

3.2.9.1. Probiyotik Meyve Suyu Numunelerinin Hazırlanması

Meyve suyu analizleri için; kontrol, serbest LGG içeren, LGG mikrokapsülü içeren, LGG simbiyotik mikrokapsülü içeren, serbest EcN içeren, EcN mikrokapsülü içeren, EcN simbiyotik mikrokapsülü içeren olmak üzere 7 ana grup belirlenmiştir. Her ana grupta 5 farklı günde gerçekleştirilecek analizler için 2'şer biyolojik tekrar oluşturacak şekilde toplam 10 steril santrifüj tüpüne 10'ar mL meyve suyu örneği aktarılmıştır. Grubuna göre her tüpe 1 g mikrokapsül veya 100 µl serbest probiyotik çözeltisi eklenmiştir. Tüplerin ağızları parafilmlemlenerek mühürlenmiş ve her örnek analiz günü belirtilecek şekilde etiketlenerek 4 °C'de depolamaya alınmıştır. Analiz günü gelen etiketli örnekler, depolaması devam eden diğer örnekler sarsılmadan buzdolabından alınmış ve analizlerine geçilmiştir.

Çizelge 3.5. Bu çalışmada ticari olarak sağlanan meyve suları ve besin değerleri.

Besin Değerleri	%100 Portakal Suyu (100 mL)	%100 Elma-Şeftali Suyu (100 mL)
Enerji (kJ/Kcal)	199/48	228/54
Yağ (g)	0.2	0.2
Doymuş Yağ (g)	0.05	0
Karbonhidrat (g)	10.9	12.5
Şeker (g)	10.9	11.8

Protein (g)	0.6	0.4
Lif (g)	0.1	0.1
Tuz	0.01	0

Canlılık analizi için hazırlanan örnekler analiz öncesinde mikrokapsüllerden probiyotik salınımının gerçekleşmesi için çalkalamalı inkübatörde inkübe edilirken; kalite analizi için hazırlanan örneklerde mikrokapsüllerin parçalanmaması istendiğinden herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan kalite analizleri gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan meyve suyu örnekleri 4 °C’de depolanarak, 0., 1., 7., 14. ve 35. günlerde canlılık analizleri ve kalite analizleri gerçekleştirilmiştir. Böylece depolama sırasında probiyotik canlılığındaki ve meyve suyunun kalite özelliklerindeki değişim belirlenmiştir.

3.2.9.2. Meyve Suyunun Depolanması Sırasında Probiyotik Canlılıklarının Belirlenmesi

Depolama süresince, meyve suyu örneklerinde bulunan canlı bakteri sayısındaki değişimleri belirlemek amacıyla depolamanın 0., 1., 7., 14. ve 35. günlerinde, 3.8.1’de belirtilen 7 gruba ait tüm örnekler 2 saat boyunca 37 °C’de 120 rpm’de çalkalanmış; daha sonra örneklerin seri dilüsyonları yapılarak yüzeye yayma yöntemi ile mikrobiyolojik sayımlar gerçekleştirilmiştir. Her örnekte 2 biyolojik, 2 teknik olmak üzere toplam 4 paralelden sonuç alınmıştır.

- LGG içeren dilüsyonlardan MRS agar besiyerine ekim gerçekleştirilerek 37°C’de anaerobik koşullarda 48 saat,
- EcN içeren dilüsyonlardan Lauryl Sulfate agar besiyerine ekim gerçekleştirilerek 37°C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılarak sonuçlar kob/g,mL cinsinden verilmiştir.

3.2.10. Probiyotik Meyve Suyunda Kalite Analizleri

3.2.10.1. pH Analizi

Hazırlanan probiyotik %100 meyve suyu örneklerinin pH değerleri, depolamanın 0., 1., 7., 14. ve 35. günlerinde pH metre ile ölçülmüştür. 2 paralelden örnek alınarak, okunan değerlerin ortalamaları hesaplanmıştır [71].

3.2.10.2. Meyve Suyunda Titrasyon Asitliği

Hazırlanan probiyotik %100 meyve suyu numunelerindeki titrasyon asitliği sitrik asit cinsinden belirlenmiştir. Bu işlem; TS 1125 ISO 750 Meyve ve Sebze Ürünleri – Titre Edilebilir Asitlik Tayini'ne göre gerçekleştirilmiştir [72]. Bunun için, 5 mL meyve suyu numunesi saf suyla 50 mL'ye seyreltilmiştir. Birkaç damla fenolftalein çözeltisi damlatılan örnek, sürekli karıştırılarak 0.1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Hafif pembe rengin kalıcı olduğu ilk nokta dönüm noktasıdır. Harcanan NaOH miktarı kaydedilmiş, aşağıdaki denklem kullanılarak numunedeki titrasyon asitliği sitrik asit cinsinden hesaplanmıştır.

$$TA \text{ (sitrik asit cinsinden)} = (V \cdot 0.64 \cdot 100) / V_0$$

V: Harcanan 0.1 N'lik NaOH hacmi (mL)

V₀: analiz numunesinin hacmi (mL)

TA: Titrasyon Asitliği (g/L)

3.2.10.3. Renk Analizi

Hazırlanan probiyotik %100 meyve suyu örneklerinde depolama süresince gerçekleşen renk değişimi, depolamanın 0., 1., 7., 14. ve 35. günlerinde Hunter L* a* b* sistemine sahip spektrofotometrik renk ölçer ile belirlenmiştir. Her analiz öncesinde cihazın kalibrasyonunu takiben meyve suyu örnekleri cihaza uygun küvetlere doldurulmuş ve her küvetin ön ve arka yüzeylerinden 2 farklı okuma yapılmıştır. Her örnek için 2 biyolojik tekrar gerçekleştirilmiş olup, toplam 4 paralelden sonuç alınmıştır.

3.2.10.4. Suda Çözünür Kuru Madde Miktarı Tayini

Bu analiz, TS 4890 Meyve ve sebze mamulleri- Çözünür katı madde miktarı tayini- Refraktometrik metot'a göre gerçekleştirilmiştir [73]. Hazırlanan probiyotik %100 meyve suyu numunelerinin suda çözünür kuru madde miktarları el refraktometresi kullanılarak belirlenmiştir. Her örnek için 2 paralelden sonuç alınmıştır.

3.2.11. Duyusal Analizler

Elde edilen meyve suyu örneklerinin organoleptik olarak değerlendirilmesi Dimes İzmir Fabrikasında, duyusal analiz üzerine eğitilmiş iki kalite kontrol mühendisi tarafından yapılmıştır. Ankara'dan kargo yoluyla gönderilen numuneler, depolanmalarının 14. ve 35. günlerinde Dimes ekibi tarafından değerlendirmeye alınmıştır. Renk, kıvam/akışkanlık, koku, aroma, asitlik / ekşilik, ağızda kalan tat ve genel beğeni olmak üzere 7 kriter belirlenmiş olup, katılımcılar değerlendirmelerini 5 noktalı hedonik skalaya göre (1: hiç beğenmedim, 5: çok beğendim) yapmışlardır.

3.2.12. İstatistiksel Analiz

Enkapsülasyon verimi ve sindirim sistemi simülasyonu analizlerinden elde edilen veriler üzerinde, Tukey'in Dürüstçe Anlamlı Fark çoklu karşılaştırma testleri (Tukey HSD) ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. $p \leq 0.05$ anlamlı fark olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel analizlerde JMP (Trial 15.2.1) yazılımı kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Probiyotik mikroorganizmaların çeşitli kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisi ve genel bağışıklığın kuvvetlendirilmesi üzerine etkileri ve önemi, bugün daha iyi anlaşılmıştır. İsteyen herkesin probiyotik gıdaya ulaşmasının sağlanabilmesi için probiyotik gıda yelpazesinin genişletilmesi ve ürün sayısının artırılması gerekmektedir. Özellikle Covid-19 pandemisiyle birlikte bu ürünlere artan talebin karşılanması önem arz etmektedir.

Türkiye'deki probiyotik gıda pazarının yalnızca süt ürünleri temelinde genişlemiş olması, bu ürünlerin tüketimindeki sınırlamaları ortadan kaldırmamaktadır. Bazı insanların intolerasyon veya otoimmün hastalıklar sebebiyle süt ürünü tüketemediği veya beslenme yönelimleri bakımından bu ürünleri tüketmeyi tercih etmediği günümüz dünyasında, farklı gıda kategorilerinde probiyotik gıdaların geliştirilmesi ve üretilmesi önemlidir.

Bu tez çalışmasında, sektördeki probiyotik ürün yelpazesinin artırılma ihtiyacı göz önünde bulundurularak bitki temelli bir probiyotik ürünün geliştirilmesi amaçlanmış ve bunun için ticari olarak üretilen %100 ibareli pastörize portakal ve elma-şeftali meyve suları kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında LGG ve EcN probiyotiklerinin öncelikle aljinat-selüloz asetat fitalat ve ksantan gam-jellan gam karışımları ile ayrı ayrı enkapsülasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mikrokapsüller her iki mikroorganizma için de karakterize edilmiş ve enkapsülasyon verimleri hesaplanmıştır. Mikrokapsüllerin sindirim sistemi simülasyonu başarısı ve meyve suyuna uygunluğuna yönelik en iyi sonucu veren polimer kombinasyonu belirlenmiştir.

Burada, ilki, probiyotiklerin polimer çözeltisiyle ile direkt olarak enkapsülasyonu ve ikincisi polimerlere ek olarak prebiyotiklerin de eklendiği çözeltiyle probiyotiklerin simbiyotik enkapsülasyonu olmak üzere iki farklı enkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Her iki enkapsülasyonda da enkapsülasyon ajanı olarak; bir önceki aşamada gerçekleştirilen karakterizasyon ve enkapsülasyon verimi değerlendirmelerinde en başarılı sonucu veren

polimer kombinasyonu kullanılmıştır. Elde edilen mikrokapsüllerin karakterizasyonu yapılmıştır.

Sindirim sistemi simülasyonu gerçekleştirilerek enkapsüle probiyotiklerin sindirim sistemi koşullarına dayanıklılığı sindirim sistemi simülasyonu ile değerlendirilmiştir.

Probiyotik mikrokapsülleri ve enkapsüle edilmemiş probiyotik hücreleri farklı numuneler halinde %100 portakal ve %100 elma-şeftali suyuna eklenmiş ve 35 gün boyunca kontrol örnekler ile aynı koşullarda depolanmıştır. Depolama süresi boyunca belirli aralıklarla meyve suyu örneklerindeki probiyotiklerin canlılıkları belirlenmiştir.

Kontrol grubu ile beraber probiyotik eklenen meyve suyu örneklerinde kalite analizleri ve duyu analizler gerçekleştirilmiştir.

4.1. Probiyotik Mikroorganizma Suşlarının Canlandırılması ve Stok Kültür Eldesi

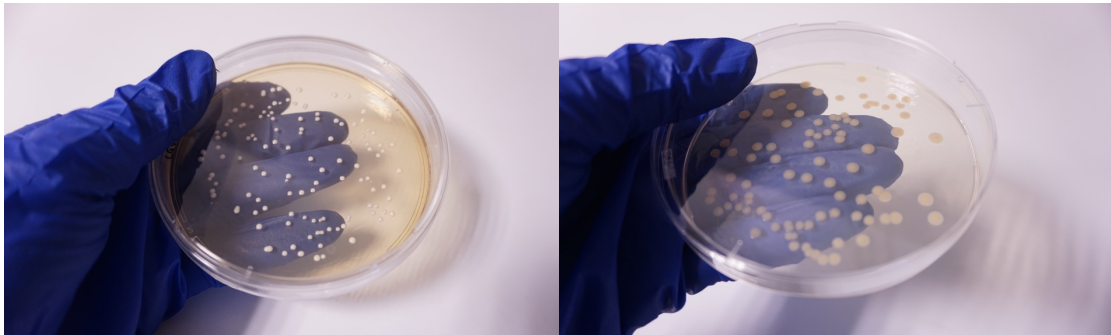
Tez kapsamında LGG ve EcN probiyotik mikroorganizmaları kullanılmıştır. Bu mikroorganizmaların ikisinin de probiyotik özellik göstermelerine rağmen, filogenetik sınıflandırmada birbirlerinden uzak olmaları ve farklı metabolik özelliklere sahip olmaları bakımından; enkapsülasyon işlemine, sindirim sistemi simülasyonuna ve meyve suyunda depolamaya verecekleri tepkiler çalışma kapsamında değerlendirilmiştir.

Liyofilize formdaki kültürler sıvı besiyerlerinde canlandırıldıktan sonra tek koloni düşürülerek LGG ve EcN saf kültürleri elde edilmiştir. Probiyotik bakterilerin izolasyon sürecine ait bilgiler Çizelge 4.1.'de verilmiştir. İzolatlar HU kodu ile kayıt altına alınarak Hacettepe Üniversitesi FoodOmics laboratuvarında -20 °C'de depolanmaktadır.

Çizelge 4.1. Probiyotik bakterilere ait saf kültürlerinin eldesi.

Mikroorganizma Kodu	Probiyotik Bakteri	Canlandırma Koşulları	Sıvı Besiyerinde Gelişme	Tek Koloni Düşürme Koşulları	Saf Kültür Eldesi
HUF18SOT1001	LGG	MRS Broth, 37 °C, 18 saat	+	MRS Agar, 37 °C, 48 saat, anaerobik ortam	+
HUF19SPT1001	EcN	Lauryl Sulfate Broth, 37 °C, 18 saat	+	Lauryl Sulfate Agar, 37 °C, 24 saat, aerobik ortam	+

Elde edilen saf kültürlerin yüzeye yayma metoduyla [66] katı besiyerine ekimleri ve takiben uygun koşullarda inkübasyonu sonucunda Şekil 4.1.'deki koloniler elde edilmiştir. LGG kolonileri parlak-kremsi görüntüde besiyerinde çok yayılmadan kümülatif bir görüntü oluştururken; EcN kolonileri mat-sarı renktedir ve hücreler üst üste birikmek yerine besiyerinde yayılım göstererek daha büyük çapta kolonilerin oluşmasını sağlarlar.



(LGG)

(EcN)

Şekil 4.1. Probiyotik bakterilerden elde edilen saf kültürlerine ait katı besiyerlerindeki koloni görüntüleri.

4.2. Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması

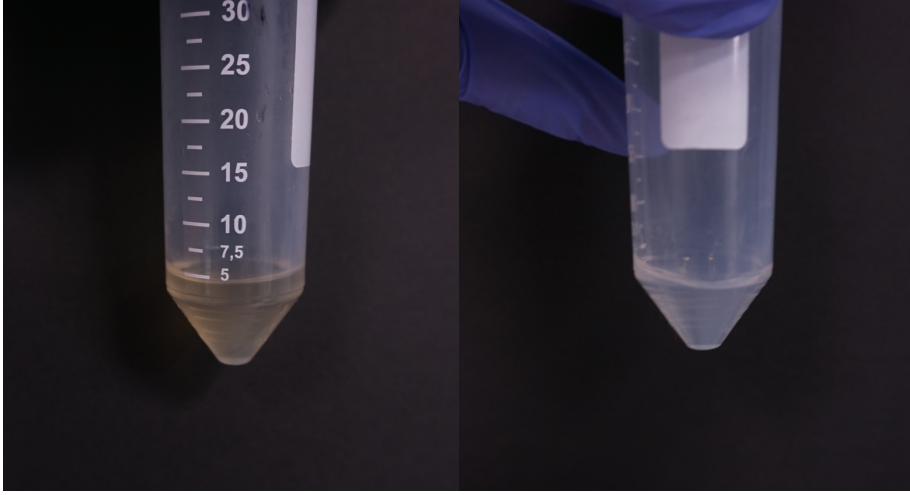
Enkapsülasyonda kullanılan polimerler, etkili bir enkapsülasyon işleminin gerçekleştirilmesinde büyük bir öneme sahiptir. Polimerlerin jel oluşturabilecek ve mikron boyutunda damlacıkların oluşmasına izin verecek özellikte olması, aynı zamanda işleneceği gıda ürününe olan uyumu dikkat edilmesi gereken parametrelerdendir. Çalışma kapsamında probiyotik süt ürünlerine alternatif olabilecek bir ürün geliştirilmek istendiğinden, literatürdeki enkapsülasyon çalışmalarında iyi enkapsülasyon etkinliği oluşturduğu belirtilmesine rağmen, enkapsülasyon materyali olarak whey protein izolatu veya kitosan gibi hayvansal kaynaklı polimerlerin kullanımı tercih edilmemiştir [74–77]. Bununla beraber, mikrokapsüllerin meyve suyunda depolanacak olması göz önünde bulundurularak enkapsülasyon materyallerinin depolama süresince bütünlüğünü koruyabilmesi ve meyve suyuna bakteri salınımının minimum düzeyde tutulabilmesi bakımından asit toleransı yüksek olan polimerlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Poroz nişastanın gözenekli yapısı sayesinde mikroorganizmaları yapılarına alabildikleri ve bu polimerle etkin bir enkapsülasyon işleminin gerçekleştirilebildiği [78,79] çalışmalarda belirtilse de; işlenecek ürünün meyve suyu olması sebebiyle bu gözenekli yapının fayda sağlamayacağı, aksine sıvı ortamın mikrokapsül içerisine girerek probiyotik bakterilerin olumsuz ortam koşullarından yeterince korunamayacağı öngörülmüştür. Benzer şekilde aljinatta da gözenekli yapının varlığı literatürde bildirilmektedir [47]. Aljinatın tek başına enkapsülasyon polimeri olarak kullanılmasında; asit toleransının düşük olduğu ve bu yüzden asidik ortamlarda mekanik stabilitesini sağlayamayarak kapsül bütünlüğünü koruyamadığı çalışmalarda bildirilmiştir [80].

XG-GG ile yapılan enkapsülasyon çalışmalarında bu polimerlerin jelleşme gösteren diğer karbonhidrat polimerlerine göre asit toleranslarının daha yüksek olduğu ve asidik koşullarda probiyotik mikroorganizmaların korunmasında daha başarılı sonuç verdikleri belirtilmiştir [14,50]. CAP polimerinin ise asidik ortamda çözünmediği, bazik ortamda kontrollü bir şekilde çözüldüğü ve bu özelliklerinden dolayı ilaç sanayiinde etken maddelerin bağırsakta kontrollü salınımına olanak sağlaması bakımından kullanıldığı literatürdeki çalışmalarda belirtilmiştir [6,46,48,81]. Bu polimerin enkapsülasyon işleminde kullanılmasının önündeki engel ise jel oluşturamamasıdır. Bu sebeple jel oluşturma özelliği olan başka polimerlerle birlikte kullanılabilmesi düşünülmüştür. Literatürde ALG-CAP polimer karışımlarının enkapsülasyonda kullanıldığı çalışmalarda,

CAP polimerinin eklenmesiyle ALG polimerinin asit toleransının artırılabilirdiği belirtilmiştir [12]. Bahsi geçen 4 polimerin (XG, GG, ALG, CAP) de bitkisel kaynaklı olması, çalışmanın probiyotik süt ürünlerine alternatif bir probiyotik gıda geliştirme hedefiyle uyuşmaktadır. Yapılan literatür araştırmasında, şimdiye kadar, XG-GG ve ALG-CAP karşılaştırmasına dair başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Kullanılacak polimerlere karar verildikten sonra, enkapsülasyon materyali olarak kullanılacak polimer konsantrasyonlarının belirlenmesinde literatürdeki çalışmalar incelenmiştir [12,14]. Bu bilgiler ışığında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan polimer zlteleriyle enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilerek, en iyi verimin alındığı, sindirim sistemi koşullarına en dayanıklı mikrokapsüller belirlenmek istenmiştir.

Çizelge 3.2.'de belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan polimer zlteleri santrifüj tüplerine aktararak sterilize edilmiştir. Steril polimer zlteleri şekil 4.2.'de görülmektedir. ALG:CAP zlteleri krem-sarı rengine ve akışkan formda iken, XG:GG zltelerinin yarı saydam-beyaz renkte ve oda sıcaklığında viskoz yapıda olduğu gözlenmiştir. Polimer zltelerindeki akışkanlığın optimum seviyede olabilmesi ve probiyotikler için en iyi ortamın sağlanabilmesi için polimer zlteleri enkapsülasyon öncesinde steriliteleleri bozulmadan 37 C'de 20 dk bekletilmiştir. Ayrıca, simbiyotik enkapsülasyonda kullanılan inülin içeren polimer karışımlarında, polimer zltelerinin fiziksel özelliklerinde farklılık gözlenmemiştir.



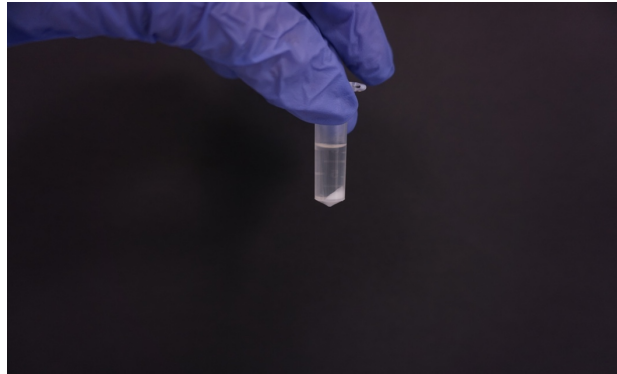
(ALG:CAP)

(XG:GG)

Şekil 4.2. Steril polimer çözeltileri.

4.3. Probiyotik Bakteri Çözeltilerinin Hazırlanması

Enkapsülasyondan 18 saat önce LGG ve EcN stok kültürlerinden canlandırma yapılarak enkapsülasyonda kullanılacak saf probiyotiklerin gelişmesi sağlanmıştır. Şekil 4.3.'te probiyotik hücrelerinin yıkama işlemi sırasında santrifüj sonrası oluşturduğu pellet görülmektedir. Her iki mikroorganizmada da aynı görüntüde pellet elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Probiyotik bakteri çözeltilerinin hazırlanmasında hücre pelletinin eldesi.

4.4. Probiyotiklerin Mikroenkapsülasyonu

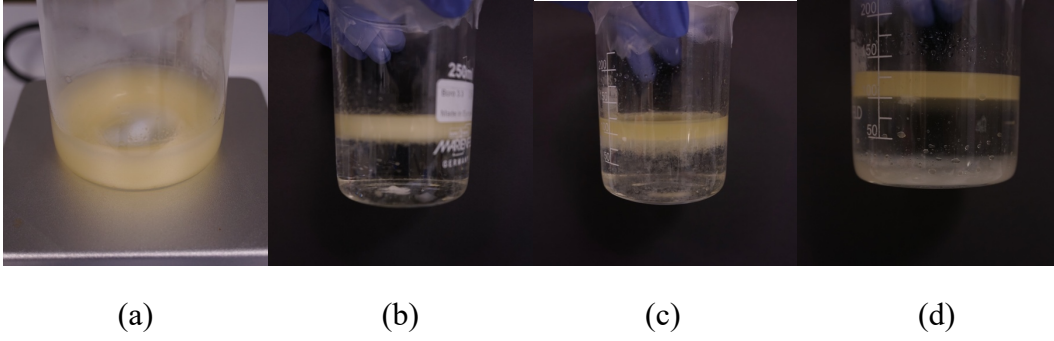
Probiyotik mikroorganizmaların ortam koşullarına olan duyarlılığı, bu mikroorganizmaların gıdalara işlenmesini zorlaştıran etmenlerden biridir. Bir gıdanın

probiyotik gıda olarak adlandırılabilmesi için en az 1.0×10^6 kob/g canlı probiyotik mikroorganizmanın bulunması gerekmektedir [82]. Gıdanın üretiminden başlayıp tüketimine kadar geçen depolama süresinde bu canlı probiyotik seviyesinin korunması önemlidir. Enkapsülasyon işleminin, bu mikroorganizmaları olumsuz ortam koşullarından koruyabildiği literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir [83]. Bu sebeple, probiyotiklerin meyve suyunda kullanılabilirliğinin araştırıldığı bu çalışmada, enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Probiyotik mikroorganizmaların enkapsülasyonunda farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan ekstrüzyon yönteminde kapsül oluşumu için şırınga kullanılması durumunda mikron çapında kapsüller elde edilememektedir. Ekstrüder cihazı kullanılması durumunda ise kapsüller mikron boyutunda elde edilebilmektedir fakat bu durumda da cihaz maliyet oluşturmaktadır. Ayrıca bu yöntem ile tek seferde fazla miktarlarda mikrokapsül üretimi yapılamamaktadır [45]. Bu tez çalışmasında enkapsülasyon metodu olarak, manyetik karıştırıcı dışında cihaz gerektirmemesi, karıştırma hızının değiştirilmesiyle ihtiyaca göre farklı boyutlarda mikrokapsül eldesine imkân vermesi, istendiğinde tek seferde fazla miktarda mikrokapsül üretiminin sağlanabilmesi bakımından emülsiyon yönteminin kullanılması tercih edilmiştir. Ayrıca, enkapsülasyon işleminin bakteri canlılığının korunmasına olan etkisinin objektif bir şekilde değerlendirilebilmesi için kullanılacak metodun mikroorganizmaları strese sokmayacak özellikte olmasına da dikkat edilmiştir. Sprey kurutma metoduna kıyasla emülsiyon yöntemi bu bakımdan oldukça narin bir enkapsülasyon işlemine olanak sağlamaktadır.

