T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİFT EMÜLSİYON YÜKLÜ HİDROJEL YAPILARDA PROBİYOTİK BAKTERİ ENKAPSÜLASYONU

İlkay YURDAER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Prof. Dr. Ayşe KARADAĞ

Temmuz 2025

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİFT EMÜLSİYON YÜKLÜ HİDROJEL YAPILARDA PROBİYOTİK BAKTERİ ENKAPSÜLASYONU

İlkay YURDAER tarafından hazırlanan tez çalışması 18.07.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayşe KARADAĞ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ayşe KARADAĞ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Canan Yağmur KARAKAŞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Başak Ebru ÖZCAN, Üye
Kırklareli Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Ayşe KARADAĞ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Çift Emülsiyon (W1/O/W2) Yüklü Hidrojel Yapilarda Probiyotik Bakteri Enkapsülasyonu" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

İlkay YURDAER

İmza

Caretta Carettalara…

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve eğitim hayatım boyunca ilminden faydalandığım, birlikte çalışmaktan gurur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü, sabrından ve desteğinden dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşe KARADAĞ'a,

Bilimsel çalışmalarımdaki teşvik ve yönlendirmeleriyle, araştırmamın her aşamasında desteklerinden dolayı değerli Doç. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM'a,

Tez çalışmam süresince, Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nün laboratuvarlarında çalışma imkanı sağlayan bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile asistanlarına ve tez savunmamda yer alan değerli jüri üyesi hocalarıma,

Özellikle çalışmalarım sırasında büyük destek gördüğüm, laboratuvar çalışmalarım ve analizler sırasında yardımlarını esirgemeyen KMB-116'daki canım laboratuvar arkadaşlarıma,

Beni her defasında yüreklendiren, düşmeme izin vermeyen, düştüğümde yeniden ayağa kaldıran ve desteklerini esirgemeyen canım arkadaşlarım Beyza Nur Erayata, İlknur Güzeler, Merve Yenici başta olmak üzere TÜBİTAK'ın bana kattığı Gökçe Gürün, Lisanstan beri desteğini asla esirgemeyen canım arkadaşım Arş. Gör. Nisa Akkuzu'ya ve diğer tüm arkadaş ve dostlarıma,

Beni bugünlere yetiştiren, her zaman bana destekçi, sevgilerini ve maddi, manevi desteklerini asla esirgemeyen, varlıklarıyla beni her şeyin üstesinden geleceğime inandıran Annem, Babam ve Kardeşim'e en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İLKAY YURDAER

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xi
ÖZET xii
ABSTRACT xiv
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özet 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİLER 4
2.1 Probiyotik Bakteriler 4
2.1.1 *Lactobacillus helveticus* 5
2.2 Enkapsülasyon 6
2.2.1 Emülsiyon Sistemleri ve Çift Emülsiyon 9
2.2.2 Atomizer Sistemi 15
2.2.3 Biyoerişebilirlilik 16
3 MATERYAL VE YÖNTEM 19
3.1 Materyal 19
3.2 Probiyotik Bakteri Enkapsülasyonu ve Karakterizasyonu 19
3.2.1 *L. Helveticus* içeren W1/O/W2 Çift Emülsiyon Üretimi 19
3.2.2 Emülsiyon Dolgulu Kapsül Üretimi 21
3.3 Kapsülleme Verimliliği (%EE) ve Canlı Bakterilerin Sayımı 22