Çalışmada, bir önceki basamakta hazırlanan probiyotik bakteri çözeltilisi ile polimer çözeltilerinin karıştırılmasından hemen sonra enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4.'te emülsiyon metodu ile enkapsülasyon aşamalarına ait görseller bulunmaktadır. Şekil 4.4. (a)'da yağ ve Tween 80 karışımı ile polimer-probiyotik karışımlarının emülsiyon oluşturma aşaması görülmektedir. Şekil 4.4. (b)'de CaCl_2 solüsyonunun eklenmesi ile emülsiyonun kırıldığı ve faz ayrımının gerçekleştiği an görülmektedir. Yağ fazı içerisinde oluşan mikrokapsüllerin su fazına geçişi Şekil 4.4. (c)'de gösterilmiştir. Şekil 4.4. (d)'de 2 saatlik bekleme süresinin sonunda tüm

mikrokapsüllerin su fazına geçerek beherin tabanına çöktüğü görülmektedir. Enkapsülasyon işlemine ait bu aşamalarda, LGG ve EcN probiyotik bakterileri ve farklı polimer kombinasyonları için aynı görüntüler elde edilmiştir. Simbiyotik mikroenkapsülasyonda da aşamalara ait görüntülerde bir değişiklik bulunmamaktadır.



Şekil 4.4. Enkapsülasyon aşamaları.

a: Emülsiyon oluşumu; b:Faz ayrımı; c:Mikrokapsüllerin su fazına geçişi; d:Tüm mikrokapsüllerin beherin tabanında toplanması.

Sonuç olarak, emülsiyon yöntemi, uygulaması kolay, pahalı cihazlar gerektirmeyen, mikroorganizmaları strese sokmayan, yüksek verimde mikrokapsül eldesine izin veren, tek seferde fazla miktarda mikrokapsül üretimine adaptasyonu mümkün olan (bottom-up) ve mikron boyutunda kapsül üretiminin sağlanabildiği (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.) bir yöntemdir. Buna karşın, işlem sırasında yağ kullanılması ekstra bir maliyet oluşturmaktadır. Yöntemin uygulanmasındaki tek zorluk kapsüllerin yağ fazından tamamen ayrılmasının sağlanmasıdır. Çalışma kapsamında gerekli optimizasyon basamaklarının yürütülmesiyle bu problemin aşıldığı görülmüştür.

4.5. Mikrokapsüllerdeki Probiyotik Canlılığının Belirlenmesi ve Enkapsülasyon Verimi

Mikrokapsüllerden salınan canlı probiyotik hücre sayısının, enkapsülasyonda kullanılmak üzere hazırlanan probiyotik çözeltilinde bulunan canlı mikroorganizma sayısına oranı enkapsülasyon verimini belirtmektedir.

Bu tez çalışmasında, emülsiyon yönteminin kullanıldığı, farklı polimerlerle ve mikroorganizmalarla gerçekleştirilen enkapsülasyonlar sonucunda, %83 ile %97 arasında enkapsülasyon veriminin sağlandığı Çizelge 4.2’de görülmektedir. Buna göre; tüm mikrokapsüllerin içerisinde en yüksek enkapsülasyon verimi 97.26 ± 1.77 ile LGG 1XG:1GG mikrokapsülünde, en düşük verim ise 82.87 ± 1.78 ile LGG 0.5XG:1GG mikrokapsülünde elde edilmiştir. Aynı polimer çözeltileriyle EcN’de sırasıyla 83.58 ± 1.35 ve 93.94 ± 1.79 oranlarında enkapsülasyon verimi elde edilmiştir. Bir mikroorganizma için en yüksek enkapsülasyon veriminin sağlandığı polimer karışımında, diğer mikroorganizma için en düşük verimin alınması, enkapsülasyon verimlerinin kullanılan polimerlerden bağımsız olarak değiştiğinin bir göstergesidir.

Daha önce, emülsiyon yöntemi ile %80 ile %95 arasında enkapsülasyon verimi sağlandığı literatürde belirtilmiştir [35]. Buna göre, bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar enkapsülasyon işlemlerinin başarıyla gerçekleştirildiğinin göstergesidir.

Çeşitli çalışmalarda, enkapsülasyon verimine ait değerler, enkapsülasyondan sonra canlı kalan mikroorganizma olarak tanımlanmaktadır [74]. Bu kısmen doğru bir önermedir. Sprey kurutma gibi sert koşulların uygulandığı yöntemlerde, üretilen tüm mikrokapsüllerin içerisinde sisteme beslenen probiyotiklerin tamamının bulunması beklendiğinden, enkapsülasyon verimindeki düşüş probiyotiklerin enkapsülasyon işlemi sırasında canlılığını yitirmesi ile ilişkilendirilebilir. Diğer taraftan, emülsiyon gibi ılımlı bir yöntemde enkapsülasyon verimlerindeki farklılıkların, probiyotiklerin işlem sırasında zarar görüp ölmesiyle değil; probiyotiklerin tamamının mikrokapsüller içerisinde hapsedilememesi ihtimaliyle, dolayısıyla serbest mikroorganizmaların enkapsülasyon sonrası uzaklaştırılan yağ ve yıkama çözeltileriyle beraber ortamdan ayrılmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında enkapsülasyon verimlerinde farklı sonuçların alınması kullanılan polimer çözeltileriyle ve mikroorganizma türü ile ilişkilendirilememekle beraber, literatürdeki emülsiyon yönteminin kullanıldığı enkapsülasyon işlemlerinde sağlanan %80’in üzerindeki enkapsülasyon verimiyle uyumlu sonuçlar alınmıştır.

Çizelge 4.2. Enkapsülasyon verimi (%).

	Mikrokapsül Örneği	N (log kob/g)	N₀ (log kob/mL)	%EV
LGG Mikrokapsülleri	LGG 3ALG:1CAP	6.42±0.16	7.48±0.18	85.87±2.14 ^{cd} _{DEF}
	LGG 1XG:1GG	7.97±0.15	8.20±0.05	97.26±1.77 ^a _A
	LGG 3ALG	7.95±0.08	8.71±0.43	91.33±0.90 ^b _{BC}
	LGG 3ALG:0.75CAP	8.56±0.20	8.86±0.12	96.68±2.34 ^a _A
	LGG 0.5XG:1GG	7.15±0.15	8.63±0.35	82.87±1.78 ^d _F
LGG Simbiyotik Mikrokapsülleri	LGG 3ALG:1CAP:2INU	7.36±0.16	7.64±0.11	96.33±2.03 ^a _A
	LGG 1XG:1GG:2INU	7.53±0.16	8.54±0.01	88.22±1.87 ^{bc} _{CDE}
EcN Mikrokapsülleri	EcN 3ALG:1CAP	7.10±0.21	8.06±0.02	88.05±2.55 ^{xy} _{CDE}
	EcN 1XG:1GG	6.98±0.11	8.35±0.02	83.58±1.35 ^z _{EF}
	EcN 3ALG	8.08±0.18	8.67±0.17	93.24±2.05 ^w _{AB}
	EcN 3ALG:0.75CAP	7.20±0.18	8.15±0.46	88.35±2.18 ^{xy} _{CD}
	EcN 0.5XG:1GG	8.43±0.16	8.98±0.11	93.94±1.79 ^w _{AB}
EcN Simbiyotik Mikrokapsülleri	EcN 3ALG:1CAP:2INU	7.09±0.10	7.77±0.05	91.23±1.29 ^{wx} _{BC}
	EcN 1XG:1GG:2INU	7.16±0.12	8.36±0.03	85.60±1.41 ^{yz} _{DEF}

N: mikrokapsüllerden salınan canlı mikroorganizma sayısı; N₀: Probiyotik çözeltisindeki canlı mikroorganizma sayısı; %EV: enkapsülasyon verimi yüzdesi. N ve %EV sonuçları dört paralelin ortalaması olarak; N₀ sonuçları ise 2 paralelin ortalaması ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

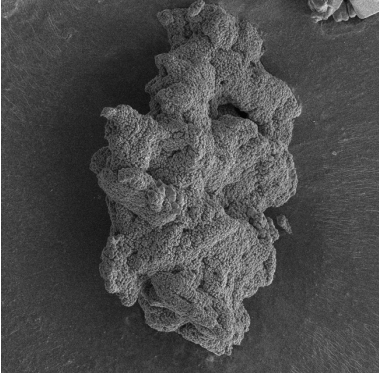
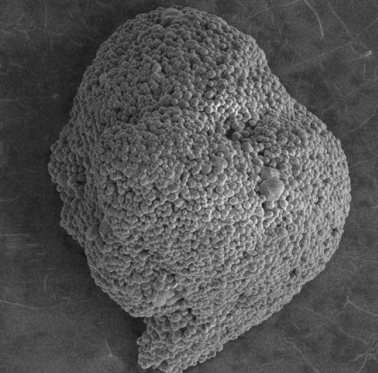
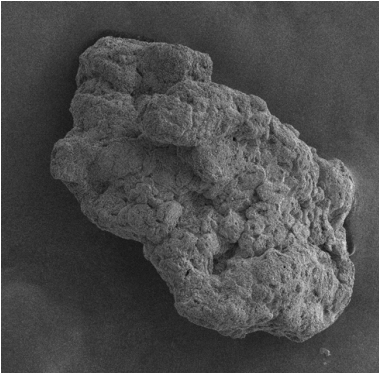
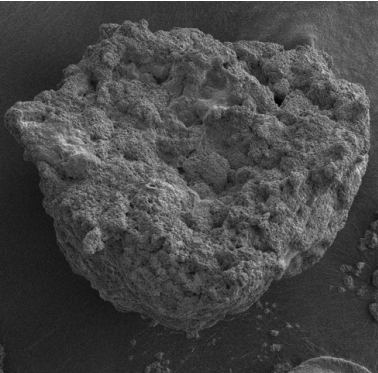
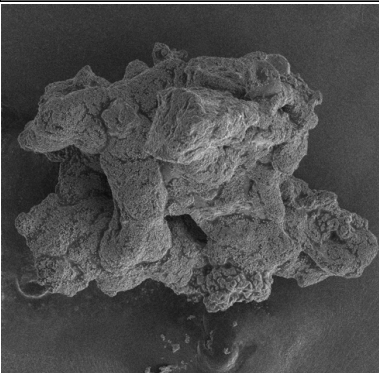
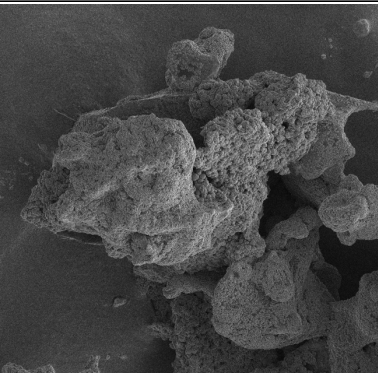
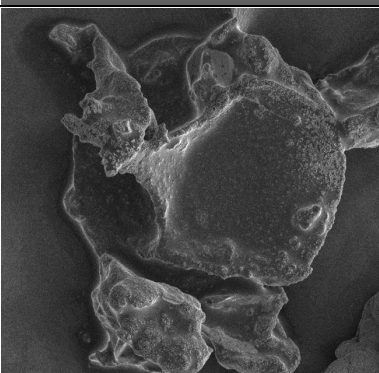
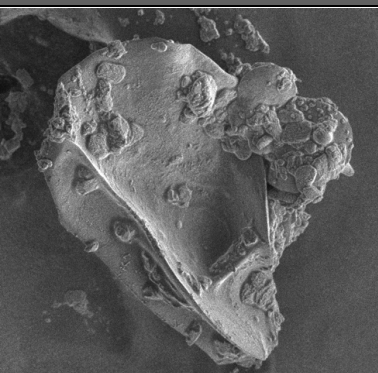
a-d; w-z... şeklinde gösterilen farklı harfler farklı LGG ve EcN mikrokapsüllerinin kendi aralarındaki anlamlı farklılığını ifade etmektedir ($p \leq 0.05$). ABC... şeklinde gösterilen farklı harfler tüm farklı mikrokapsüller arasındaki anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p \leq 0.05$).

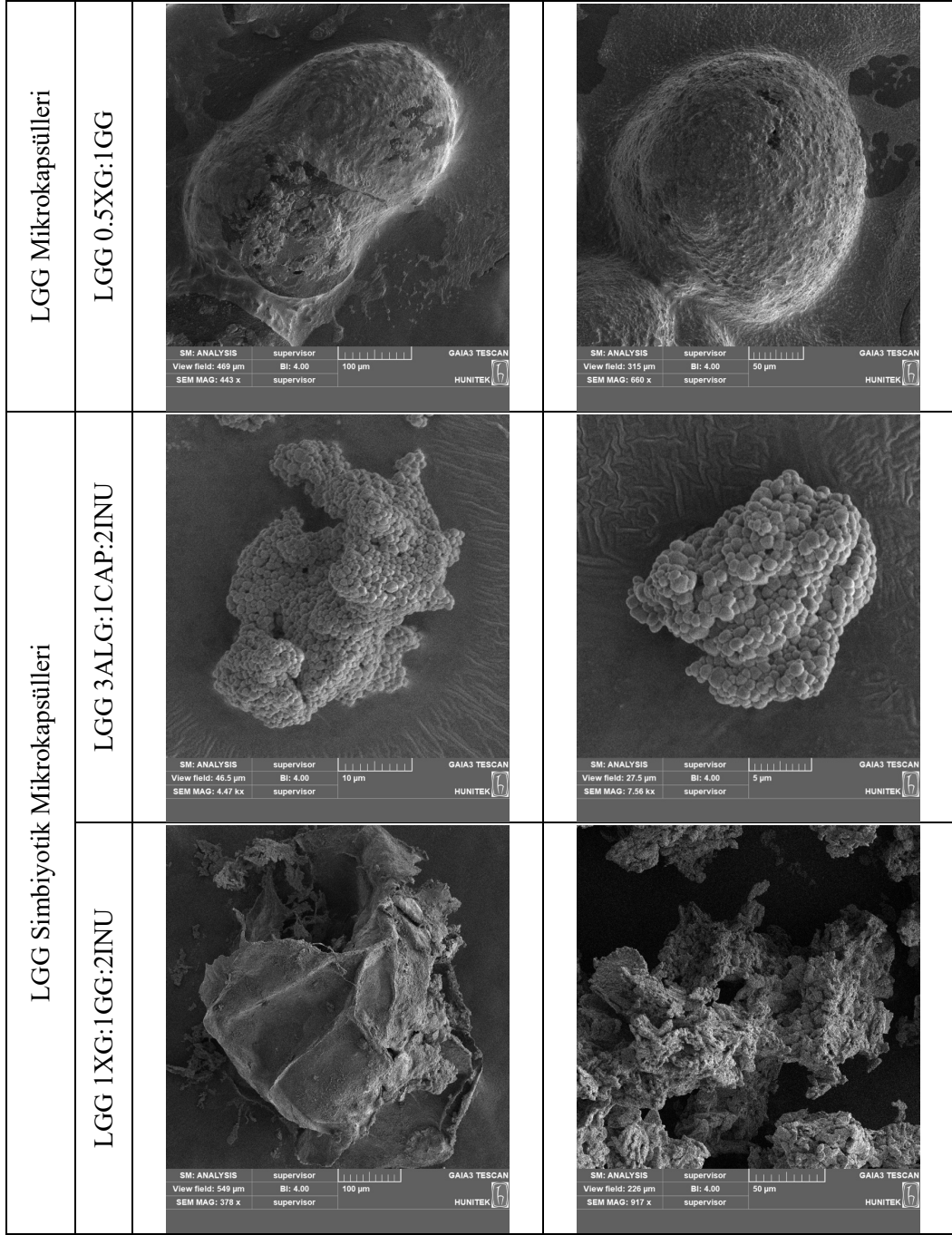
4.6. SEM Analizi ile Mikrokapsüllerin Morfolojik Karakterizasyonu

Üretilen tüm mikrokapsül örnekleri 36 saat boyunca $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, 0.070 mbar vakum altında liyofilize edilmiştir. Liyofilize örnekler SEM analizi için örnek tutuculara yerleştirilmiş ve altın-paladyum ile kaplanmıştır. SEM analizleri, tekrar olması için için iki farklı cihazda gerçekleştirilmiştir ve her numune için anlamlı görüntülerin elde edildiği cihaz görüntüsü seçilmiştir. Hacettepe Üniversitesi HÜNİTEK bünyesinde elde edilen görüntüler FIB-SEM, Bilkent UNAM bünyesinde elde edilen görüntüler ise ESEM olarak belirtilmiştir. Şekil 4.5 ve 4.6'da LGG mikrokapsüllerinin, Şekil 4.7. ve 4.8.'de ise EcN mikrokapsüllerinin SEM mikrografları görülmektedir.

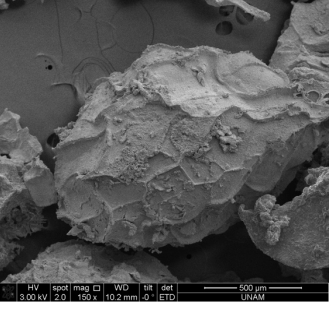
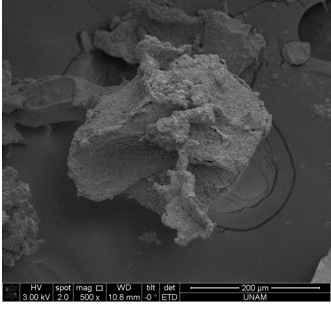
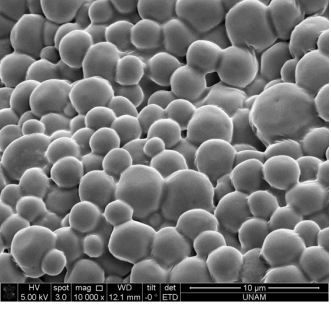
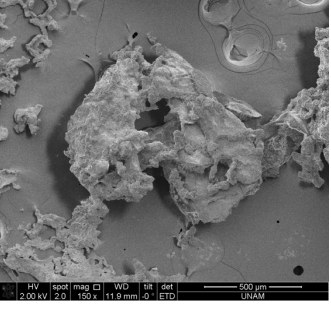
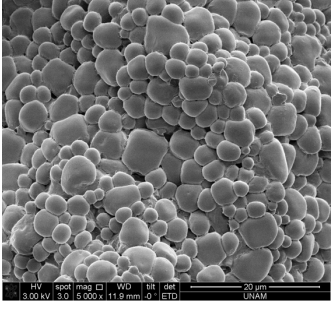
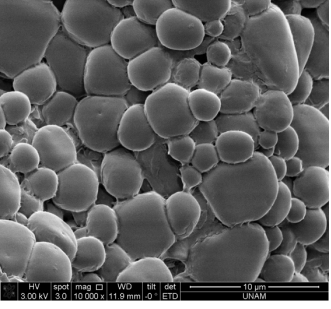
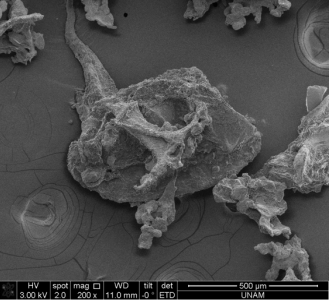
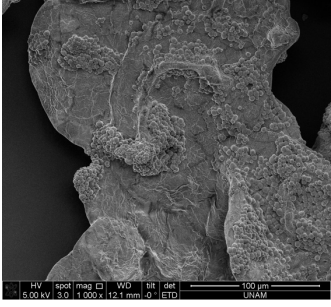
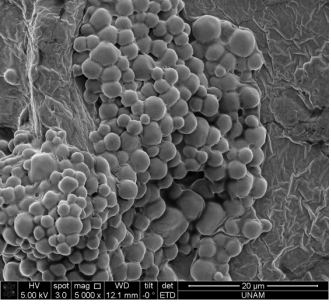
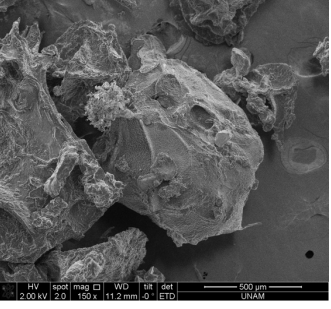
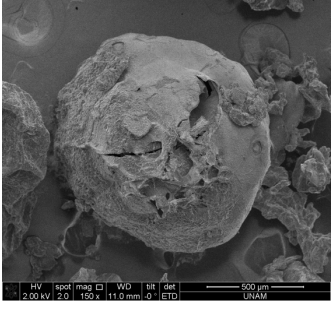
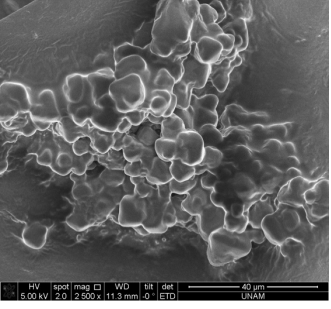
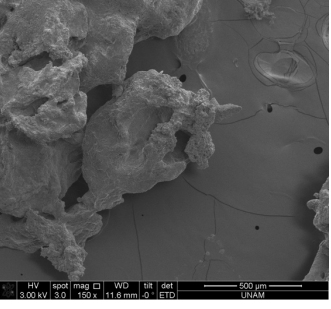
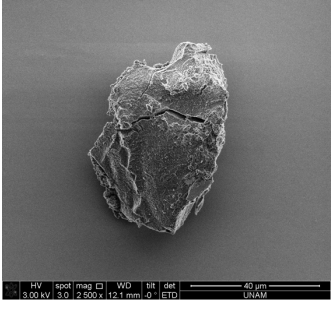
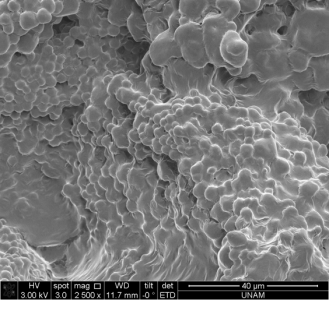
Tüm mikrokapsül örneklerinin SEM görüntülerinde mikron boyutunda kapsüllerin elde edildiğinin görülmesiyle beraber, kapsül boyutları değişiklik göstermektedir. Kapsül biçimleri düzensizdir ve bu durum emülsiyon yöntemiyle elde edilen mikrokapsüllerde beklenen bir durumdur. Tüm örneklerin SEM mikrografları incelendiğinde, aynı örneğe ait farklı boyutlarda mikrokapsüller elde edildiği görülmektedir. Göreceli olarak büyük çaptaki bazı mikrokapsüllerin ($>200\text{ }\mu\text{m}$) yüzeylerine yaklaşıldığında $2\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$ büyüklüğündeki çok sayıda mikrokapsülün bir araya gelerek büyük yapıları oluşturduğu veya büyük bir kapsülün yüzeyine çok sayıda küçük kapsülün yapıştığı görülmektedir.

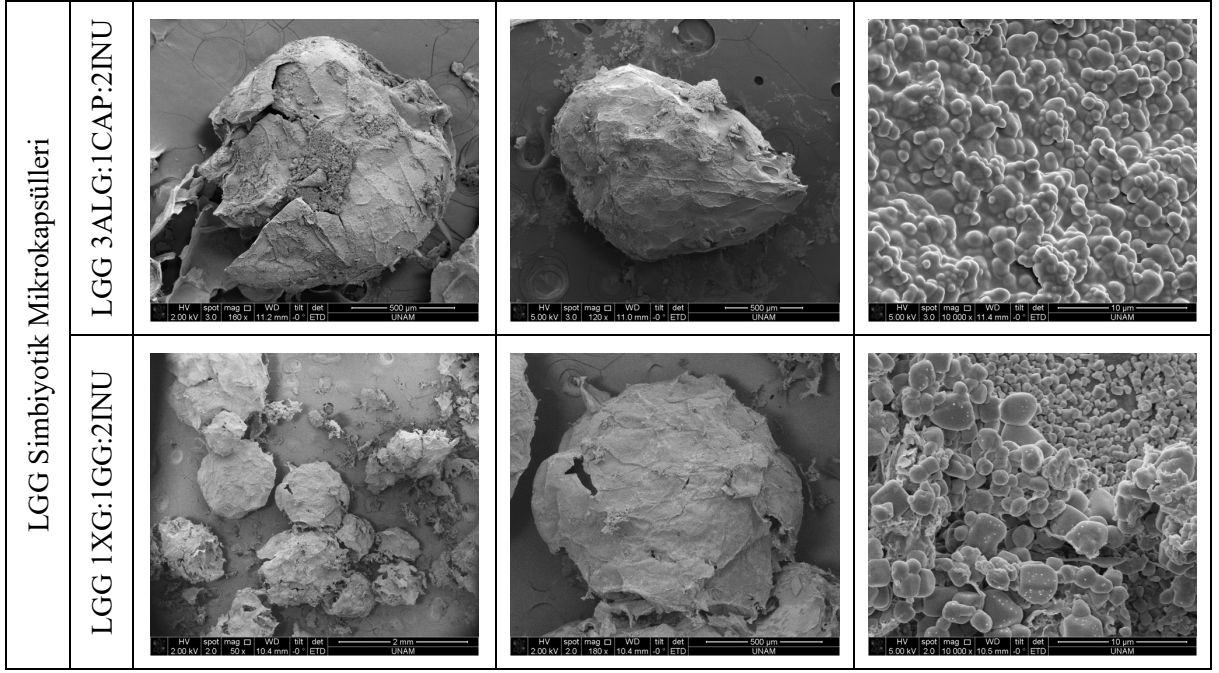
LGG aljinat-silika mikrokapsüllerinin değerlendirildiği bir çalışmada, silika ile kaplanmayan aljinat mikrokapsüllerinin liyofilizasyon sonrası küresel yapısını büyük ölçüde kaybettiği, kaplama yapılanlarda ise bu yapının daha iyi korunduğu belirtilmektedir [84]. Bu yoruma dayanarak, bu tez çalışmasında, SEM analizi öncesi gerçekleştirilen liyofilizasyon işlemi sırasında kapsül biçimlerinde değişiklikler olmuş olabilir.

LGG Mikrokapsülleri	LGG 3ALG:1CAP	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI3 TESCAN View field: 169 µm Bi: 4.00 50 µm SEM MAG: 1.23 kx supervisor HUNITEK</p>	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI3 TESCAN View field: 65.3 µm Bi: 4.00 20 µm SEM MAG: 3.18 kx supervisor HUNITEK</p>
	LGG 1XG:1GG	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI3 TESCAN View field: 361 µm Bi: 4.00 100 µm SEM MAG: 576 x supervisor HUNITEK</p>	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI3 TESCAN View field: 228 µm Bi: 4.00 50 µm SEM MAG: 909 x supervisor HUNITEK</p>
	LGG 3ALG	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI3 TESCAN View field: 345 µm Bi: 4.00 100 µm SEM MAG: 602 x supervisor HUNITEK</p>	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI3 TESCAN View field: 372 µm Bi: 4.00 100 µm SEM MAG: 558 x supervisor HUNITEK</p>
	LGG 3ALG:0.75CAP	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI3 TESCAN View field: 511 µm Bi: 4.00 100 µm SEM MAG: 407 x supervisor HUNITEK</p>	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI3 TESCAN View field: 287 µm Bi: 4.00 50 µm SEM MAG: 724 x supervisor HUNITEK</p>



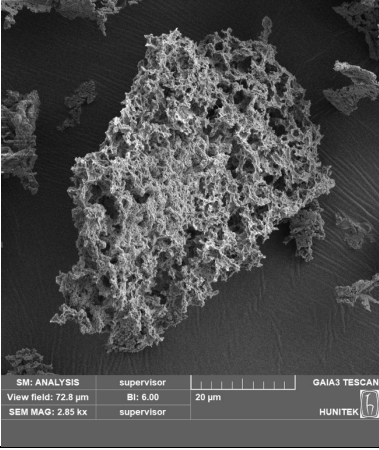
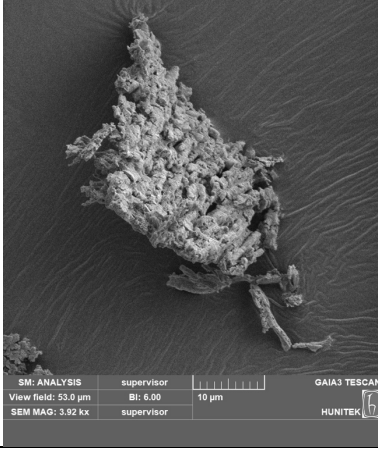
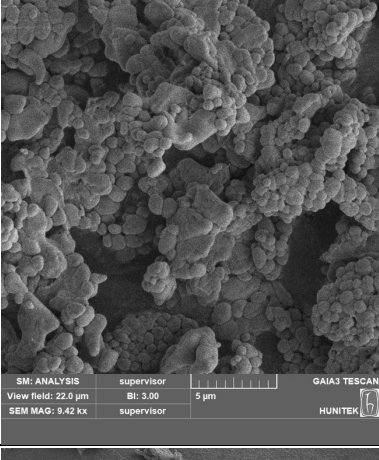
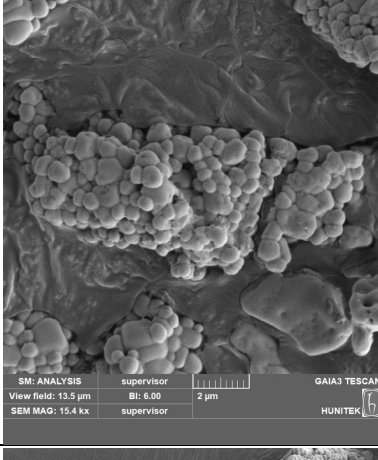
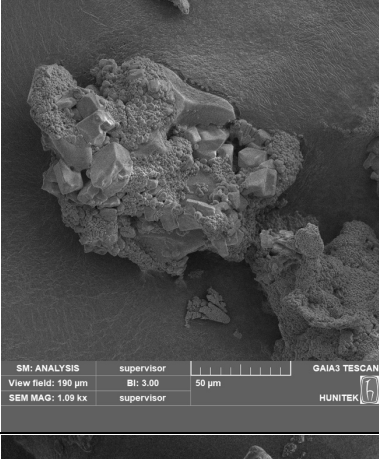
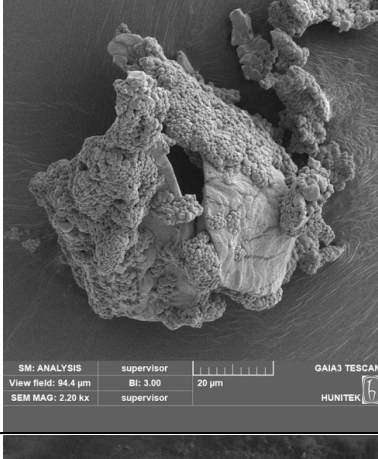
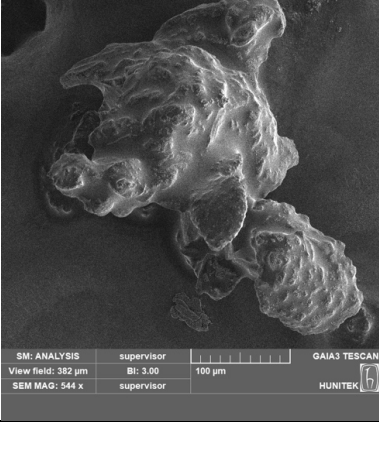
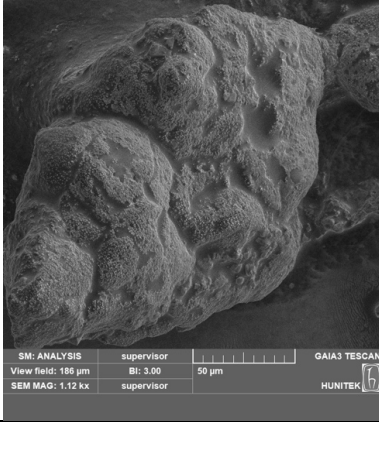
Şekil 4.5. LGG mikrokapsüllerinin ve simbiyotik mikrokapsüllerinin FIB-SEM görüntüleri.

LGG Mikrokapsülleri	LGG 3ALG:ICAP	 HV spot mag □ WD tilt det 3.00 kV 2.0 150 x 10.2 mm 0 ETD 500 μm UNAM	 HV spot mag □ WD tilt det 3.00 kV 2.0 500 x 10.8 mm 0 ETD 200 μm UNAM	 HV spot mag □ WD tilt det 5.00 kV 3.0 10.000 x 12.1 mm 0 ETD 10 μm UNAM
	LGG 1XG:IGG	 HV spot mag □ WD tilt det 2.00 kV 2.0 150 x 11.9 mm 0 ETD 500 μm UNAM	 HV spot mag □ WD tilt det 3.00 kV 3.0 5.000 x 11.9 mm 0 ETD 20 μm UNAM	 HV spot mag □ WD tilt det 3.00 kV 3.0 10.000 x 11.9 mm 0 ETD 10 μm UNAM
	LGG 3ALG	 HV spot mag □ WD tilt det 3.00 kV 2.0 200 x 11.0 mm 0 ETD 500 μm UNAM	 HV spot mag □ WD tilt det 5.00 kV 3.0 1.000 x 12.1 mm 0 ETD 100 μm UNAM	 HV spot mag □ WD tilt det 5.00 kV 3.0 5.000 x 12.1 mm 0 ETD 20 μm UNAM
	LGG 3ALG:0.75CAP	 HV spot mag □ WD tilt det 2.00 kV 2.0 150 x 11.2 mm 0 ETD 500 μm UNAM	 HV spot mag □ WD tilt det 2.00 kV 2.0 150 x 11.0 mm 0 ETD 500 μm UNAM	 HV spot mag □ WD tilt det 5.00 kV 2.0 2.500 x 11.3 mm 0 ETD 40 μm UNAM
	LGG 0.5XG:IGG	 HV spot mag □ WD tilt det 3.00 kV 3.0 150 x 11.6 mm 0 ETD 500 μm UNAM	 HV spot mag □ WD tilt det 3.00 kV 3.0 2.500 x 12.1 mm 0 ETD 40 μm UNAM	 HV spot mag □ WD tilt det 3.00 kV 3.0 2.500 x 11.7 mm 0 ETD 40 μm UNAM



Şekil 4.6. LGG mikrokapsüllerinin ve simbiyotik mikrokapsüllerinin ESEM görüntüleri.

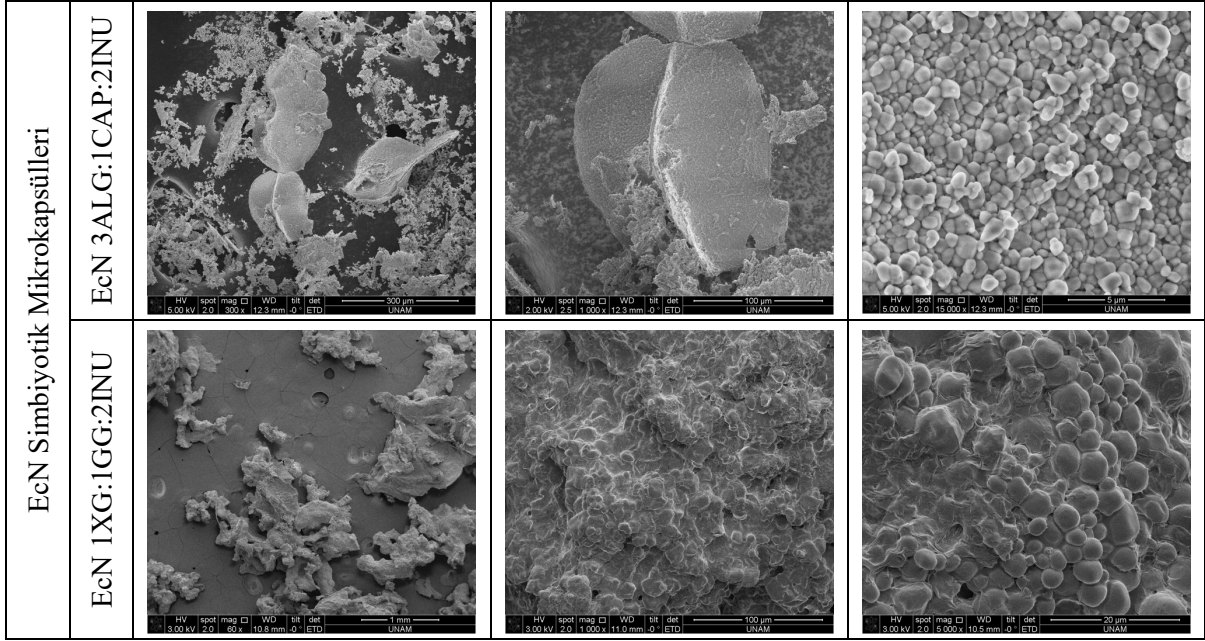
XG-ALG ve XG-CAP mikrokapsülleri üzerine gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, SEM görüntüleri değerlendirilen mikrokapsüllerden XG içerenlerin daha yuvarlak şekilde ve pürüzsüz yüzeye sahip olduğu; diğer taraftan CAP içeren kapsüllerde ise daha sert yüzey ve düzensiz şekiller görüldüğü belirtilmiştir [12]. Bu tez çalışmasında, elde edilen SEM mikrograflarına göre böyle bir yorum yapılamamaktadır. Söz konusu çalışmada ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyon işleminin gerçekleştirilmiş olmasından dolayı elde edilen mikrokapsüller üzerinde materyalin etkisinin daha net gözlenebildiği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında ise, emülsiyon metodu ile enkapsülasyon işlemi gerçekleştirildiği için mikrokapsüllerin boyutları farklı ve şekilleri düzensizdir. Bu sebeple materyalin mikrokapsül morfolojisi üzerine olası etkisi gözlenememektedir. Küçük büyültmelerde sert yüzeyli gibi görünen kapsüllerde yeterince büyütme yapıldığında yüzeyde pek çok yuvarlak ve pürüzsüz görünümde mikrokapsül kümesinin olduğu görülmektedir.

EcN Mikrokapsülleri		EcN 3ALG:1CAP	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI A3 TESCAN View field: 72.3 µm Bi: 6.00 20 µm SEM MAG: 2.85 kx supervisor HUNITEK</p>	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI A3 TESCAN View field: 53.0 µm Bi: 6.00 10 µm SEM MAG: 3.92 kx supervisor HUNITEK</p>
		EcN 1XG:1GG	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI A3 TESCAN View field: 22.0 µm Bi: 3.00 5 µm SEM MAG: 9.42 kx supervisor HUNITEK</p>	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI A3 TESCAN View field: 13.5 µm Bi: 6.00 2 µm SEM MAG: 15.4 kx supervisor HUNITEK</p>
		EcN 3ALG	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI A3 TESCAN View field: 190 µm Bi: 3.00 50 µm SEM MAG: 1.09 kx supervisor HUNITEK</p>	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI A3 TESCAN View field: 94.4 µm Bi: 3.00 20 µm SEM MAG: 2.20 kx supervisor HUNITEK</p>
		EcN 3ALG:0.75CAP	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI A3 TESCAN View field: 382 µm Bi: 3.00 100 µm SEM MAG: 544 x supervisor HUNITEK</p>	 <p>SM: ANALYSIS supervisor GAI A3 TESCAN View field: 186 µm Bi: 3.00 50 µm SEM MAG: 1.12 kx supervisor HUNITEK</p>

EcN Mikrokapsülleri	EcN 0.5XG:1GG		
		EcN Simbiyotik Mikrokapsülleri	EcN 1XG:1GG:2INU
EcN Simbiyotik Mikrokapsülleri	EcN 3ALG:1CAP:2INU		

Şekil 4.7. EcN mikrokapsüllerinin ve simbiyotik mikrokapsüllerinin FIB-SEM görüntüleri.

Ecn Mikrokapsülleri	Ecn 3ALG:1CAP			
	Ecn 1XG:1GG			
	Ecn 3ALG			
	Ecn 3ALG:0.75CAP			
	Ecn 0.5XG:1GG			



Şekil 4.8. EcN mikroksüllerinin ve simbiyotik mikroksüllerinin ESEM görüntüleri.

Kapsüllerin agregasyonuna sebep olabilecek iki ihtimal bulunmaktadır. Birincisi; enkapsülasyonda su fazına geçmiş ama tam olarak sertleşmemiş mikroksüllerin birbiriyle interaksiyona girerek büyük yapılar halinde sertleşmenin görülmesi ihtimalidir. İkinci ihtimal ise; liyofilizasyon sırasında suyun yavaş evapore olmasından dolayı, evaporasyon sırasında kapsüllerin agregate olarak bir bütün halinde kurumunun gerçekleşmesidir.

4.7. Sindirim Sistemi Simülasyonu ile Mikroksüllerdeki Probiyotik Canlılığının *in vitro* Koşullarda Değerlendirilmesi

4.7.1. Simüle Sindirim Sistemi Sıvılarının Hazırlanması

Sindirim sistemi simülasyonunda, LGG ve EcN mikroorganizmaları için iki farklı simüle mide sıvısı (SMS) kullanılmıştır. LGG için gerçekleştirilen sindirim sistemi simülasyonu (SSS) ön denemelerinde SMS çözeltisinin pH değeri 2.5 olarak ayarlandığında, yapılan kültürel sayım sonuçlarında mide simülasyonunun 45. dakikasından itibaren canlı mikroorganizmaya rastlanmamıştır. Bu duruma neden olan başlıca parametrenin belirlenmesi için bir dizi deneyler yapılmış ve bu mikroorganizmanın enzimsiz ortamda bile düşük pH'tan (pH 2.5) etkilendiği gözlenmiş ve değiştirilmesi gereken parametrenin pH olduğuna karar verilmiştir. Mikroorganizmanın sindirim sistemi koşullarına verdiği

tepkinin değerlendirilebilmesi için bağırsak simülasyonunun sonuna kadar canlı mikroorganizma saptanabilmesi gerektiği değerlendirilerek, LGG için gerçekleştirilen simülasyonlarda SMS'nin pH'ı 3 olarak değiştirilmiştir. LGG için belirlenen bu SSS koşulları EcN için uygulandığında, EcN canlılığında düşüş gözlenmemiştir. LGG'de karşılaşılan canlılığın saptanamaması durumu kadar, canlılıkta değişimin olamaması da SSS sonuçları üzerinde değerlendirme yapılamamasına neden olmaktadır. Bu sebeple, LGG için belirlenen simülasyon koşullarından yalnızca bir parametrenin değiştirilerek EcN için SSS gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. EcN'in farklı pH'lara tepkisinin ölçüldüğü ön denemelerde, pH 2 olan SMS'inde EcN canlılığının 45. dakikada sıfırlandığı, pH 2.5 olan SMS kullanıldığında ise beklendiği üzere bazı mikroorganizmaların öldüğü, fakat bağırsak simülasyonunun sonuna kadar canlı mikroorganizmanın ulaştığı saptanmıştır. LGG ve EcN için uygulanan SSS koşullarındaki farklılığın sebebi bu durumdur. Tüm parametrelerin tamamen değiştirildiği iki farklı SSS uygulamasındansa, yalnızca bir parametrenin (SMS pH değeri) değiştirildiği farklı simülasyonların gerçekleştirilmesinin, sonuçların yorumlanmasında kolaylık sağlayacağı düşünülmüştür.

4.7.2. Sindirim Sistemi Simülasyonu

Sindirim sistemi sıvılarının hazırlanmasından sonra, mikrokapsül örnekleri 90 dk boyunca SMS sıvısında çalkalanmıştır. Mide simülasyonundan sonra SBS sıvısı eklenerek çözeltinin pH değeri 8'e ayarlanmış ve 90 dk boyunca bu çözeltiyle çalkalanmıştır. Mide simülasyonunda üç kez (T1, T2, T3), bağırsak simülasyonunda üç kez (T4, T5, T6) olmak üzere altı farklı zamanda ekim yapılarak mikroorganizma canlılığındaki değişim takip edilmiştir. Elde edilen sayım sonuçları ve mikroorganizmaların canlı kalma yüzdeleri LGG için Çizelge 4.3'te, EcN için Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Sindirim sistemi simülasyonunda LGG canlılığının zamana göre değişimi.

			Mide			Bağırsak			
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	
LGG Serbest Form	LGG	N	7.51±0.04 ^{abc}	7.43±0.17 ^{a1}	6.29±0.21 ³	2.34±0.18 ^{mno}	2.71±0.23 ⁴ⁿ	2.69±0.15 ⁴ⁿ	
		%CK	100.00 ^a	98.95±2.32 ¹	83.73±2.79 ^e	31.14±2.46 ⁵	36.13±3.00 ^{h4k}	35.80±1.94 ^{h45}	
LGG Mikrokapstülleri	LGG 3ALG:1CAP	N	6.53±0.18 ^{g3}	6.52±0.17 ^{g3}	6.45±0.16 ^{g3}	2.50±0.29 ^{4no}	2.60±0.14 ⁴ⁿ	2.74±0.14 ^{k4n}	
		%CK	100.00 ^a	99.85±2.57 ^a	98.67±2.40 ¹	38.32±4.41 ³⁴	39.83±2.17 ³⁴	41.95±2.09 ³	
	LGG 1XG:1GG	N	7.10±0.08 ¹²	6.94±0.13 ^{d2g}	6.30±0.27 ³	2.04±0.25 ^o	2.37±0.08 ^{mno}	2.65±0.05 ⁴ⁿ	
		%CK	100.00 ^a	97.78±1.78 ¹	88.72±3.78 ^{c2}	28.71±3.48 ¹	33.44±1.17 ^{j5}	37.34±0.74 ^{34k}	
	LGG 3ALG	N	7.19±0.13 ^{1e}	7.05±0.17 ^{cd2}	6.18±0.19 ⁱ	2.56±0.26 ⁴ⁿ	2.68±0.41 ⁴ⁿ	2.61±0.11 ⁴ⁿ	
		%CK	100.00 ^a	98.16±2.38 ¹	85.98±2.62 ²	35.62±3.67 ^{h45}	37.25±5.69 ^{34k}	36.31±1.55 ^{h4k}	
	LGG 3ALG:0.75CAP	N	7.73±0.10 ^a	7.33±0.07 ^{a1}	7.16±0.06 ^{1e}	2.79±0.18 ^{k4}	2.97±0.39 ^{kl}	3.24±0.10 ^k	
		%CK	100.00 ^a	94.80±0.94 ^{1c}	92.55±0.74 ^{bcd}	36.14±2.34 ^{h4k}	38.43±5.07 ³⁴	41.84±1.33 ³	
	LGG 0.5XG:1GG	N	7.60±0.19 ^{ab}	6.75±0.15 ^{2gh}	6.60±0.11 ^{fg3}	2.81±0.31 ^{k4}	2.81±0.25 ^{k4}	2.81±0.07 ^{k4}	
		%CK	100.00 ^a	88.84±1.97 ^{c2}	86.81±1.49 ²	36.93±4.10 ^{h4k}	36.94±3.26 ^{34k}	36.95±0.90 ^{34k}	
	LGG Simbiyotik Mikrokapstülleri	LGG 3ALG:1CAP:2INU	N	6.61±0.10 ^{fg3}	6.51±0.20 ^{g3}	6.28±0.11 ³	2.27±0.12 ^{no}	2.71±0.08 ⁴ⁿ	2.92±0.12 ^{kl}
			%CK	100.00 ^a	98.51±2.99 ¹	95.03±1.68 ^{1c}	34.35±1.81 ⁴⁵	40.94±1.28 ³ⁱ	44.12±1.85 ^g
		LGG 1XG:2INU	N	7.37±0.05 ^{a1}	7.22±0.26 ^{a1e}	6.43±0.03 ^{g3}	3.85±0.18 ⁱ	3.88±0.13 ^j	4.08±0.02 ^j
			%CK	100.00 ^a	97.99±3.58 ¹	87.33±0.43 ²	52.31±2.43 ^f	52.64±1.81 ^f	55.41±0.24 ^f

N: Zaman göre canlı mikroorganizma sayısı (log kob/g,mL)

%CK: Canlı kalma yüzdesi

Farklı harfler, farklı mikrokapsüllerden alınan sonuçlar arasındaki anlamlı farkı göstermektedir ($p \leq 0.05$). Canlılık sonuçlarında; bcd:1, ef:2, hi:3, lm:4 şeklinde kısaltılmıştır. Canlı kalma yüzdesinde; ab:1, de:2, gh:3, ij:4, kl:5 şeklinde kısaltılmıştır.

LGG ile gerçekleştirilen sindirim sistemi simülasyonlarında; ALG:CAP mikrokapsülleri içerisinde en yüksek canlı kalma yüzdesi 41.95 ± 2.09 olarak 3ALG:1CAP mikrokapsüllerinde gözlenmiştir. XG:GG mikrokapsülleri içerisinde ise 1XG:1GG mikrokapsülleri $\%37.34 \pm 0.74$ ile en yüksek korumayı sağlamıştır. Bu iki polimer karışımına inülin eklenerek elde edilen simbiyotik mikrokapsüllerden en başarılı korumayı $\%55.41 \pm 0.24$ ile 1XG:1GG:2INU mikrokapsüllerinin sağladığı görülmektedir.

EcN ile gerçekleştirilen sindirim sistemi simülasyonlarında ise; ALG:CAP mikrokapsülleri içerisinde en yüksek canlı kalma yüzdesi 83.87 ± 1.15 olarak yine 3ALG:1CAP mikrokapsüllerinde gözlenmiştir. XG:GG mikrokapsülleri içerisinde ise $\%76.07 \pm 2.38$ ile en iyi koruma sağlayan 1XG:1GG mikrokapsülleri olmuştur. Her iki mikrokapsül karışımıyla simbiyotik mikroenkapsülasyona devam edilmiş olup; en yüksek canlı kalma yüzdesini 3ALG:1CAP:2INU mikrokapsülleri sağlamıştır. 1XG:1GG:2INU karışımı $\%85.04 \pm 1.90$ koruma sağlamıştır ve aralarında $\%2.64$ fark bulunmaktadır.

Çizelge 4.4. Sindirim sistemi simülasyonunda EcN canlılığının zamana göre değişimi.

			Mide			Bağırsak			
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	
EcN Serbest Form	EcN	N	7.49±0.24 ^a	6.47±0.12 ^{gh}	4.86±0.15 ^{opq}	4.03±0.06 ^{tu}	4.44±0.21 ⁴	4.58±0.19 ^{q4}	
		%CK	100.00 ^a	86.47±1.55 ¹²	64.92±2.02 ^{kl}	53.88±0.75 ⁿ	59.37±2.83 ^m	61.14±2.50 ^{lm}	
EcN Mikrokapşülleri	EcN 3ALG:ICAP	N	6.78±0.17 ^{cd2}	6.67±0.24 ^{2h}	6.87±0.20 ^{1ef}	5.00±0.14 ^{nop}	5.21±0.14 ^{3no}	5.68±0.08 ^{ijk}	
		%CK	100.00 ^a	98.44±3.47 ^a	101.36±2.90 ^a	73.76±1.99 ³⁴	76.94±2.01 ³	83.87±1.15 ²	
	EcN IXG:1GG	N	6.01±0.13 ⁱ	5.92±0.18 ⁱ	5.33±0.10 ^{k3n}	4.34±0.09 st	4.50±0.08 ⁴	4.57±0.14 ^{q4}	
		%CK	100.00 ^a	98.57±3.02 ^a	88.76±1.61 ^{1d}	72.29±1.50 ^{34j}	74.97±1.28 ³⁴	76.07±2.38 ³	
	EcN 3ALG	N	7.20±0.03 ^{ab}	6.97±0.02 ^{1e}	6.51±0.08 ^{fgh}	4.49±0.15 ⁴	5.32±0.04 ³ⁿ	5.43±0.05 ^{k3}	
		%CK	100.00 ^a	96.84±0.31 ^a	90.51±1.05 ^b	62.44±2.03 ^{lm}	73.97±0.52 ³⁴	75.38±0.69 ^{3h}	
	EcN 3ALG:0.75CAP	N	7.10±0.04 ^{bc}	7.04±0.06 ¹	6.97±0.04 ^{1e}	4.99±0.07 ^{nop}	5.38±0.05 ^{k3}	5.51±0.07 ^{jkl}	
		%CK	100.00 ^a	99.06±0.88 ^a	98.05±0.59 ^a	70.25±0.94 ^{ijk}	75.68±0.75 ³	77.59±1.00 ^f	
	EcN 0.5XG:1GG	N	6.63±0.12 ^{2h}	6.39±0.07 ^h	5.93±0.17 ⁱ	4.63±0.11 ^{q4}	4.53±0.10 ^{q4}	4.76±0.02 ^{pqr}	
		%CK	100.00 ^a	96.28±1.10 ^a	89.33±2.51 ¹	69.77±1.61 ^{ijk}	68.34±1.44 ^{ik}	71.72±0.23 ^{e4j}	
	EcN Simbiyotik Mikrokapşülleri	EcN 3ALG:ICAP:2INU	N	6.87±0.05 ^{1ef}	6.70±0.13 ^{d2h}	6.67±0.10 ^{2h}	5.89±0.14 ⁱ	5.95±0.04 ⁱ	6.02±0.05 ⁱ
			%CK	100.00 ^a	97.62±1.96 ^a	97.18±1.49 ^a	85.75±1.97 ¹²	86.60±0.61 ¹²	87.66±0.66 ¹²
		EcN IXG:1GG:2INU	N	6.02±0.07 ⁱ	5.85±0.06 ^{ij}	4.65±0.24 ^{pq4}	3.69±0.21 ^u	4.99±0.09 ^{nop}	5.12±0.11 ^{mno}
			%CK	100.00 ^a	97.22±1.05 ^a	77.34±4.03 ^f	61.41±3.44 ^{lm}	82.98±1.58 ^e	85.04±1.90 ^{e2}

N: Zaman göre canlı mikroorganizma sayısı (log kob/g,mL)

%CK: Canlı kalma yüzdesi

Farklı harfler, farklı mikrokapsüllerden alınan sonuçlar arasındaki anlamlı farkı göstermektedir ($p \leq 0.05$). Canlılık sonuçlarında; bcd:1, efg:2, lm:3, rs:4 şeklinde kısaltılmıştır. Canlı kalma yüzdesinde; bc:1, de:2, fg:3, hi:4 şeklinde kısaltılmıştır.

LGG ATCC 53103 suşu ile gerçekleştirilen bir çalışmada, sindirim sistemi simülasyonuna alınan serbest ve aljinat mikrokapsüllerine hapsedilen LGG örneklerinde sindirim sistemi simülasyonu gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak bu iki örneğin gastrointestinal sistem koşullarına dirençleri arasında bir fark görülmemiştir [70]. Bu tez çalışmasında, elde edilen tüm mikrokapsüllerin serbest formdakilerden daha iyi sonuç verdiği görülmekle beraber; 3ALG mikrokapsülleri ile serbest LGG'nin canlı kalma yüzdeleri arasında 0.5 birimlik fark olduğu görülmektedir. Bu bakımdan söz konusu çalışmadaki sonuçlarla bu tez çalışmasındaki sonuçların benzerliği bulunmaktadır. Yine aynı çalışmada, mideden bağırsak koşullarına geçişte canlılıkta 1 log kob/mL kadar düşüş olduğu görülmekte; mide süresince ve bağırsak süresince canlılık seviyelerinde ciddi bir farklılık bulunmadığı görülmektedir [70]. Bu tez çalışmasında da, sindirim sistemi simülasyonunda her iki mikroorganizma için en büyük kayıp mide koşullarından bağırsak koşullarına geçişte gözlenmiştir. Bu durumun, mikroorganizmanın değişen ortam koşullarına uyum sağlayamayarak ölmesi veya strese girmesinden dolayı kültive edilememesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bağırsak simülasyonunun ilerleyen süreçlerinde canlılıktaki artış eğilimi, strese giren mikroorganizmaların zaman içerisinde ortama uyum sağlayarak kültive edilebilmesi şeklinde yorumlanmıştır.

EcN kitozan-aljinat mikrokapsüllerinin ile mide simülasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada, 2 saatin sonunda serbest formdaki EcN hücrelerinin yarısından fazlasının canlılığını kaybettiği, öte yandan bu süre içerisinde mikrokapsüllerin EcN canlılığının korunmasında %80'in üzerinde başarı sağladığı belirtilmiştir [77]. Bu tez çalışmasında da, sindirim sistemi simülasyonunda farklı mikrokapsüller içerisinde en düşük başarının %70'in üzerinde olduğu görülmektedir.

Gerçekleştirilen sindirim sistemi simülasyonlarında,

1. Kullanılan enkapsülasyon polimerlerinden bağımsız olarak enkapsülasyon uygulamasının her iki mikroorganizma için de canlı kalma yüzdesini artırdığı belirlenmiştir.
2. Tüm polimer çeşitleri kendi aralarında değerlendirildiğinde, konsantrasyon arttıkça mikrokapsüllerin probiyotikleri sindirim sistemindeki olumsuz koşullardan koruma başarısının arttığı görülmektedir. Bu durum, yüksek polimer konsantrasyonunun iyonik çapraz bağların artmasına ve daha yoğun bir membranın elde edilerek mikrokapsülün daha stabil hale gelmesiyle açıklanabilir [74].
3. Literatürde, XG-GG mikrokapsüllerinin asit toleransının yüksek olmasına ilişkin yapılan yorumların, çözeltinin jel yoğunluğu ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmada 3ALG çözeltisi ile 0.5XG:1GG çözeltilerinin benzer akışkanlığa sahip olduğu görülmüştür. Bu çözeltilerin kullanılmasıyla elde edilen mikrokapsüller, sindirim sistemi simülasyonunda yakın sonuçlar vermiştir. Öte yandan, 1XG:1GG mikrokapsüllerinin diğer 2 mikrokapsül örneklerine göre probiyotiklerin SSS koşullarından korunmasında daha yüksek başarı sağladığı belirlenmiştir. Bu sonuç, jel yoğunluğunun probiyotiklerin korunmasındaki başarıyı etkilediği yorumunu desteklemektedir.
4. ALG mikrokapsülleriyle ALG-CAP mikrokapsüllerinin verdiği sonuçlar kıyaslandığında, sodyum aljinata CAP eklenmesiyle sindirim sistemi simülasyonunda canlı kalma yüzdelерinin arttığı belirlenmiştir. CAP polimerinin ALG çözeltisinin gözenekli yapısı içine yerleşerek polimer çözeltisinin asit toleransını artırdığı düşünülmektedir.
5. XG-GG mikrokapsüllerinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, enkapsülasyonun başarısında XG konsantrasyonunun önemli bir parametre olduğu yorumu yapılmıştır. 0.5XG:1GG polimer çözeltisi akışkan bir yapıya sahipken, 1XG:1GG çözeltisinin oldukça yoğun bir jel yapısı oluşturduğu gözlenmiştir. Bu durumun simülasyon boyunca kapsül yapısının korunmasına etki ettiği, buna bağlı olarak mikrokapsüllerin probiyotikleri dış ortamdan koruma başarısını etkilediği düşünülmektedir. Öyle ki; simülasyon sonlandırıldığında

parçalanmamış 1XG:1GG mikrokapsüllerinin varlığı gözlenmiştir. Bu bulgu, meyve suyu uygulamasına geçişte dikkate alınan etmenlerden biridir.

6. Mikrokapsüllerin asidik mide koşullarındaki koruması EcN verilerine bakıldığında daha belirgindir.
7. ALG içeren mikrokapsüller içerisinde her iki mikroorganizma için en iyi korumayı 3ALG:1CAP mikrokapsülleri sağlamıştır. XG-GG mikrokapsülleri içerisinde ise 1XG:1GG mikrokapsülleriyle en yüksek canlı kalma yüzdesine ulaşılmıştır. XG-GG mikrokapsüllerindeki koruma EcN verilerinde daha net görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, simbiyotik enkapsülasyon yalnızca bu iki polimer çözeltisiyle gerçekleştirilmiştir.
8. Probiyotik mikrokapsülleri ile simbiyotik mikrokapsüllerinin sonuçları kıyaslandığında, simbiyotik enkapsülasyonun her iki mikroorganizma için de sindirim sistemi simülasyonunda daha iyi koruma sağladığı görülmektedir. Bu durumun ortaya çıkmasında iki farklı etmen olduğu düşünülmektedir. Birincisi; inülinin jel oluşturma özelliği bulunmaktadır ve bu şekilde polimer çözeltisinin jel yapısının daha kıvamlı hale gelmesine, dolayısıyla mikrokapsül yapısının daha iyi korunmasına yol açmış olabileceği düşünülmektedir. İkinci etmen ise; pek çok probiyotik mikroorganizmanın inülini besin olarak kullanabilmesi, yani inülinin prebiyotik özelliğidir. Buna bağlı olarak LGG simbiyotik mikrokapsüllerinde canlı hücre sayısında artış yaşanmış olabileceği düşünülmektedir. Öte yandan, EcN'in inülini metabolize edememesinden dolayı EcN için yapılan değerlendirmede yalnızca birinci önermenin doğru olduğu düşünülebilir. EcN'in inülini metabolize edememesine yönelik sonuçların alındığı çalışmalar bulunmakla beraber [85,86], metabolik yollardaki hangi farklılıktan dolayı böyle bir sonuçla karşılaşıldığına dair literatürde açıklama bulunamamıştır. *E. coli*'nin patojenik ve probiyotik suşları arasında henüz tanımlanmamış metabolik yolların bulunduğu ve bunların bakteri-konak etkileşiminde henüz keşfedilememiş öngörülemeyen aktivitelere sebep olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [87].
9. Sindirim sistemi simülasyonunda en iyi sonucu veren polimer çözeltilerine (1XG:1GG ve 3ALJ:1CAP) %2 (a/h) oranında INU eklenmesiyle gerçekleştirilen simbiyotik enkapsülasyonların, özellikle XG-GG mikrokapsüllerinin sindirim

sistemi simülasyonundaki başarısının artmasına büyük katkısı olduğu, simülasyon verilerinde ortaya konmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında, inülinin bu polimer grubuyla daha uyumlu olduğu söylenebilir.

10. İnülin içeren mikrokapsüllerin sindirim sistemi simülasyonundaki başarısı, polimer çözeltilerinin etkinliğinin artırılmasında inülin ilavesinin etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir.

4.8. Meyve Suyu Analizleri

4.8.1. Meyve Suyunda Kullanılacak Mikrokapsüllerin Seçimi

Meyve suyu örneklerinde kullanılacak mikrokapsül grubuna karar verme aşamasında, farklı mikrokapsüllerden alınan SSS sonuçları değerlendirilmiştir. Buna göre; 3ALG:1CAP ile 1XG-1GG mikrokapsüllerinin kıyaslandığında ALG-CAP'ın daha iyi sonuç verdiği; fakat simbiyotik enkapsülasyonda 1XG:1GG:2INU mikrokapsüllerinin 3ALG:1CAP:1INU mikrokapsüllerine kıyasla LGG'de daha yüksek başarı göstermesinden dolayı meyve suyunda kullanılacak enkapsülasyon polimerlerinin seçimi için başka değerlendirmelerin de yapılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bunlardan biri, polimer çözeltisinin jel kıvamıdır. SSS analizlerinde toplam 3 saatlik çalkalamanın sonunda, 1XG:1GG mikrokapsüllerinin 3ALG:1CAP mikrokapsüllerine kıyasla kapsül bütünlüğünü korumada daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Meyve suyu örneklerinin 35 gün depolama süresi olduğu için kapsül bütünlüğünün uzun süre korunabilmesi polimer seçiminde önemli bir parametredir.

Buna ek olarak, XG ve GG gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Tüm bu parametreler göz önünde bulundurulduğunda içecek sektörünün yabancı olmadığı XG ve GG polimerleriyle elde edilecek mikrokapsüllerin meyve suyunda kullanımının, ALG-CAP polimerlerine göre daha uygun olacağı düşünülmüştür.

4.8.2. Meyve Sularının Hazırlanması

Çalışma kapsamında Dimes %100 Portakal Suyu ve Dimes %100 Elma-Şeftali Suyu kullanılmıştır (Şekil 4.9.). Bu özellikteki meyve sularında meyvenin kendisinden gelen

besin içeriği dışında hiçbir katkı bulunmamaktadır. Geliştirilmek istenen ürünün sağlık temelindeki kaygılar üzerine kurulu olmasından dolayı ilave şeker ve/veya katkı maddesi içeren meyve suları değerlendirmeye alınmamıştır.

Bu tez çalışmasında iki farklı meyve suyunun tercih edilmesindeki etmen, farklı besin değerlerine ve tekstür/kıvama sahip meyve sularının depolama sırasındaki probiyotik canlılığını nasıl etkileyeceğinin, mikrokapsül yapısını nasıl destekleyeceğinin veya probiyotik meyve sularının tüketim açısından kabul edilebilirliği üzerine olası farklılıkların değerlendirilmek istenmesidir. Çalışma kapsamında kullanılan meyve sularının besin değerleri Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Tez çalışması kapsamında enkapsüle edilen probiyotik mikroorganizmalar meyve suyuna ekleneceği için tüketicinin beğenisinin sağlanabilmesi amacıyla vişne, elma, nar gibi berrak meyve sularının kullanımı tercih edilmemiştir.



Şekil 4.9. Ticari %100 portakal ve %100 elma-şeftali suyu örnekleri

Probiyotik çözeltisindeki başlangıç mikroorganizma yükünün aynı olması ve tüm mikrokapsüllerde aynı sayıda probiyotik varlığının sağlanabilmesi için tek enkapsülasyonla tüm meyve suyu örneklerine yetecek şekilde probiyotik mikrokapsüllerinin üretimi yapılmıştır. Buna ek olarak, prebiyotiklerin probiyotik canlılığının korunmasındaki olumlu etkisi göz önünde bulundurulmuş ve polimer karışımına inülin ilave edilerek çalışma kapsamında simbiyotik enkapsülasyon da aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

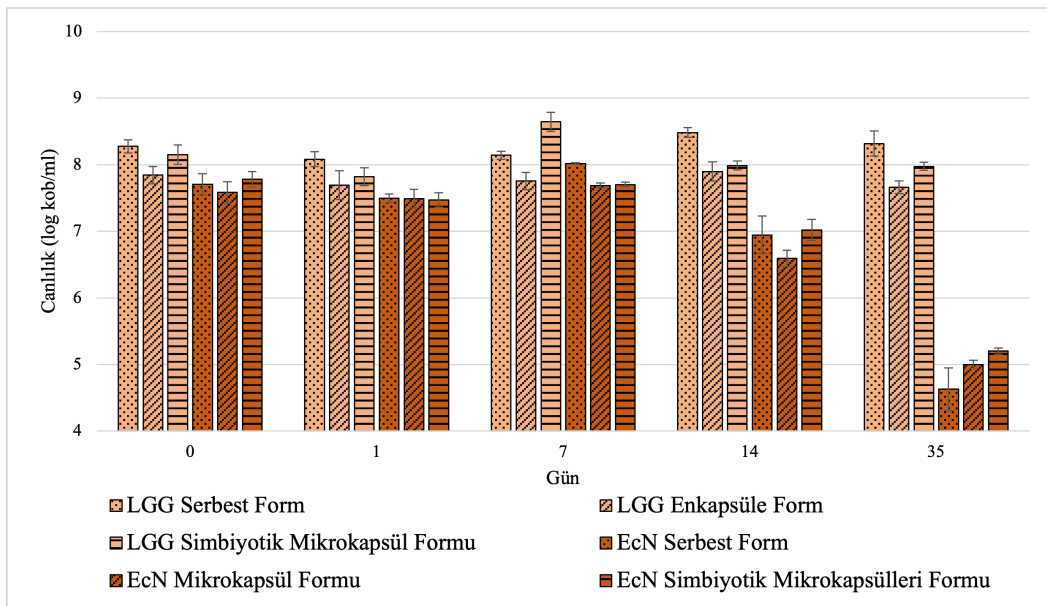
Her meyve suyu örneği; kontrol, serbest probiyotik, mikrokapsül veya simbiyotik mikrokapsül içermesine ve mikroorganizmaya göre, kaçınıcı gün analiz edileceği de kodlanarak aynı günde hazırlanmış ve +4 °C’de analiz gününe kadar depolanmıştır. Şekil 4.10.’da tek seferde hazırlanan meyve suyu örnekleri görülmektedir.



Şekil 4.10. Probiyotik %100 portakal ve %100 elma-şeftali sularının hazırlanması.

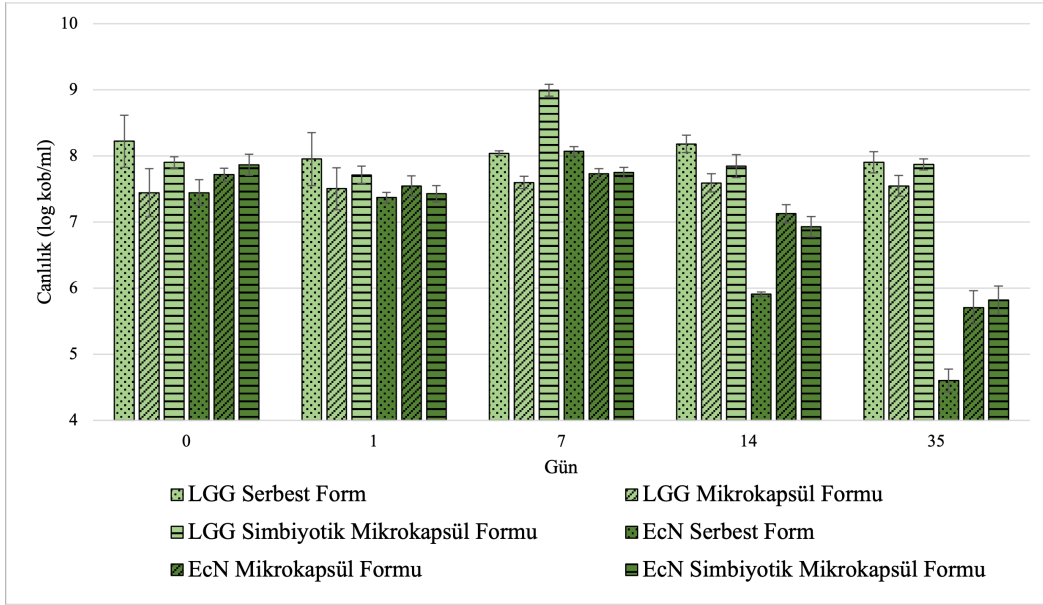
4.8.3. Meyve Suyunun Depolanması Sırasında Probiyotik Canlılıklarının Belirlenmesi

+4 °C’de depolanan meyve suyu örnekleri, analiz günlerinde 2 saat boyunca 37 °C’de çalkalanarak mikrokapsüllerin parçalanması sağlanmış, ardından seri dilüsyonları yapılarak probiyotik bakterilerin katı besiyerlerine ekimi yapılmıştır. Portakal suyundaki probiyotik canlılığı Şekil 4.11.’de, elma-şeftali suyundaki probiyotik canlılığı ise Şekil 4.12.’de verilmiştir.



Şekil 4.11. Portakal suyu örneklerinin depolanması sırasında LGG ve EcN canlılıkları.

Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=4).



Şekil 4.12. Elma-şeftali suyu örneklerinin depolanması sırasında LGG ve EcN canlılıkları
Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=4).

Elde edilen sonuçlara göre;

1. Ürünün probiyotik gıda olarak adlandırılabilmesi için yeterli sayıda canlı probiyotik hücre içermesi bakımından, LGG içeren meyve sularında 35 günlük depolama süresi uygun bir süredir. Enkapsülasyonun sağladığı korumanın daha net görülebilmesi için sürenin daha da uzatıldığı ileri çalışmalar planlanabilir. EcN içeren meyve sularında ise 35. günde canlı probiyotik sayısı 10^6 kob/mL'nin altına indiği için depolama süresi 14 ile 35. günler arasında sınırlandırılmalıdır. Bir gıdanın probiyotik olarak adlandırılabilmesi için en az 1.0×10^6 kob/g canlı probiyotik içermesi gerekmektedir [82].
2. LGG içeren meyve sularında, tüm formlar için canlılık düzeyinin korunduğu görülse de, enkapsüle formlarda serbest forma kıyasla canlılık seviyesinin daha stabil olduğu görülmektedir. EcN içeren meyve sularında ise, 35. gün verilerine bakıldığında enkapsüle formdaki probiyotiklerin canlılığının serbest formdakilerden 1 log kob/mL'den daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, enkapsülasyon işleminin meyve sularında probiyotik canlılığının korunmasında etkin bir yöntem olduğunu göstermektedir.

3. LGG simbiyotik mikrokapsülleri içeren meyve sularında, probiyotik canlılığında 7. günde belirgin bir artış söz konusudur. Bu durumun, kapsül içerisinde bakterilerin metabolize edebileceği inülin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. EcN örneklerinde ise, simbiyotik mikrokapsüllerin daha iyi bir koruma sağlandığı gözlenirse de bu fark LGG'de olduğu kadar belirgin değildir. Bunun sebebi araştırıldığında, yabancı tip EcN'in inülini metabolize edemediğine ve ortamda inülin varlığının EcN'in barsak hücrelerine adhezyonunu engellediğine yönelik çalışmalar bulunmuştur [85,86]. Bu sebeple, simbiyotik mikroenkapsülasyonun EcN probiyotik bakterisinin kullanıldığı meyve sularında kullanımı doğru bir karar olmayabilir. EcN içeren meyve sularında inülinin bir prebiyotik olarak değil, bir enkapsülasyon materyali olarak hareket ettiği düşünülmektedir.
4. EcN mikrokapsülleri içeren elma-şeftali suyunda, 35. gündeki canlılığın portakal suyundan yaklaşık olarak 0.5 log kob/mL daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu veriye göre elma-şeftali suyu, probiyotik mikrokapsülleri için daha iyi bir taşıyıcı olabilir. Bu durum meyve sularının yoğunlukları, akışkanlıkları ve içerdiği meyve posası ile ilişkilendirilmiştir. Elma-şeftali suyu portakal suyuna göre daha yoğun kıvamdadır; içerdiği meyve posasının daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum mikrokapsül bütünlüğünün korunmasını destekleyebilir.
5. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde soğukta muhafaza edilmesi gereken tüketime hazır meyve ve sebze sularının 25 g-mL'sinde bulunabilecek *Salmonella*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157 limiti 0 (sıfır) olarak belirlenmiştir [88]. Bu tez çalışmasında, pastörize meyve sularına probiyotik mikroorganizmalar ve probiyotik mikrokapsüller steril koşullarda eklendiği için elde edilen *E. coli* verileri EcN canlılığının bir göstergesidir, fekal kontaminasyon kaynaklı değildir. Öte yandan, endüstriyel üretimin söz konusu olması durumunda fekal kontaminasyonun belirlenmesi için EcN ve *E. coli* O157 suşlarının ayrımı gerekmektedir. Bunun için, PCR yöntemiyle moleküler düzeyde tanımlama ve var-yok analizleriyle tespit çalışmaları gerçekleştirilebilir.

Sprey kurutma ile LGG-WPI mikrokapsüllerinin üretildiği bir çalışmada, mikrokapsüller elma suyuna eklenmiş ve 5 hafta boyunca +4 °C ve 25 °C'de depolanmıştır. 5 haftanın sonunda +4 °C'de depolanan örneklerdeki probiyotik canlılığında yarı yarıya bir düşüş gözlenmiştir. +25 °C'de depolananlarda ise probiyotik canlılığı ilk hafta 2 log kob/100

mL kadar artmış, sonra stabil olarak devam etmiştir [75]. Bu tez çalışmasında ise +4 °C'de depolanan tüm LGG meyve suyu örneklerinde canlılığın 35 gün boyunca korunduğu görülmektedir.

Bir diğer enkapsülasyon çalışmasında, inülinli ve inülinatsız LGG kitozan-aljinat mikrokapsülleri elma suyunda 90 gün süreyle depolanmış ve mikrokapsül içeren örneklerde canlılık büyük oranda korunurken, serbest formda LGG içeren örneklerin canlılıklarında 90 günün sonunda yaklaşık %80 oranında kayıp yaşanmıştır. 30. günde ise bu kaybın %40-50 arasında olduğu görülmektedir. Çalışmada canlılıktaki düşüşün en hızlı birinci günde gerçekleştiği belirtilmiş ve bu durumun bakterinin meyve suyu ortamına birden maruz kalmasından kaynaklanabileceği yorumu yapılmıştır [76]. Bu tez çalışmasında da, portakal ve elma-şeftali sularına eklenen LGG örneklerinde yaklaşık 0.2 log kob/mL düşüş gözlenmekle beraber, 7. günde sayılarının artmaya başladığı, özellikle simbiyotik mikrokapsül içeren portakal suyu örneklerinde yaklaşık 1 log kob/mL, elma-şeftali suyu örneklerinde ise 1 log kob/mL'den fazla bir artış gözlenmektedir. LGG'nin simbiyotik mikrokapsüllerdeki inülini metabolize ederek canlılığında artışın sağlandığı düşünülmektedir. 14. günde ise bakteri sayısının maksimum sınırına ulaşmasıyla beraber canlılıkta düşüş gözlenirse de, 35. günün sonuna kadar 7.5-8 log kob/mL aralığında dengesini korumaya devam ettiği gözlenmektedir. LGG üzerinde enkapsülasyon işleminin etkisinin daha iyi incelenebilmesi için depolama süresinin uzatıldığı başka çalışmalar gerçekleştirilebilir.

Daha önce EcN'in mikroenkapsüle edilerek meyve suyuna işlendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

4.8.4. Probiyotik Meyve Sularında Kalite Analizleri

Hazırlanan meyve suyu örnekleri 35 gün boyunca +4 °C'de depolanmış ve depolamanın 0., 1., 7., 14. ve 35. günlerinde pH analizi, sitrik asit tayini, renk analizi ve suda çözünür madde miktarı tayininden oluşan kalite analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.8.4.1. pH Analizi

Hazırlanan meyve sularının pH değerleri, pH metre kullanılarak ve 2 paralelden ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.13'te portakal suyuna ait, Şekil 4.14'te elma-şeftali suyuna ait pH değerleri verilmektedir.

Serbest LGG içeren portakal suyunda en düşük pH değeri 35. günde 3.53 olarak, en yüksek pH değeri 3.65 olarak 1. ve 7. günlerde görülmüştür. LGG mikrokapsülleri ve simbiyotik mikrokapsülleri içeren portakal sularında ise en düşük pH değeri 3.36 ± 0.01 olarak mikrokapsül örneklerinin 7. gününde, en yüksek pH değeri ise 3.44 ± 0.01 ile simbiyotik mikrokapsül içeren örneklerin depolanmalarının 7. ve 35. gününde belirlenmiştir.

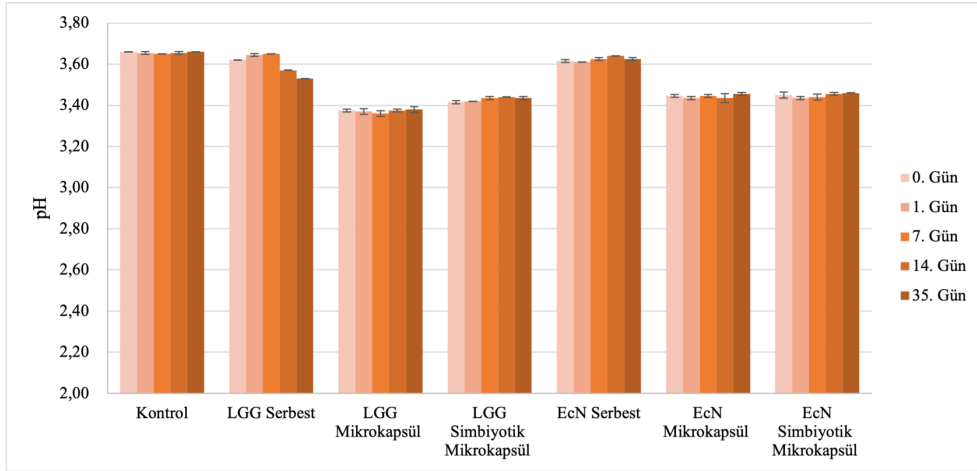
Serbest EcN içeren portakal suyunda en düşük pH değeri 3.61 olarak depolamanın 1. gününde, en yüksek pH değeri ise 3.64 olarak depolamanın 14. gününde belirlenmiştir. EcN mikrokapsülleri ve simbiyotik mikrokapsülleri içeren portakal sularında en düşük pH değeri 3.44 olarak mikrokapsül örneklerinin 1. ve 14. gününde, en yüksek değer ise 3.46 olarak mikrokapsül içeren örneğin 35. gününde, simbiyotik mikrokapsülleri içeren örneklerin 14. ve 35. gününde belirlenmiştir.

Portakal suyuna ait kontrol grubunda 7. günde pH değeri 3.65 olarak diğer günler 3.66 olarak ölçülmüştür. Probiyotik içeren portakal suyu örneklerinde en düşük pH değeri 3.36 ± 0.01 olarak LGG mikrokapsülleri içeren örneklerinin 7. gününde, en yüksek pH değeri 3.65 olarak serbest LGG içeren örneklerin depolanmalarının 1. ve 7. günlerinde ölçülmüştür.

Serbest LGG içeren elma şeftali suyunda en düşük pH değeri depolamanın 35. gününde 3.60 olarak, en yüksek değer 3.66 ± 0.01 olarak depolamanın 1. gününde ölçülmüştür. LGG mikrokapsülleri ve simbiyotik mikrokapsülleri içeren elma şeftali sularında ise en düşük pH değeri 3.38 olarak mikrokapsül içeren örneklerin depolanmalarının 1. gününde, en yüksek değer ise 3.49 ± 0.01 olarak depolamanın 14. gününde simbiyotik mikrokapsül içeren örneklerde ölçülmüştür.

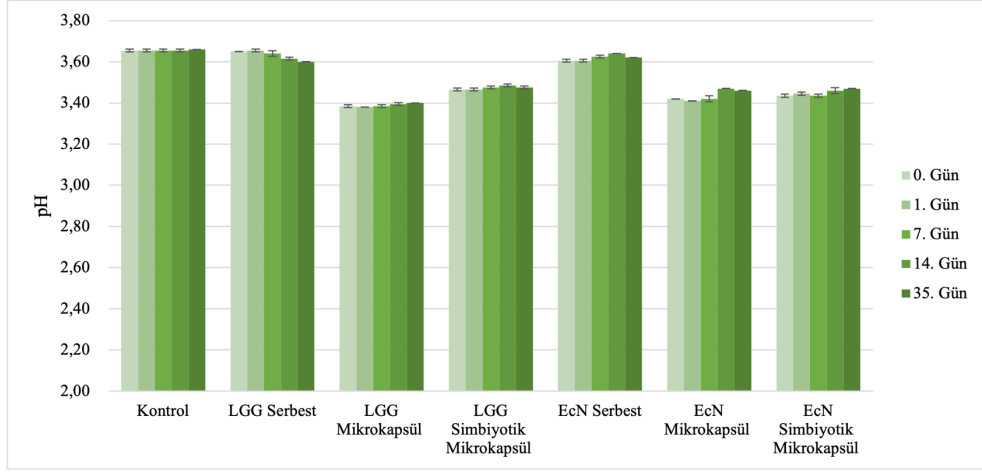
Serbest EcN içeren elma şeftali suyunda en düşük pH değeri 3.61 ± 0.01 ile depolamanın 0. ve 1. gününde, en yüksek değer ise depolamanın 14. gününde 3.64 olarak ölçülmüştür. EcN mikrokapsülleri ve simbiyotik mikrokapsülleri içeren elma şeftali sularında 3.41 olarak mikrokapsül içeren örneklerin 1. Depolama gününde, en yüksek pH değeri ise mikrokapsül örneklerinin 14. gününde ve simbiyotik mikrokapsülleri içeren örneklerin 35. depolama gününde 3.47 olarak belirlenmiştir.

Elma şeftali suyuna ait kontrol grubunda yapılan tüm ölçümlerde pH değeri 3.66 olarak belirlenmiştir. Probiyotik içeren elma şeftali suyu örneklerinde en düşük pH değeri 3.38 olarak LGG mikrokapsülleri içeren örneklerin depolanmalarının 1. gününde, en yüksek pH değeri ise 3.66 ± 0.01 olarak serbest LGG içeren örneklerin depolanmasının 1. gününde ölçülmüştür.



Şekil 4.13. Portakal suyu örneklerinin depolanma sırasındaki pH değerleri.

Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=4).



Şekil 4.14. Elma-şeftali suyu örneklerinin depolama sırasındaki pH değerleri.

Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=4).

Meyve sularındaki pH değerleri açısından Türk Gıda Kodeksi Meyve Suyu ve Benzeri Ürünler Tebliği'nde, TSE standartlarında ve Avrupa Meyve Suyu Derneği'nin (AIJN) belirlediği referanslar içerisinde herhangi bir sınırlama bulunmamaktadır [89–92]. Bununla beraber, meyve suyu örneklerinde depolama süresince gerçekleşen pH değişiklikleri ve farklı numunelerde farklı pH değerlerinin ölçülmesi yorumlanabilir.

Probiyotik meyve sularının üretimindeki endişelerden birisi, meyve sularının depolanması sırasında mikroorganizmaların fermantasyonla laktik asit üretmeleridir. Böyle bir durumun gerçekleşmesi halinde meyve sularının pH değerlerinde düşüş beklenmektedir. Elde edilen sonuçlar, serbest formda LGG içeren örnekler hariç diğer örneklerde, kalite özelliklerini etkileyecek kadar fermantasyon gerçekleşmediğinin göstergesi olabilir. LGG'nin serbest formunu içeren portakal ve elma suyunda zamana bağlı olarak pH'da düşüş gözlenmektedir. Bu durumun sebebi, LGG'nin depolama sırasında meyve suyunu fermente etmesi olabilir. LGG mikrokapsülü ve simbiyotik mikrokapsülü içeren örneklerin pH değerlerinde ise düşüş söz konusu olmamıştır. Bu sonuca dayanarak, mikroenkapsülasyon işleminin olası fermantasyonu engellediği düşünülmektedir. EcN'in serbest formunu içeren meyve suyu örneklerinin pH değerlerinde düşüş gözlenmemektedir ve bu mikroorganizmayı içeren örneklerde depolama süresince pH değerlerinde LGG'ye kıyasla daha az değişiklik gözlenmektedir.

Mikrokapsül ve simbiyotik mikrokapsül içeren tüm örneklerin pH değerlerinde istatistiki açıdan göz ardı edilebilecek kadar az bir artış söz konusudur. Bu durum, kapsülleri çevreleyen Ca^{2+} iyonlarının zaman içerisinde meyve suyuna geçmeye başlaması ihtimali ile açıklanabilir. Elma suyuna whey protein izolatlarından oluşan probiyotik mikrokapsüllerinin eklendiği bir çalışmada, zaman içerisinde meyve suyu pH değerlerindeki yükselme whey protein izolatının tamponlama kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir [75].

4.8.4.2. Meyve Suyunda Titrasyon Asitliği

Meyve suyu örneklerinde titrasyon asitliği TS 1125 ISO 750 Meyve ve Sebze Ürünleri – Titre Edilebilir Asitlik Tayini'ne göre gerçekleştirilerek sitrik asit cinsinden belirlenmiştir. Sitrik asit cinsinden titrasyon asitliği, meyve sularının içerdiği meyveye dair bilgi sağlaması açısından önemli bir kalite kriteridir. Meyvenin cinsi, hasat sezonu, olgunluğu gibi faktörler bu sonucu etkilemektedir. Portakal suyuna ait sonuçlar Şekil 4.15'te, elma-şeftali suyuna ait sonuçlar Şekil 4.16'da verilmiştir.

Portakal suyunda en düşük TA, EcN mikrokapsüllerine ait 7. gün örneklerinde 6.02 ± 0.18 g/L olarak, en yüksek TA ise LGG Serbest formda portakal suyunun 14 ve 35. gününde 7.68 g/L olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise en düşük ve en yüksek değerler sırasıyla 6.78 g/L olarak 35. günde ve 7.17 g/L olarak 7 ve 14. gün örneklerinde saptanmıştır.

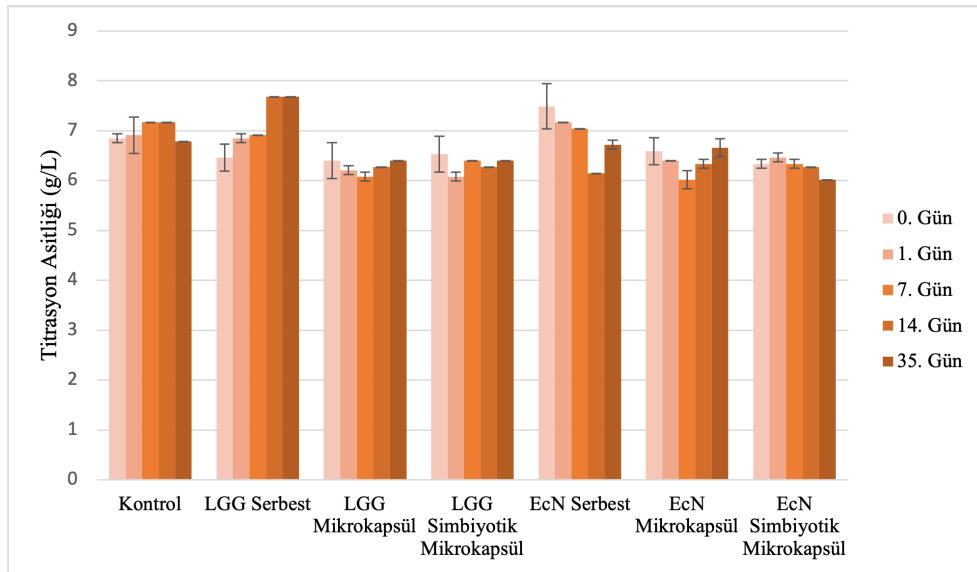
LGG içeren portakal suyu örneklerinde en düşük TA mikrokapsül içeren örneklerin 7. gününde ve simbiyotik mikrokapsül içeren örneklerin 1. gününde görülmüştür (6.08 ± 0.10 g/L). En yüksek TA ise; LGG Serbest formda portakal suyunun 14 ve 35. gününde 7.68 g/L olarak belirlenmiştir.

EcN içeren portakal sularında en düşük TA, EcN mikrokapsüllerine ait 7. gün örneklerinde 6.02 ± 0.18 g/L olarak, en yüksek TA ise serbest EcN hücreleri içeren örneklerin 0. gününde 7.49 ± 0.45 g/L olarak belirlenmiştir.

Elma şeftali suyunda en düşük TA LGG simbiyotik mikrokapsülleri içeren örneklerin depolanmalarının 14. gününde 3.46 g/L olarak, en yüksek TA ise serbest EcN hücreleri içeren örneğin 14. gününde 4.67±0.09 g/L olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise en düşük ve en yüksek değerler sırasıyla 4.48±0.20 g/L olarak depolamanın 0. gününde ve 4.99 g/L olarak depolamanın 14. gününde saptanmıştır.

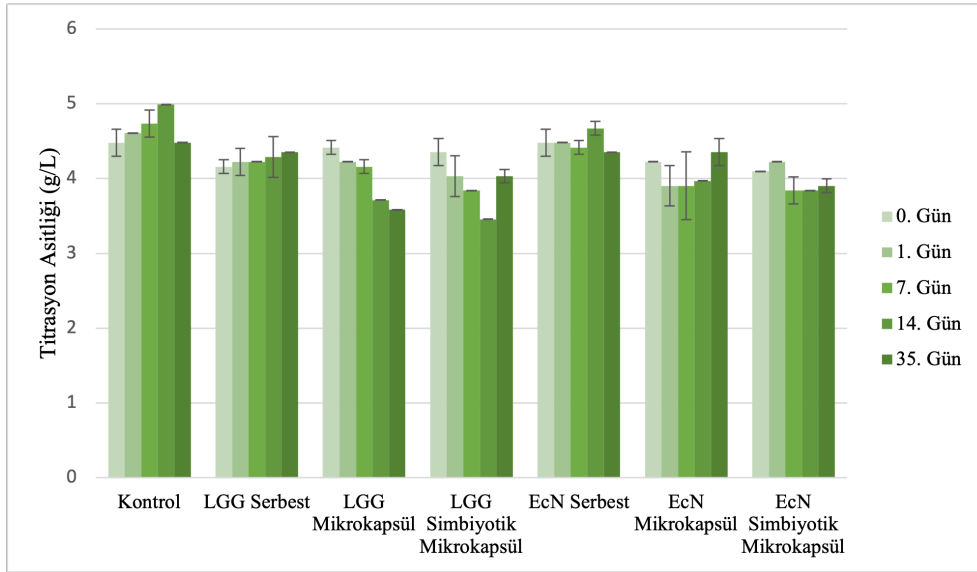
LGG içeren elma şeftali sularında en düşük TA simbiyotik mikrokapsül içeren örneklerin 14. gününde 3.46 g/L olarak, en yüksek TA ise 4.42±0.09 g/L olarak mikrokapsül içeren örneklerin 0. gününde belirlenmiştir.

EcN içeren elma şeftali sularında en düşük TA simbiyotik mikrokapsül içeren örneğin 7. gününde 3.84±0.18 g/L olarak; en yüksek TA ise serbest EcN hücreleri içeren örneğin depolanmasının 14. gününde 4.67±0.09 g/L olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Portakal suyu örneklerinin depolama sırasındaki titrasyon asitliği değerleri (sitrik asit cinsinden)

Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=2).



Şekil 4.16. Elma-şeftali suyu örneklerinin depolanması sırasında titrasyon asitliği değerleri (sitrik asit cinsinden)

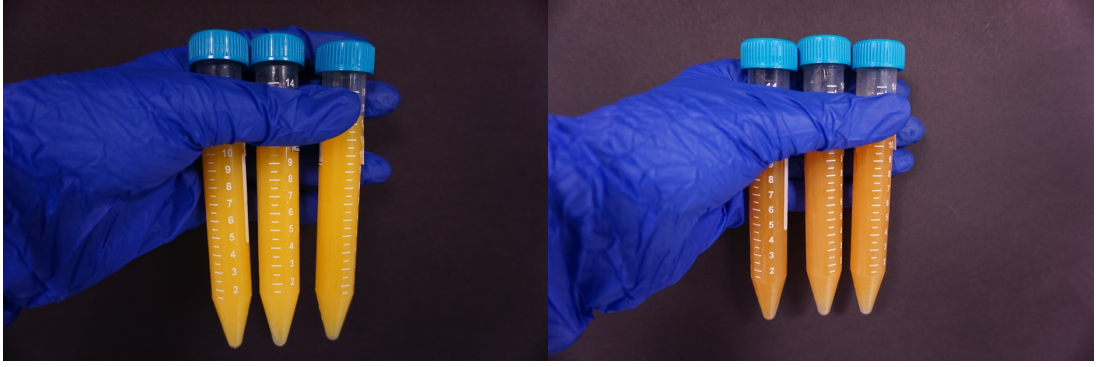
Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=2).

Türk Gıda Kodeksi Meyve Suyu ve Benzeri Ürünler Tebliği'nde meyve sularının değerlendirilmesinde titrasyon asitliği açısından bir sınırlama bulunmamaktadır.

Avrupa Meyve Suyu Derneği'nin (AIJN- European Fruit Juice Association) portakal suyu, elma suyu ve şeftali nektarı için belirlediği sitrik asit cinsinden titrasyon asitliği aralıkları sırasıyla; 5.8-15.4 g/L, 2.2-7.5 g/L, 3.2-8 g/L'dir [90–92]. Elde edilen tüm meyve suyu örnekleri bu referans aralıklarına uymaktadır.

4.8.4.3. Renk Analizi

Probiyotik meyve sularında renk analizleri gerçekleştirilmesinde, meyve suyunun tüketici tarafından kabul edilebilirliği açısından rengin önemli bir kriter olduğu düşünülmüştür. İlgili standartlarda ve düzenlemelerde bu kritere yönelik herhangi bir sınırlama bulunmamakla birlikte, depolama sırasında meyve sularının renklerinde değişiklik olup olmadığının saptanması açısından önem taşımaktadır. Bu sebeple depolamanın 0., 1., 7., 14. ve 35. günlerinde probiyotik meyve suyu örneklerinin renk analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17'de probiyotiklerin depolama sürecinin sonundaki renkleri görülmektedir. Örnekler arasında renk kriteri bakımından gözle görülür bir farklılık bulunmamaktadır.

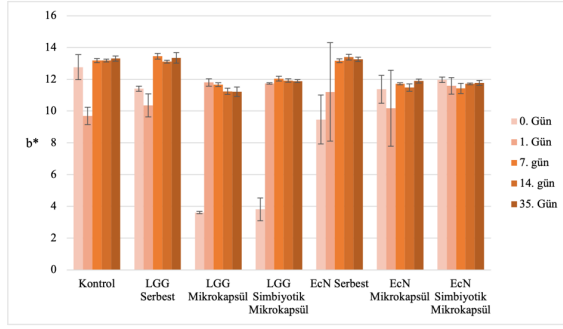
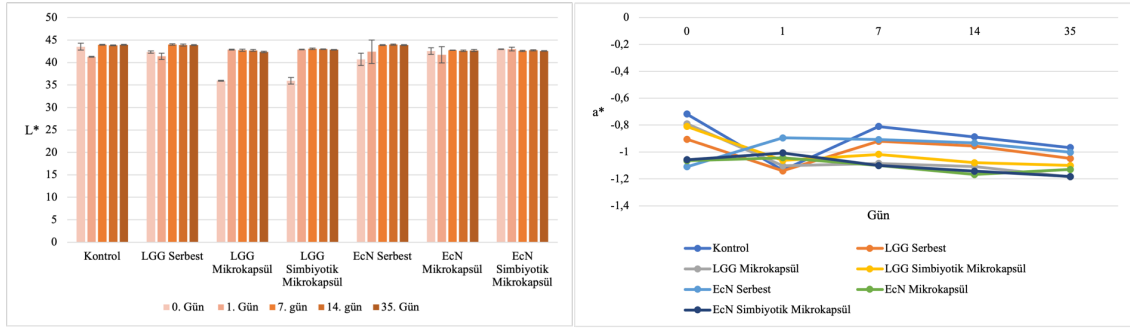


Şekil 4.17. Depolamanın 35. gününde LGG içeren portakal suyu ve elma-şeftali suyu örnekleri.

Soldan sağa sırasıyla serbest LGG, LGG mikrokapsülleri ve LGG simbiyotik mikrokapsülleri içeren meyve suyu örnekleri.

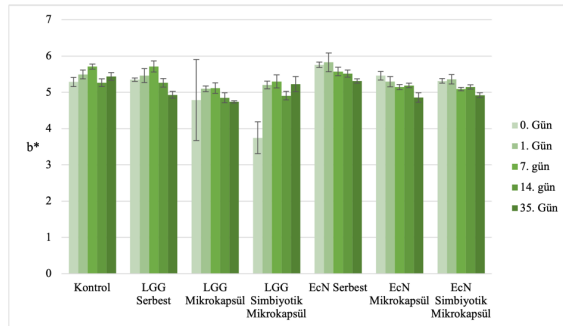
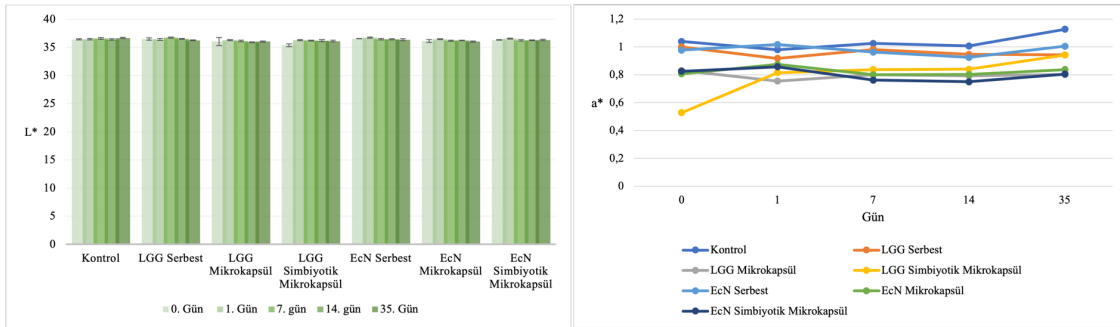
Meyve suyu örneklerinin hiçbirisinde depolama boyunca gözle görülür renk değişikliği olmamıştır. Spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde, mikrokapsül içeren örneklerin farklı sonuçlar verdiği görülmekle beraber, mikrokapsüllerin kendilerine ait beyaz-şeffaf görüntüsü nedeniyle bu durumla karşılaşıldığı düşünülmektedir. Mikrokapsüller, meyve sularının renginde bir değişikliğe sebep olmamıştır.

Tüm meyve suyu örneklerinin Hunter L a b sistemine sahip bir spektrofotometrede renk ölçümleri yapılmıştır. Renk analizi sonuçlarında; L* değeri ürünün parlaklığını, a* değeri ürünün kırmızı veya yeşile yakınlığını (+a*: kırmızı; -a*: yeşil), b* değeri de ürün renginin sarı veya maviye yakınlığını (+b*: sarı; -b*: mavi) göstermektedir. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen portakal suyuna ait renk analizi sonuçları Şekil 4.18'de, elma-şeftali suyuna ait renk sonuçları Şekil 4.19.'da görülmektedir.



Şekil 4.18. Portakal suyu örneklerinin depolanması sırasında L* a* b* değerleri.

Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=4).



Şekil 4.19. Elma-şeftali suyu örneklerinin depolanması sırasında L* a* b* değerleri.

Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=4).

L* değerleri açısından portakal suyu örneklerinin ve elma-Şeftali suyu örneklerinin kendi aralarında belirgin bir fark bulunmamaktadır. Portakal suyunun kendi özelliğinden kaynaklı olarak, elma-Şeftali suyuna göre daha parlak olduğu Şekil 4.18 ve 4.19'da görülmektedir. Tüm portakal suyu örneklerinin a* değerlerinin negatif çıktığı; yani yeşile kırmızıdan daha yakın olduğu görülmektedir. Elma-Şeftali suyunda ise a* değerleri pozitifdir; yani rnm rengi kırmızıya daha yakındır. Meyve suyu örnekleri b* değerleri açısından değerlendirildiğinde, portakal ve elma-Şeftali suyu için sonuçların pozitif olduğu; yani sarı renge daha yakın olduğu görülmektedir. Tüm portakal suyu örneklerinin b* değerleri, tüm elma-Şeftali sularına ait b* değerlerinden daha yüksek çıkmıŐtır. Bu da portakal suyunun elma-Şeftali suyuna göre daha sarı renkte olmasıyla açıklanabilmektedir. Meyve sularının probiyotik veya mikrokapsül içermesinden bağımsız olarak, meyvenin doğal olarak içerdiği pigment maddelerinden dolayı bu sonuçlar elde edilmiştir.

Probiyotik mikrokapsüllerinin çarkıfelek meyvesi (*Passiflora edulis*) suyu ile birlikte kurutulularak elde edilen meyve suyu tozlarının incelendiği bir çalışmada, depolama süresince gerçekleştirilen renk analizlerinde +4 C'de depolanan ürünlerin renklerindeki değişimin +25 C'de depolananlardan daha az olduğu gözlenmiştir. Renk değerlerindeki değişimin karotenoidlerin sıcaklık, oksijen ve neme bağlı olarak oksidasyonu sonucunda gerçekleştiği yorumu yapılmıştır [93]. Bu tez çalışmasında ise, depolama yalnızca +4 C'de gerçekleştirilmiş, meyve suyuna sprey kurutma gibi bir sıcaklık uygulaması gerçekleŐtirilmemiŐ ve meyve suyu örneklerini içeren tüpler parafilmlelenerek depolama sırasında oksijen geçişi en aza indirilmiŐtir. Alınan bu önlemler ve sonucunda, renk analizleri sonuçlarındaki deęiŐikliklerin hiçbiri gözle görülür boyutta değildir (Şekil 4.17.).

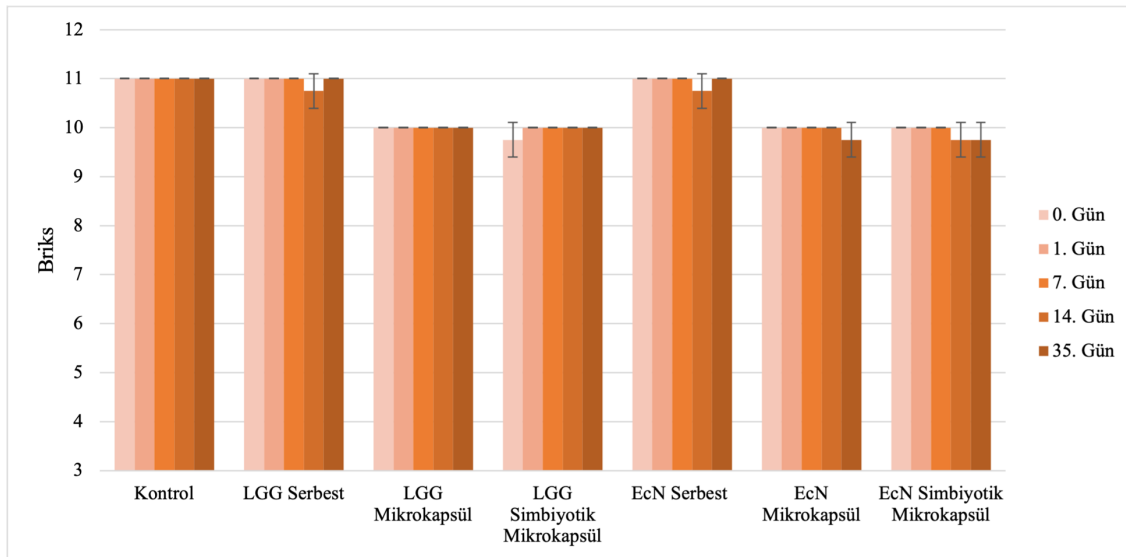
L* ve a* değerlerine göre meyve suyu örnekleri arasında büyük bir farklılık görülmemektedir. b* değerleri açısından; LGG ve EcN enkapsüle formlarını içeren meyve suyu örneklerinde, kontrol grubu ve serbest formda probiyotik içeren meyve suyu örneklerine göre yaklaşık olarak 1 birimlik düŐüklük gözlenmektedir. Sarı renk yoğunluğunu bildiren b* değerinin dŐklęnm, örnek içerisindeki beyaz-yarı Şeffaf renkteki mikrokapsüllerin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Serbest

mikroorganizma içeren hiçbir meyve suyu örneğinde bu durumun görülmemesi bakımından, bu sonuçların alınmasındaki tek etmenin mikrokapsüllerin kendilerine özgü renginin olduğu düşünülmektedir.

4.8.4.4. Suda Çözünür Kuru Madde Miktarı Tayini

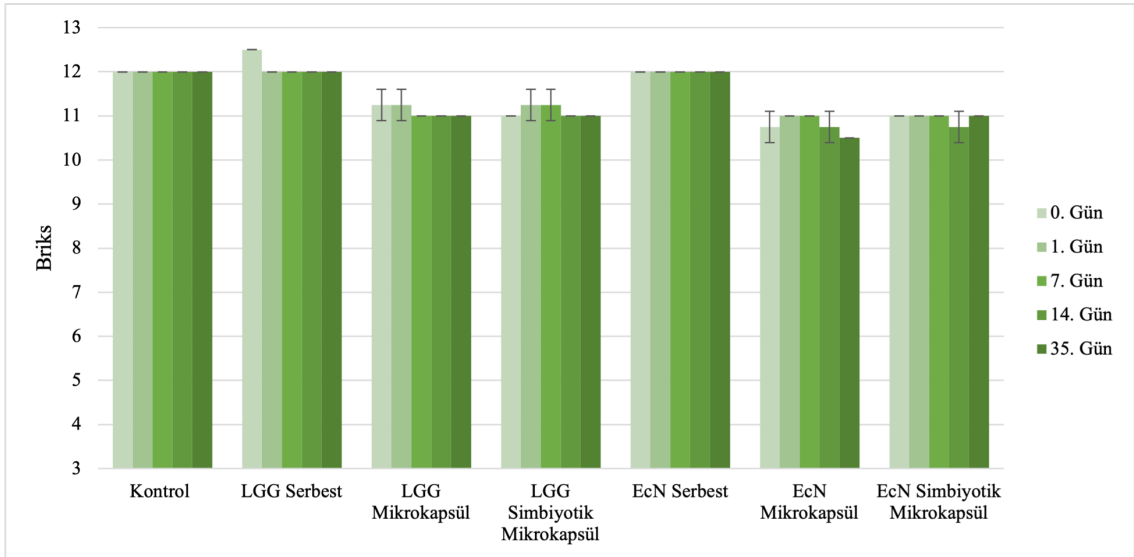
Probiyotik meyve sularının Briks değerleri, depolanmalarının 0., 1., 7., 14. ve 35. günlerinde el refraktometresi ile ölçülmüştür. Meyve sularında suda çözünür kuru madde şekerlerden ve organik asitlerden oluşmaktadır. Briks değerleri meyvelerin olgunluğu ile ilgili bilgi sağlamaktadır. Meyve sularının aynı standartta üretilebilmesi için üretim sırasında Briks değerleri sürekli kontrol edilmektedir.

Tez çalışması kapsamında el refraktometresi ile ölçümü yapılan meyve sularının Briks değerleri Şekil 4.20 ve 4. 21’de sırasıyla portakal ve elma-şeftali suyu için verilmiştir.



Şekil 4.20. Portakal suyu örneklerinin depolama sırasında Briks değerleri.

Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=2).



Şekil 4.21. Elma-şeftali suyu örneklerinin depolama sırasında Briks değerleri.

Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=2).

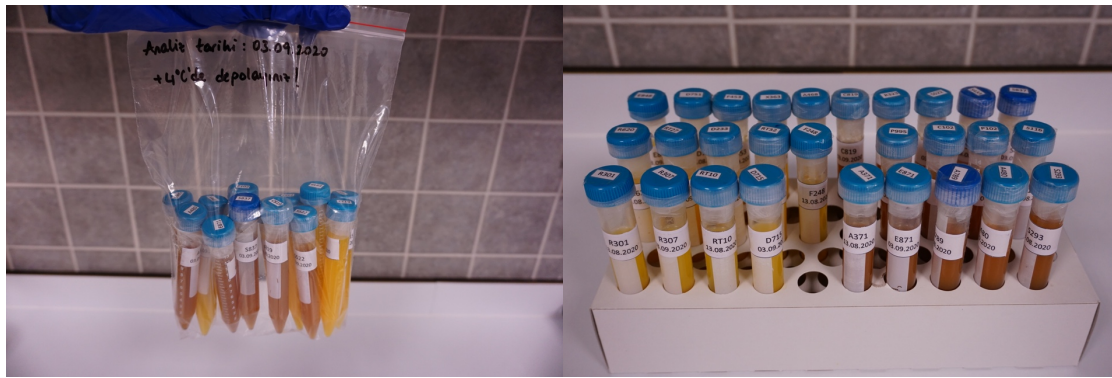
Türk Gıda Kodeksi Meyve Suyu ve Benzeri Ürünler Tebliği'nde konsantreden elde edilen portakal suyu, elma suyu ve şeftali püresi için belirtilen minimum Briks dereceleri sırasıyla 11.2, 11.2 ve 10.0'dur.

Avrupa Meyve Suyu Derneği'nin (AIJN) belirlediği referanslara göre, konsantreden üretilen portakal, elma ve şeftali sularında minimum Briks dereceleri sırasıyla 11.2, 11.2 ve 10'dur.

Kontrol ve serbest mikroorganizma içeren meyve suyu örnekleri minimum değerleri karşılamaktadır. Enkapsüle formdaki meyve sularının SÇKM yüzdelerinin diğer örneklere göre 1 birim düşük çıkmasının nedeni 10 mL meyve suyuna 1 g mikrokapsül eklenmesinden dolayı kuru madde konsantrasyonunda azalma gerçekleşmesindedir. Elde edilen sonuçlara göre meyve sularının Briks değerlerinde depolama süresince değişim olmamıştır.

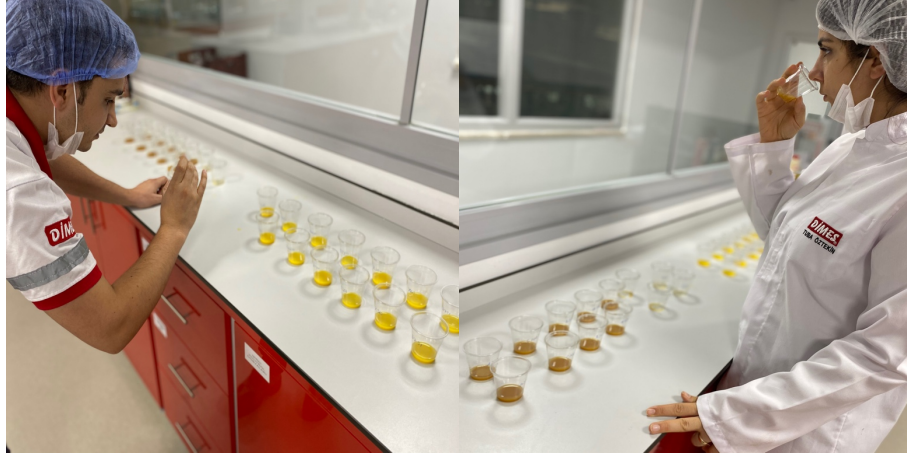
4.8.5. Duyusal Analiz

Oganoleptik stabilitenin sağlanması, meyve sularının tüketilebilirliği açısından önemli bir parametredir. Serbest probiyotik, probiyotik mikrokapsülü ve simbiyotik mikrokapsülü içeren meyve suyu örnekleri, hiç mikroorganizma içermeyen kontrol grubu ile birlikte duyusal değerlendirme testine tabi tutulmuşlardır. Organoleptik analiz öncesi sıcaklığa bağlı olarak farklı sonuçların çıkmaması için tüm örneklerin +4 °C’de depolanmasına dikkat edilmiştir. Duyusal analizler için hazırlanan numuneler Ankara’da hazırlanıp Dimes İzmir Fabrikası’na gönderilmiştir (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. Duyusal analiz için Dimes İzmir’e gönderilmek üzere laboratuvarımızda hazırlanan meyve suyu numuneleri.

Duyusal analizler iki deneyimli kalite mühendisi panelist tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.23.). Renk, kıvam/akışkanlık, koku, aroma, asitlik/ekşilik, ağızda kalan tat ve genel beğeni üzerinden değerlendirme yapılması istenmiştir. Değerlendirmeler 5 noktalı hedonik skalaya göre, meyve sularının depolanmalarının 14. ve 35. günlerinde yapılmıştır. Depolanmanın 14. gününde gerçekleştirilen duyusal analizlerine ait sonuçlar Çizelge 4.5.’te, 35. gün analizlerine ait sonuçlar ise Çizelge 4.6.’da verilmiştir.



Şekil 4.23. Meyve suyu örneklerinin duyu analizi.

Duyusal analiz sonuçlarında, serbest formda probiyotik içeren meyve sularının genel beğeni puanlarının yüksek olduğu görülmektedir. Ticari probiyotik meyve suyu üretiminin gerçekleştirilebilmesi açısından bu sonucun alınmış olması oldukça önemlidir. Diğer taraftan, mikrokapsül içeren meyve sularının genel kabul edilebilirliğinin, serbest probiyotik içeren örneklere göre düşük olduğunu görülmektedir. Bu durumun, meyve suyuna küçük hidrojeller şeklinde mikrokapsüller eklenmesinin pürüzsüz ve akışkan bir sıvı olan meyve suyu beklentisini karşılayamamasından kaynaklandığı; küçük jel yapılarının varlığının önyargı oluşturduğu düşünülmektedir. Bu durumun aşılabilmesi için, ileriki çalışmalarda meyve pulpu içeren özellikteki meyve sularının kullanılmasının bu önyargıyı ortadan kaldırdığı düşünülmektedir. Meyve pulpları ile karışacak mikrokapsüllerin farkedilmesi ve yadırganması durumuyla karşılaşılmayacağı düşünülmektedir.

Meyve sularının renklerinde gözle görülür bir değişiklik bulunmamasıyla beraber (Şekil 4.17.), yapılan duyu değerlendirmelerde serbest formda probiyotik içeren meyve sularının renk kriteri bakımından kontrol grubuyla benzer sonuçlar aldığı görülmektedir. Bu durum, meyve sularında olası bir fermantasyona bağlı olarak renk değişiminin gerçekleşmediğinin göstergesi olarak belirtilebilir. Enkapsüle formda probiyotik içeren örneklerde ise, meyve suyundaki mikrokapsül varlığından dolayı renk kriteri açısından düşük puan aldığı düşünülmektedir. Mikrokapsüller meyve suyuna eklendiğinde meyve suyunun kendi rengini değiştirmemekte ama kapsüllere ait beyaz-yarı saydam partiküller görülebilmektedir.

EcN içeren meyve sularında depolama süresi boyunca herhangi bir koku gelişimi görülmemiştir. LGG içeren portakal sularında 35. günde meyveli yoğurda benzer bir koku farkedilmiştir. Panelistler tarafından da farkedilen bu değişikliğe yönelik verilen puanlar Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6’da 14. ve 35. gün analiz sonuçlarında görülmektedir. LGG içeren elma şeftali suyunda ise, koku kriteri açısından bir değişiklikle karşılaşılmamıştır.

Çizelge 4.5. Portakal ve elma-şeftali suyu örneklerinin depolanmalarının 14. gününde gerçekleştirilen duyusal analiz sonuçları.

	Meyve Suyu Örneği	Renk	Kıvam/ Akışkanlık	Koku	Aroma	Asitlik/ Ekşilik	Ağızda kalan tat	Genel beğeni
Portakal Suyu	Kontrol	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.50±0.71	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00
	LGG Serbest	4.00±0.00	4.00±0.00	3.00±0.00	3.50±0.71	3.50±0.71	4.00±0.00	4.00±0.00
	LGG Mikrokapsül	2.00±0.00	2.50±0.71	2.50±0.71	2.00±0.00	1.50±0.71	1.00±0.00	2.00±0.00
	LGG Simbiyotik	3.00±0.00	3.00±0.00	2.50±0.71	2.50±0.71	2.00±0.00	2.50±0.71	2.50±0.71
	EcN Serbest	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.50±0.71	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00
	EcN Mikrokapsül	2.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	2.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00
	EcN Simbiyotik	2.00±0.00	2.50±0.71	2.00±0.00	1.50±0.71	1.50±0.71	1.50±0.71	2.00±0.00
Elma-Şeftali Suyu	Kontrol	5.00±0.00	4.50±0.71	4.50±0.71	4.50±0.71	4.50±0.71	5.00±0.00	4.75±0.35
	LGG Serbest	4.50±0.71	4.00±0.00	3.50±0.71	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00
	LGG Mikrokapsül	2.00±0.00	2.50±0.71	3.00±0.00	3.00±0.00	2.00±0.00	1.50±0.71	2.00±0.00
	LGG Simbiyotik	3.50±0.71	4.00±0.00	4.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00
	EcN Serbest	5.00±0.00	5.00±0.00	4.50±0.71	4.50±0.71	4.00±0.00	5.00±0.00	4.50±0.71
	EcN Mikrokapsül	2.50±0.71	2.50±0.71	3.00±0.00	2.50±0.71	2.00±0.00	1.50±0.71	2.50±0.71
	EcN Simbiyotik	3.50±0.71	3.50±0.71	3.50±0.71	3.50±0.71	3.50±0.71	2.50±0.71	3.00±0.00

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=2).

Çizelge 4.6. Portakal ve elma-şeftali suyu örneklerinin depolanmalarının 35. gününde gerçekleştirilen duyu analizi sonuçları.

	Meyve Suyu Örneği	Renk	Kıvam/Akışkanlık	Koku	Aroma	Asitlik/Ekşilik	Ağızda kalan tat	Genel beğeni
Portakal Suyu	Kontrol	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	3.50±0.71	3.50±0.71	4.50±0.71	4.00±0.00
	LGG Serbest	3.50±0.71	3.50±0.71	2.50±0.71	3.00±0.00	3.50±0.71	2.50±0.71	3.00±0.00
	LGG Mikrokapsül	4.00±0.00	2.50±0.71	2.50±0.71	2.00±0.00	2.00±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00
	LGG Simbiyotik	4.00±0.00	2.50±0.71	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00
	EcN Serbest	4.00±0.00	4.00±0.00	4.50±0.71	4.50±0.71	4.50±0.71	5.00±0.00	4.00±0.00
	EcN Mikrokapsül	3.50±0.71	3.00±0.00	2.50±0.71	2.50±0.71	3.00±0.00	1.50±0.71	2.00±0.00
	EcN Simbiyotik	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	2.50±0.71	2.50±0.71	1.50±0.71	2.00±0.00
Elma-Şeftali Suyu	Kontrol	4.00±0.00	5.00±0.00	4.50±0.71	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.25±0.35
	LGG Serbest	4.50±0.71	4.50±0.71	4.00±0.00	4.50±0.71	4.00±0.00	4.50±0.71	4.00±0.00
	LGG Mikrokapsül	4.00±0.00	2.50±0.71	3.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	LGG Simbiyotik	3.50±0.71	2.50±0.71	3.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	EcN Serbest	4.00±0.00	4.50±0.71	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00
	EcN Mikrokapsül	2.50±0.71	2.50±0.71	3.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	1.50±0.71	2.00±0.00
	EcN Simbiyotik	3.50±0.71	2.50±0.71	3.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	1.50±0.71	2.00±0.00

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=2).

Meyve suyuna eklenen mikrokapsüllerin farklı boyutlarda olması, tüketici tarafından istenmeyen bir özellik olabilir. Duyusal analizler sonucunda böyle bir yorumla karşılaşılmamasıyla beraber, bu veya buna benzer bir çalışmanın üretim boyutunun gerçekleştirilmesi durumunda uniform yapıda mikrokapsül eldesinin ürünün kabul edilebilirliği üzerinde daha iyi etki bırakabileceği öngörülmektedir. Emülsiyon yöntemiyle uniform yapıda mikrokapsül eldesi mümkün değildir. Sprey kurutma gibi

hem kütleli üretime izin veren hem de aynı boyutlarda mikrokapsül üretimine olanak sağlayan farklı enkapsülasyon yöntemleri sonraki çalışmalarda uygulanabilir.

Bir mikroenkapsülasyon çalışmasında, ekstrüzyon yöntemiyle elde edilen LGG aljinat-kitozan mikrokapsülleri elma suyuna eklenmiş ve 90 günlük depolama sonucunda yapılan duyu analizlerde mikroenkapsülasyon işleminin tüm duyu parametreleri açısından iyileştirme sağladığı ortaya konmuştur. Mikrokapsüllerin görünür ve hissedilir olduğu belirtilse de bu durumun ağızda kalan hissin daha iyi olduğu şeklinde yorumlanmıştır [76]. Bir başka çalışmada da kitozan kaplı aljinat kapsüllerinin meyve suyunun duyu özelliklerini olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir [94]. Serbest LGG hücreleri içeren elma suyu örneklerinde fermantasyona bağlı olarak bazı metabolitlerin salınması sonucunda istenmeyen, ekşi, tereyağımsı aroma varlığı saptanmıştır [76,95]. Ölü hücrelerden salınan enzimlerin de şeker hidrolizi gerçekleştirerek asidifikasyona sebep olabileceği yorumu yapılmıştır [96]. Diğer çalışmalarda da enkapsülasyon işleminin meyve suyunda probiyotik mikroorganizmalardan kaynaklı asidifikasyonu sınırladığı yorumu yapılmıştır [97].

İnülin içeren mikrokapsüllerin, inülin içermeyen mikrokapsüllere göre meyve suyunun duyu özellikleri bakımından bir farklılık oluşturmadığı da çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir [76,95]. Bu tez çalışmasında alınan sonuçlar da bu yorumu desteklemektedir.

Ekstrüzyon yöntemi ile elde edilen XG:GG probiyotik mikrokapsüllerinin çikolataya eklendiği bir çalışmada, duyu analiz panelistlerinin mikrokapsül içeren çikolata örneklerini 9 noktalı Hedonik skala üzerinden 8.41 ± 0.91 puan ile değerlendirmişlerdir. Burada mikrokapsüllerin işlendiği gıdanın oldukça önemli olduğu ve çikolatanın probiyotik mikrokapsüllerinin taşınmasında iyi bir alternatif olduğu görülmektedir [98].

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen ve sadece iki kalite mühendisi tarafından gerçekleştirilen duyu analiz sonuçlarına göre, kullanılan meyve suyunun cinsinden ve probiyotik mikroorganizmanın LGG veya EcN olmasından bağımsız olarak, mikrokapsül

ve simbiyotik mikrokapsül içeren örneklerin kabul edilebilirliğinin düşük olduğu söylenebilir. Bu duruma, meyve suyunda hidrojel kapsüllerinin varlığına karşı meyve suyu sektöründe çalışan uzmanların önyargısının sebep olduğu düşünülmektedir. Serbest mikroorganizma içeren örneklerin yüksek beğeniye sahip olması bu yorumu desteklemektedir. Profesyonel olarak bu işi yapan iki panelistin değerlendirmesinin, tüketicinin beğenisi olarak sunulamayacağı da bu sonuçlara yönelik ayrı bir değerlendirmedir. İleri çalışmalarda, eğitilmiş ve eğitimsiz panelistlerden oluşan daha geniş bir panel oluşturularak duyu analizler gerçekleştirilmelidir. Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm analizlerde olduğu gibi, duyu analiz sonuçları da ticari probiyotik meyve suyunun üretilmesine yönelik önemli çıktılar sağlamaktadır.

5. YORUM

Meyve suyu sektörü için süt ürünü olmayan seçeneklerde probiyotiklerin kullanım olanaklarını araştıran ve mide-bağırsak yolundan geçiş sırasında probiyotiklerin direncini değerlendiren daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, probiyotiklerin asit toleransı yüksek olan GRAS sınıfından polimerlerle enkapsüle edilmesiyle, meyve suyundaki probiyotik canlılığının istenen seviyede tutulabileceği, ayrıca bu kapsüllerin tüketiminden itibaren bağırsağa ulaşana kadar probiyotik canlılığının büyük oranda korunabileceği ortaya konmuştur.

Bu çalışmada, probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu ve elde edilen mikrokapsüllerin meyve sularında kullanımının araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, farklı polimer çözeltileri kullanılarak LGG ve EcN probiyotik bakterileri emülsiyon yöntemiyle enkapsüle edilmişlerdir ve enkapsülasyon verimleri hesaplanmıştır. Enkapsülasyon verimi sonuçlarına bakılarak enkapsülasyon işleminin başarıyla gerçekleştirildiği belirlendikten sonra, mikrokapsüllerin morfolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. SEM mikrograflarına göre emülsiyon yöntemiyle gerçekleştirilen enkapsülasyon işlemiyle mikron boyutunda kapsüllerin elde edildiği belirlendikten sonra, probiyotik mikrokapsüllerinin sindirim sistemi simülasyonundaki başarıları *in vitro* koşullarda belirlenmiştir. Çeşitli kriterlere göre değerlendirilen mikrokapsüllerden 1XG:1GG mikrokapsüllerinin ve simbiyotik mikrokapsüllerinin meyve suyu örneklerine eklenmesine karar verilmiştir. Elde edilen meyve suyu örnekleri 35 gün boyunca depolanmış ve depolamanın 0., 1., 7., 14. ve 35. günlerinde probiyotik canlılığının belirlendiği canlılık analizleri ve meyve sularının çeşitli kalite kriterlerine göre değerlendirildiği kalite analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, elde edilen meyve suyu örneklerinin duyuusal kabul edilebilirliğinin belirlenmesi amacıyla iki kalite mühendisi tarafından duyuusal analizler gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre;

1. Emülsiyon yöntemi ile enkapsülasyonda hidrojel oluşturma özelliği olan polimerlerin kullanılması gerekmektedir. Bu özelliği bulunmayan CAP gibi polimerlerin, aljinat gibi jelleşme özelliği bulunan polimerlerle birlikte karıştırılarak kullanılması gerekmektedir.
2. 1XG:1GG polimer çözeltisinin çok yoğun jel yapısında olması, farklı enkapsülasyon yöntemleriyle uyumlu çalışmasına engel olabilir. Çözeltinin

akışkanlığı ile ilgili olan bu durum, sprey kurutma veya ekstrüzyon gibi ince uçlu atomizerlerin kullanıldığı yöntemlerde sistemde tıkanıklığa sebep olabilir.

3. Emülsiyon yönteminin, probiyotiklerin mikroenkapsülasyonda yüksek verimin sağlanabildiği bir yöntem olduğu belirlenmiştir. İhtiyaç duyulduğunda büyük hacimlerde üretim yapılmasına ve bununla beraber mikroorganizmaların canlılıklarının işlemden etkilenmemesi için ılımlı enkapsülasyon koşullarının sağlanmasına imkân vermesi bakımından önemli bir enkapsülasyon yöntemidir. Bununla beraber, yöntemin uygulanmasında manyetik karıştırıcı dışında yüksek fiyatlı ekipman gerektirmemesi ve uygulamasının kolay olması yöntemin sağladığı avantajlar içerisindedir. Yöntemde yağ kullanımı bir maliyet oluşturmaktadır ve bu yağ fazının kapsüllerden uzaklaştırılması işlemi yöntemin tek zorlayıcı tarafıdır. Yöntemin optimizasyonu bu zorluk aşılmıştır.
4. Alınan SEM görüntülerinde mikron boyutunda, düzensiz şekilde kapsüllerin elde edildiği görülmüştür. Kapsüllerin farklı boyutlarda oluştuğu ve monodispers yapı göstermediği ortaya konmuştur. Emülsiyon yönteminin uygulandığı enkapsülasyon çalışmalarında bu sonucun alınması beklenmektedir.
5. SEM mikrograflarında, 2-10 µm boyutlarındaki küçük kapsüllerin kümeleşme göstererek büyük kapsüller oluşturduğu veya başka kapsüllerin yüzeyine yerleştiği görülmüştür. Bu durumun iki sebebi olabilir. Birincisi, emülsiyon yöntemiyle gerçekleştirilen enkapsülasyon işleminde, su fazına geçen mikrokapsüllerin tam olarak sertleşme göstermeden birbirleriyle interaksiyona girmesidir. İkincisi ise; SEM öncesi gerçekleştirilen liyofilizasyon işleminde evaporasyonun yavaş gerçekleşmesinden kaynaklı olarak mikrokapsüllerin kuruma esnasında agregat olmasındadır.
6. LGG, düşük pH değerine (<3) duyarlı olduğu ve canlılığını kaybettiği; EcN'in ise bu konuda biraz daha başarılı olduğu ve daha düşük pH koşullarında (pH 2.5) canlılığını sürdürebildiği belirlenmiştir. EcN'in probiyotik özellik göstermesine karşın sindirim sistemi simülasyonunda LGG'den farklı bir profil göstermesi gelecekte söz konusu olabilecek klinik çalışmalarda dikkat edilmesi gereken bir avantajdır.
7. Enkapsülasyon işleminin probiyotiklerin sindirim sistemi simülasyonunda canlı kalma yüzdelerini artırdığı belirlenmiştir. Yüzdelerdeki artış kullanılan polimer

çözeltilerine göre değişmekle beraber, mikrokapsül örneklerinden alınan en düşük sonuç bile serbest formdaki mikroorganizmaların canlı kalma yüzdesinden yüksektir.

8. Enkapsülasyonda kullanılan polimer konsantrasyonu arttıkça sindirim sistemi simülasyonunda probiyotiklerin korunmasına yönelik daha yüksek başarı sağlanmıştır. Konsantrasyonun artmasıyla mikrokapsülün daha stabil hale geldiği düşünölmektedir.
9. Aljinata CAP eklenmesiyle, bu polimerin probiyotikleri sindirim sistemi koşullarından korumadaki etkinliği artırılmıştır. CAP polimerinin aljinatin gözenekli yapısı içine yerleşmesinin ve asidik ortamda çözünmeyip bazik ortamda kontrollü olarak salınımına izin vermesinin bu etkinliğin sağlanmasında rol oynadığı düşünölmektedir.
10. 1XG:1GG polimer karışımı oda sıcaklığında yoğun kıvamda jel oluşturduğu için enkapsülasyon işlemine alınmadan önce, 37 °C'de bekletilerek akışkanlığı sağlanmıştır (Bu işlem diğer polimer çözeltileri için de gerçekleştirilmiştir). Bu özelliği sayesinde, mikrokapsüller elde edildikten sonra ortam sıcaklığında bağlı olarak tekrar yoğun jel oluşturduğu ve probiyotikleri sindirim sistemi koşullarından 0.5XG:1GG karışımından daha iyi koruduğu gözlemlenmiştir. XG konsantrasyonu probiyotiklerin korunmasında önemli bir parametredir.
11. Simbiyotik mikrokapsüllerin her iki mikroorganizmanın sindirim sistemi koşullarından korunmasında diğer mikrokapsüllere göre daha yüksek başarı sağlanması iki parametreyle ilişkilendirilmiştir. Birincisi; inülinin bazı probiyotik mikroorganizmalar için prebiyotik özelliği göstermesine bağlı olarak, kapsül içinde probiyotik canlılığının artmasıdır. LGG simbiyotik mikrokapsüllerinde sağlanan yüksek başarı bu etkiyle yorumlanmıştır. İkinci parametre ise; inülinin aynı zamanda bir enkapsülasyon polimeri olmasından dolayı polimer konsantrasyonunu artırması ve probiyotiklerin korunmasında daha yüksek etkinin sağlanmasıdır. EcN simbiyotik mikrokapsüllerindeki başarı yalnızca bu parametreye bağlanmıştır. Probiyotik enkapsülasyonunda inülin kullanımı probiyotiklerin olumsuz ortam koşullarından korunmasında etkili bir yaklaşımdır.
12. 3ALG:1CAP ve 1XG:1GG mikrokapsül ve simbiyotik mikrokapsüllerinin, sindirim sistemi simülasyonunda benzer başarı göstermeleri dolayısıyla meyve

suyuna eklenecek mikrokapsüllerin belirlenmesinde başka etmenler de dikkate alınmıştır. 1XG:1GG mikrokapsüllerinin yoğun jel kıvamında olmasının depolama süresince mikrokapsül bütünlüğünün korunmasında etkili olacağı düşünülmüştür. Bununla beraber, XG ve GG polimerlerinin içecek sanayiinde katkı maddesi olarak kullanımı bu polimerlerin meyve suyu ile daha uyumlu olacağı kararının alınmasındaki etmenlerden biridir.

13. Meyve sularının probiyotik gıda olarak adlandırılabilmesi için canlı probiyotik bakteri sayısının 10^6 kob/g olması gerekmektedir. LGG içeren tüm meyve suyu örneklerinde canlı mikroorganizma sayısının 35 günlük depolama süresi boyunca bu değer üzerinde olduğu belirlenmiştir. EcN içeren örneklerde ise 35. günde 10^6 kob/mL değerinin altına düştüğü gözlenmiştir. EcN içeren ticari meyve suyu üretimi yapılması durumunda depolama süresi 14 gün olarak belirlenmelidir.
14. Enkapsülasyon işleminin depolama süresince sağladığı koruma özellikle EcN verilerinde görülmektedir. LGG’de bu etkinin daha net olarak belirlenebilmesi için meyve suyu örneklerinin daha uzun süre depolandığı ileri çalışmalar planlanabilir.
15. Simbiyotik mikrokapsül içeren meyve suyu örneklerinde canlılığın korunmasındaki yüksek başarının 18. maddede açıklanan etmenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.
16. EcN içeren meyve suyu örneklerinden alınan sonuçlara göre elma-şeftali suyunun probiyotik mikrokapsülleri için daha iyi bir taşıyıcı olabileceği düşünülmektedir. Portakal suyuna göre daha yoğun kıvamda olması ve içerdiği yüksek meyve posasının depolama boyunca mikrokapsül bütünlüğünü desteklediği yorumu yapılabilir. Gelecekte EcN mikrokapsülü içeren ticari meyve suyu üretiminin söz konusu olması durumunda elma-şeftali suyu iyi bir tercih olabilir.
17. Serbest formda LGG içeren meyve suyu örneklerinde zaman içerisinde pH değerlerinde az bir düşüş yaşanması LGG’nin meyve suyunda fermantasyon yaptığının işareti olabilir. Serbest formda LGG içeren meyve suyu örnekleri dışında hiçbir meyve suyunun pH değerinde düşüş belirlenmemiş olması, probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunun meyve suyunun probiyotikler tarafından fermente edilmesini engellediği şeklinde yorumlanmıştır.

18. Meyve sularının renkleri depolama süresince korunmuştur. Meyve sularına probiyotik ilavesinin, renk kriteri açısından meyve sularında bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Meyve suyu örneklerinin suda çözünür kuru madde içeriğinde de depolama süresince bir değişiklik belirlenmemiştir. Meyve sularına probiyotik ilavesinin kalite kriterleri bakımından bir değişikliğe sebep olmaması, gelecekte ticari probiyotik meyve suyu üretimi açısından oldukça önemlidir.
19. Meyve suyu örneklerinin duyu analizlerinde, serbest formda probiyotik içeren meyve suyu örnekleri yüksek genel beğeniye ulaşmıştır. Bu durum, ticari bir probiyotik meyve suyu üretimine yönelik oldukça önemli bir bulgudur. Diğer taraftan, mikrokapsül içeren meyve sularına karşı önyargının yüksek olduğu görülmektedir. Akışkan bir sıvının içerisinde partikül varlığı beğeniye etkileyen etmenlerden biridir.

Gelecekte duyu kabul edilebilirliği yüksek, probiyotik mikrokapsülleri içeren meyve sularının geliştirilmesi için meyve pulpu içeren, homojen yapı göstermeyen meyve sularının kullanıldığı ileri çalışmalar gerçekleştirilebilir. Ayrıca, probiyotik gıda yelpazesinin genişletilmesi bakımından, mikrokapsüller için iyi taşıyıcı olabileceği düşünülen çikolata gibi ürünlere probiyotik mikrokapsüllerinin işlenmesi çalışmaları gerçekleştirilebilir.

Bu tez çalışması ile, enkapsülasyonun probiyotiklerin olumsuz koşullardan korunarak biyoyararlanımının artırılmasında etkili bir yöntem olduğu, probiyotik meyve suyu üretiminin mümkün olduğu ve probiyotik meyve sularının duyu kabul edilebilirliğinin daha da artırılabilmesi için ileri çalışmaların yapılması gerektiği ortaya konmuştur.

6. KAYNAKLAR

- [1] Fao, Probiotics In Food: Health And Nutritional Properties And Guidelines For Evaluation, **2001**.
- [2] M.I. Hossain, M. Sadekuzzaman, S. Do Ha, Probiotics As Potential Alternative Biocontrol Agents In The Agriculture And Food Industries: A Review, Food Research International. 100 (**2017**) 63–73.
- [3] A. Mortazavian, S.H. Razavi, M.R. Ehsani, S. Sohrabvandi, Principles And Methods Of Microencapsulation Of Probiotic Microorganisms, IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY. 5 (**2007**) 1–18.
- [4] L. de Souza Simões, D.A. Madalena, A.C. Pinheiro, J.A. Teixeira, A.A. Vicente, Ó.L. Ramos, Micro- And Nano Bio-Based Delivery Systems For Food Applications: In Vitro Behavior, Advances in Colloid and Interface Science. 243 (**2017**) 23–45.
- [5] K. Kailasapathy, Encapsulation Technologies For Functional Foods And Nutraceutical Product Development, CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. 4 (**2009**) 1–19.
- [6] J. Burgain, C. Gaiani, M. Linder, J. Scher, Encapsulation Of Probiotic Living Cells: From Laboratory Scale To Industrial Applications, Journal of Food Engineering. 104 (**2011**) 467–483.
- [7] A.R. Patel, Probiotic Fruit And Vegetable Juices- Recent Advances And Future Perspective, International Food Research Journal. 24 (**2017**) 1850–1857.
- [8] A.E.C. Antunes, A.M. Liserre, A.L.A. Coelho, C.R. Menezes, I. Moreno, K. Yotsuyanagi, N.C. Azambuja, Acerola Nectar With Added Microencapsulated Probiotic, LWT - Food Science and Technology. 54 (**2013**) 125–131.
- [9] M.E. Segers, S. Lebeer, Towards A Better Understanding Of Lactobacillus Rhamnosus GG - Host Interactions, Microb. Cell Fact., **2014**.
- [10] W.A. Walker, Dysbiosis, Microbiota Gastrointest. Pathophysiol. Implic. Hum. Heal. Prebiotics, Probiotics, Dysbiosis, **2016**.
- [11] F. Scaldaferri, V. Gerardi, F. Mangiola, L.R. Lopetuso, M. Pizzoferrato, V. Petito, A. Papa, J. Stojanovic, A. Poscia, G. Cammarota, A. Gasbarrini, Role And

- Mechanisms Of Action Of Escherichia Coli Nissle 1917 In The Maintenance Of Remission In Ulcerative Colitis Patients: An Update, *World Journal of Gastroenterology*. 22 (2016) 5505–5511.
- [12] B. Albertini, B. Vitali, N. Passerini, F. Cruciani, M. Di Sabatino, L. Rodriguez, P. Brigidi, Development Of Microparticulate Systems For Intestinal Delivery Of Lactobacillus Acidophilus And Bifidobacterium Lactis, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 40 (2010) 359–366.
- [13] Y. Doleyres, C. Paquin, M. LeRoy, C. Lacroix, Bifidobacterium Longum ATCC 15707 Cell Production During Free- And Immobilized-Cell Cultures In MRS-Whey Permeate Medium, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60 (2002) 168–173.
- [14] W. Sun, M.W. Griffiths, Survival Of Bifidobacteria In Yogurt And Simulated Gastric Juice Following Immobilization In Gellan-Xanthan Beads, *International Journal of Food Microbiology*. 61 (2000) 17–25.
- [15] Anonim, Meyve Suyu Endüstrisi Derneği, <http://www.meyed.org.tr/tr/anasayfa> (Erişim tarihi: **21 Aralık 2020**).
- [16] M.D. Luyer, W.A. Buurman, M. Hadfoune, G. Speelmans, J. Knol, J.A. Jacobs, C.H.C. Dejong, A.J.M. Vrieseema, J.W.M. Greve, Strain-Specific Effects Of Probiotics On Gut Barrier Integrity Following Hemorrhagic Shock, *Infection and Immunity*. 73 (2005) 3686–92.
- [17] M.J. Chen, K.N. Chen, Applications Of Probiotic Encapsulation In Dairy Products, *Encapsulation Control. Release Technol. Food Syst.*, 2007.
- [18] M. Collado, E. Isolauri, S. Salminen, Y. Sanz, The Impact Of Probiotic On Gut Health, *Current Drug Metabolism*. 10 (2009) 68–7.
- [19] J.H. Cummings, J.M. Antoine, F. Azpiroz, R. Bourdet-Sicard, P. Brandtzaeg, P.C. Calder, G.R. Gibson, F. Guarner, E. Isolauri, D. Pannemans, C. Shortt, S. Tuijelaars, B. Watzl, PASSCLAIM - Gut Health And Immunity, *European Journal of Nutrition*. (2004).
- [20] B. Corthésy, H.R. Gaskins, A. Mercenier, Cross-Talk Between Probiotic Bacteria And The Host Immune System, *Journal of Nutrition*. 137 (2007) 781–90.
- [21] E.M. Tuomola, A.C. Ouwehand, S.J. Salminen, The Effect Of Probiotic Bacteria

- On The Adhesion Of Pathogens To Human Intestinal Mucus, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 26 (1999) 137–42.
- [22] T.A. Oelschlaeger, Mechanisms Of Probiotic Actions - A Review, *International Journal of Medical Microbiology*. 300 (2010) 57–62.
- [23] A.C. Ouwehand, K. Tiihonen, H. Mäkivuokko, N. Rautonen, *Synbiotics: Combining The Benefits Of Pre- And Probiotics*, *Funct. Dairy Prod.* Second Ed., 2007.
- [24] Anonim, The LGG® Strain – The World’s Most Documented Probiotic Strain, <https://www.chr-hansen.com/en/probiotic-supplements-and-infant-formula/our-probiotic-strains/lactobacillus-rhamnosus-gg-trademark-lgg> (Erişim tarihi: 21 Aralık 2020).
- [25] K. GODERSKA, M. ZYBAŁA, Z. CZARNECKI, Characterisation Of Microencapsulated *Lactobacillus Rhamnosus* LR7 Strain, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 53 (2003) 21–24.
- [26] C.P. Champagne, K. Kailasapathy, Encapsulation Of Probiotics, *Deliv. Control. Release Bioact. Foods Nutraceuticals*, 2008.
- [27] N.J. Zuidam, E. Shimoni, Overview Of Microencapsulates For Use In Food Products Or Processes And Methods To Make Them, *Encapsulation Technol. Act. Food Ingredients Food Process.*, 2010.
- [28] A. Picot, C. Lacroix, Encapsulation Of *Bifidobacteria* In Whey Protein-Based Microcapsules And Survival In Simulated Gastrointestinal Conditions And In Yoghurt, *International Dairy Journal*. 14 (2004) 505–515.
- [29] W.K. Ding, N.P. Shah, Effect Of Homogenization Techniques On Reducing The Size Of Microcapsules And The Survival Of Probiotic Bacteria Therein, *Journal of Food Science*. 74 (2009) 231–6.
- [30] A. Nag, K.S. Han, H. Singh, Microencapsulation Of Probiotic Bacteria Using PH-Induced Gelation Of Sodium Caseinate And Gellan Gum, *International Dairy Journal*. 21 (2011) 247–253.
- [31] I. Alemzadeh, M. Hajiabbas, H. Pakzad, S. Sajadi Dehkordi, A. Vossoughi, Encapsulation Of Food Components And Bioactive Ingredients And Targeted Release, *International Journal of Engineering, Transactions A: Basics*. 33 (2020)

- 1–11.
- [32] Y. Zhang, J. Lin, Q. Zhong, S/O/W Emulsions Prepared With Sugar Beet Pectin To Enhance The Viability Of Probiotic *Lactobacillus Salivarius* NRRL B-30514, *Food Hydrocolloids*. 52 (2016) 804–810.
- [33] L. Goibier, C. Pillement, J. Monteil, C. Faure, F. Leal-Calderon, Preparation Of Multiple Water-In-Oil-In-Water Emulsions Without Any Added Oil-Soluble Surfactant, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 590 (2020) 124492.
- [34] L. Wang, M. Song, Z. Zhao, X. Chen, J. Cai, Y. Cao, J. Xiao, *Lactobacillus Acidophilus* Loaded Pickering Double Emulsion With Enhanced Viability And Colon-Adhesion Efficiency, *LWT*. 121 (2020) 108928.
- [35] W. Krasaekoopt, B. Bhandari, H. Deeth, Evaluation Of Encapsulation Techniques Of Probiotics For Yoghurt, *International Dairy Journal*. 13 (2003) 3–13.
- [36] F.J. Rodrigues, M.H. Omura, M.F. Cedran, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa-Dekker, S. Garcia, Effect Of Natural Polymers On The Survival Of *Lactobacillus Casei* Encapsulated In Alginate Microspheres, *Journal of Microencapsulation*. 34 (2017) 431–439.
- [37] C.S. Favaro-Trindade, R.J.B. Heinemann, D.L. Pedroso, Developments In Probiotic Encapsulation, *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. (2011).
- [38] M. de Araújo Etchepare, G.C. Raddatz, É.M. de Moraes Flores, L.Q. Zepka, E. Jacob-Lopes, J.S. Barin, C.R. Ferreira Grosso, C.R. de Menezes, Effect Of Resistant Starch And Chitosan On Survival Of *Lactobacillus Acidophilus* Microencapsulated With Sodium Alginate, *LWT - Food Science and Technology*. 65 (2016) 511–517.
- [39] C.P. Reis, R.J. Neufeld, S. Vilela, A.J. Ribeiro, F. Veiga, Review And Current Status Of Emulsion/Dispersion Technology Using An Internal Gelation Process For The Design Of Alginate Particles, *Journal of Microencapsulation*. 23 (2006) 245–57.
- [40] Q.Y. Dong, M.Y. Chen, Y. Xin, X.Y. Qin, Z. Cheng, L.E. Shi, Z.X. Tang, Alginate-Based And Protein-Based Materials For Probiotics Encapsulation: A

- Review, *International Journal of Food Science and Technology*. 48 (2013) 1339–1351.
- [41] S. Ray, U. Raychaudhuri, R. Chakraborty, An Overview Of Encapsulation Of Active Compounds Used In Food Products By Drying Technology, *Food Bioscience*. 13 (2016) 76–83.
- [42] H. Liu, S.W. Cui, M. Chen, Y. Li, R. Liang, F. Xu, F. Zhong, Protective Approaches And Mechanisms Of Microencapsulation To The Survival Of Probiotic Bacteria During Processing, Storage And Gastrointestinal Digestion: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59 (2019) 2863–2878.
- [43] S. Rathore, P.M. Desai, C.V. Liew, L.W. Chan, P.W.S. Heng, Microencapsulation Of Microbial Cells, *Journal of Food Engineering*. 116 (2013) 369–381.
- [44] J. Chen, Q. Wang, C.M. Liu, J. Gong, Issues Deserve Attention In Encapsulating Probiotics: Critical Review Of Existing Literature, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57 (2017) 1228–1238.
- [45] F.J. Rodrigues, M.F. Cedran, J.L. Bicas, H.H. Sato, Encapsulated Probiotic Cells: Relevant Techniques, Natural Sources As Encapsulating Materials And Food Applications – A Narrative Review, *Food Research International*. 137 (2020) 109682.
- [46] A.M. Mortazavian, A. Azizi, M.R. Ehsani, S.H. Razavi, S.M. Mousavi, S. Sohrabvandi, J.A. Reinheimer, Survival Of Encapsulated Probiotic Bacteria In Iranian Yogurt Drink (Doogh) After The Product Exposure To Simulated Gastrointestinal Conditions, *Milchwissenschaft*. 63 (2008) 349 – 472.
- [47] S. Gouin, Microencapsulation: Industrial Appraisal Of Existing Technologies And Trends, *Trends Food Sci. Technol.*, 2004.
- [48] C.S. Fávares-Trindade, C.R.F. Grosso, Microencapsulation Of *L. Acidophilus* (La-05) And *B. Lactis* (Bb-12) And Evaluation Of Their Survival At The PH Values Of The Stomach And In Bile, *Journal of Microencapsulation*. 19 (2002) 485–94.
- [49] A. Kumar, K.M. Rao, S.S. Han, Application Of Xanthan Gum As Polysaccharide In Tissue Engineering: A Review, *Carbohydrate Polymers*. 180 (2018) 128–144.
- [50] D. Kavitha, S. Kandasamy, P.B. Devi, P.H. Shetty, Recent Developments On Encapsulation Of Lactic Acid Bacteria As Potential Starter Culture In Fermented

- Foods – A Review, *Food Bioscience*. 21 (2018) 34–44.
- [51] K. Sultana, G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, K. Kailasapathy, Encapsulation Of Probiotic Bacteria With Alginate-Starch And Evaluation Of Survival In Simulated Gastrointestinal Conditions And In Yoghurt, *International Journal of Food Microbiology*. 62 (2000) 47–55.
- [52] L. Chen, T. Yang, Y. Song, G. Shu, H. Chen, Effect Of Xanthan-Chitosan-Xanthan Double Layer Encapsulation On Survival Of Bifidobacterium BB01 In Simulated Gastrointestinal Conditions, Bile Salt Solution And Yogurt, *LWT - Food Science and Technology*. 81 (2017) 274–280.
- [53] M. Bekhit, L. Sánchez-González, G. Ben Messaoud, S. Desobry, Design Of Microcapsules Containing Lactococcus Lactis Subsp. Lactis In Alginate Shell And Xanthan Gum With Nutrients Core, *LWT - Food Science and Technology*. 68 (2016) 446–453.
- [54] K.M. Zia, S. Tabasum, M.F. Khan, N. Akram, N. Akhter, A. Noreen, M. Zuber, Recent Trends On Gellan Gum Blends With Natural And Synthetic Polymers: A Review, *International Journal of Biological Macromolecules*. 109 (2018) 1068–1087.
- [55] K. Li, B. Wang, W. Wang, G. Liu, W. Ge, M. Zhang, B. Yue, M. Kong, Microencapsulation Of Lactobacillus Casei BNCC 134415 Under Lyophilization Enhances Cell Viability During Cold Storage And Pasteurization, And In Simulated Gastrointestinal Fluids, *LWT*. 116 (2019) 108521.
- [56] E. Unal Turhan, Optimization Of Entrapment Substances For Microencapsulation Of Lactobacillus Plantarum And Lactobacillus Casei Shirota Against Gastric Conditions, *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 25 (2019) 531–537.
- [57] S. Mitmesser, M. Combs, Prebiotics: Inulin And Other Oligosaccharides, *Microbiota Gastrointest. Pathophysiol. Implic. Hum. Heal. Prebiotics, Probiotics, Dysbiosis*, 2017.
- [58] R. Rajam, C. Anandharamakrishnan, Microencapsulation Of Lactobacillus Plantarum (MTCC 5422) With Fructooligosaccharide As Wall Material By Spray Drying, *LWT - Food Science and Technology*. 60 (2015) 773–780.
- [59] W. Krasaekoopt, S. Watcharapoka, Effect Of Addition Of Inulin And

- Galactooligosaccharide On The Survival Of Microencapsulated Probiotics In Alginate Beads Coated With Chitosan In Simulated Digestive System, Yogurt And Fruit Juice, *LWT - Food Science and Technology*. 57 (2014) 761–766.
- [60] K.W. Lai, Y.H. How, L.P. Pui, Storage Stability Of Microencapsulated *Lactobacillus Rhamnosus* GG In Hawthorn Berry Tea With Flaxseed Mucilage, *Journal of Food Processing and Preservation*. 44 (2020) 14965.
- [61] K. Lai, Y. How, L. Pui, Microencapsulation Of *Lactobacillus Rhamnosus* GG With Flaxseed Mucilage Using Co-Extrusion Technique, *Journal of Microencapsulation*. 38 (2020) 134–148.
- [62] N. Jiang, G. Dev Kumar, J. Chen, A. Mishra, K. Mis Solval, Comparison Of Concurrent And Mixed-Flow Spray Drying On Viability, Growth Kinetics And Biofilm Formation Of *Lactobacillus Rhamnosus* GG Microencapsulated With Fish Gelatin And Maltodextrin, *LWT*. 124 (2020) 109200.
- [63] C. Zhang, S.Y. Quek, N. Fu, Y. Su, P.A. Kilmartin, X.D. Chen, Storage Stability And In Vitro Digestion Of Microencapsulated Powder Containing Fermented Noni Juice And Probiotics, *Food Bioscience*. 37 (2020) 100740.
- [64] M.A. Oguntoye, O.O. Ezekiel, O.A. Oridupa, Viability Of *Lactobacillus Rhamnosus* GG In Provitamin A Cassava Hydrolysate During Fermentation, Storage, In Vitro And In Vivo Gastrointestinal Conditions, *Food Bioscience*. 40 (2020) 100845.
- [65] H. Pourjafar, N. Noori, H. Gandomi, A.A. Basti, F. Ansari, Viability Of Microencapsulated And Non-Microencapsulated *Lactobacilli* In A Commercial Beverage, *Biotechnology Reports*. 25 (2020) e00432.
- [66] A. Temiz, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, 5th ed., Hatiboğlu Yayınevi, 2010.
- [67] M. Kurban, *Saccharomyces cerevisiae* DNA Barkodunun Belirlenmesi ve Ulusal Veri Tabanının Oluşturulması, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2019.
- [68] Q. Zou, J. Zhao, X. Liu, F. Tian, H. ping Zhang, H. Zhang, W. Chen, Microencapsulation Of *Bifidobacterium Bifidum* F-35 In Reinforced Alginate Microspheres Prepared By Emulsification/Internal Gelation, *International Journal*

- of Food Science and Technology. 46 (2011) 1672–167.
- [69] B. Ester, B. Noelia, C.J. Laura, P. Francesca, B. Cristina, L. Rosalba, D.R. Marco, Probiotic Survival And In Vitro Digestion Of *L. Salivarius* Spp. *Salivarius* Encapsulated By High Homogenization Pressures And Incorporated Into A Fruit Matrix, *Lwt.* 111 (2019) 883–888.
- [70] A.M. Hugues-Ayala, J.A. i. Sarabia-Sainz, H. González-Rios, L. Vázquez-Moreno, G. Ramos-Clamont Montfort, Airbrush Encapsulation Of *Lactobacillus Rhamnosus* GG In Dry Microbeads Of Alginate Coated With Regular Buttermilk Proteins, *Lwt.* 117 (2020) 108639.
- [71] Türk Standartları Enstitüsü TSE, TS EN 1132, Meyve Ve Sebze Suları PH Tayini., **1996**.
- [72] Türk Standartları Enstitüsü TSE, TS 1125 ISO 750, Meyve Ve Sebze Ürünleri – Titre Edilebilir Asitlik Tayini, **2002**.
- [73] Türk Standartları Enstitüsü TSE, TS 4890, Meyve Ve Sebze Mamulleri- Çözünür Katı Madde Miktarı Tayini- Refraktometrik Metot, **1986**.
- [74] S.S. Dehkordi, I. Alemzadeh, A.S. Vaziri, A. Vossoughi, Optimization Of Alginate-Whey Protein Isolate Microcapsules For Survivability And Release Behavior Of Probiotic Bacteria, *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 190 (2020) 182–196.
- [75] D.Y. Ying, S. Schwander, R. Weerakkody, L. Sanguansri, C. Gantenbein-Demarchi, M.A. Augustin, Microencapsulated *Lactobacillus Rhamnosus* GG In Whey Protein And Resistant Starch Matrices: Probiotic Survival In Fruit Juice, *Journal of Functional Foods.* 5 (2013) 98–105.
- [76] H. Gandomi, S. Abbaszadeh, A. Misaghi, S. Bokaie, N. Noori, Effect Of Chitosan-Alginate Encapsulation With Inulin On Survival Of *Lactobacillus Rhamnosus* GG During Apple Juice Storage And Under Simulated Gastrointestinal Conditions, *LWT - Food Science and Technology.* 69 (2016) 365–371.
- [77] X. Luo, H. Song, J. Yang, B. Han, Y. Feng, Y. Leng, Z. Chen, Encapsulation Of *Escherichia Coli* Strain Nissle 1917 In A Chitosan—alginate Matrix By Combining Layer-By-Layer Assembly With CaCl_2 Cross-Linking For An Effective Treatment Of Inflammatory Bowel Diseases, *Colloids and Surfaces B:*

- Biointerfaces. 189 (2020) 110818.
- [78] H. Li, V.T. Thuy Ho, M.S. Turner, S. Dhital, Encapsulation Of Lactobacillus Plantarum In Porous Maize Starch, LWT - Food Science and Technology. 74 (2016) 542–549.
- [79] Y. Xing, Q. Xu, Y. Ma, Z. Che, Y. Cai, L. Jiang, Effect Of Porous Starch Concentrations On The Microbiological Characteristics Of Microencapsulated Lactobacillus Acidophilus, Food and Function. (2014) 972–983.
- [80] M.J. Martín, F. Lara-Villoslada, M.A. Ruiz, M.E. Morales, Microencapsulation Of Bacteria: A Review Of Different Technologies And Their Impact On The Probiotic Effects, Innovative Food Science and Emerging Technologies. 27 (2015) 15–25.
- [81] A.V. Rao, N. Shiwnarain, I. Maharaj, Survival Of Microencapsulated Bifidobacterium Pseudolongum In Simulated Gastric And Intestinal Juices, Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. 22 (1989) 345–349.
- [82] T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Beslenme Ve Sağlık Beyanları Yönetmeliği, 2017.
- [83] A. Seifert, Y. Kashi, Y.D. Livney, Delivery To The Gut Microbiota: A Rapidly Proliferating Research Field, Advances in Colloid and Interface Science. 274 (2019) 102038.
- [84] F.B. Haffner, M. Girardon, S. Fontanay, N. Canilho, R.E. Duval, M. Mierzwa, M. Etienne, R. Diab, A. Pasc, Core-Shell Alginate@silica Microparticles Encapsulating Probiotics, Journal of Materials Chemistry B. (2016) 7929–7935.
- [85] A.J. Fabich, S.A. Jones, F.Z. Chowdhury, A. Cernosek, A. Anderson, D. Smalley, J.W. McHargue, G.A. Hightower, J.T. Smith, S.M. Autieri, M.P. Leatham, J.J. Lins, R.L. Allen, D.C. Laux, P.S. Cohen, T. Conway, Comparison Of Carbon Nutrition For Pathogenic And Commensal Escherichia Coli Strains In The Mouse Intestine, Infection and Immunity. 76 (2008) 1143–1152.
- [86] J.K. Kim, E.C. Shin, H.G. Park, Fructooligosaccharides Decreased The Ability Of Probiotic Escherichia Coli Nissle 1917 To Adhere To Co-Cultures Of Human Intestinal Cell Lines, Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 58 (2015) 45–52.
- [87] J.J.J. Van Der Hooft, R.J. Goldstone, S. Harris, K.E.V. Burgess, D.G.E. Smith,

- Substantial Extracellular Metabolic Differences Found Between Phylogenetically Closely Related Probiotic And Pathogenic Strains Of Escherichia Coli, *Frontiers in Microbiology*. 10 (2019) 252.
- [88] T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, **2011**.
- [89] T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Meyve Suyu Ve Benzeri Ürünler Tebliği (Tebliğ No:2014/34), **2014**.
- [90] AIJN Code of Practise Expert Group, Reference Guideline For Apple Juice, **2019**.
- [91] AIJN Code of Practise Expert Group, Reference Guideline For Peach Puree/Juice, **2020**.
- [92] AIJN Code of Practise Expert Group, Reference Guideline For Orange Juice, **2016**.
- [93] C.O. Dias, J. dos Santos Opuski de Almeida, S.S. Pinto, F.C. de Oliveira Santana, S. Verruck, C.M.O. Müller, E.S. Prudêncio, R.D. de Mello Castanho Amboni, Development And Physico-Chemical Characterization Of Microencapsulated Bifidobacteria In Passion Fruit Juice: A Functional Non-Dairy Product For Probiotic Delivery, *Food Bioscience*. 24 (2018) 26–36.
- [94] W. Krasaekoopt, K. Kitsawad, Sensory Characteristics And Consumer Acceptance Of Fruit Juice Containing Probioitcs Beads In Thailand, **2010**.
- [95] T.C. Pimentel, G.S. Madrona, S. Garcia, S.H. Prudencio, Probiotic Viability, Physicochemical Characteristics And Acceptability During Refrigerated Storage Of Clarified Apple Juice Supplemented With Lactobacillus Paracasei Ssp. Paracasei And Oligofructose In Different Package Type, *LWT - Food Science and Technology*. 63 (2015) 415–422.
- [96] W.K. Ding, N.P. Shah, Survival Of Free And Microencapsulated Probiotic Bacteria In Orange And Apple Juices, *International Food Research Journal*. 15 (2008) 219–232.
- [97] A. Sohail, M.S. Turner, E.K. Prabawati, A.G.A. Coombes, B. Bhandari, Evaluation Of Lactobacillus Rhamnosus GG And Lactobacillus Acidophilus NCFM Encapsulated Using A Novel Impinging Aerosol Method In Fruit Food Products, *International Journal of Food Microbiology*. 157 (2012) 162–166.

- [98] M.S. Marcial-Coba, L. Saaby, S. Knøchel, D.S. Nielsen, Dark Chocolate As A Stable Carrier Of Microencapsulated Akkermansia Muciniphila And Lactobacillus Casei, FEMS Microbiology Letters. 366 (2019) fny290.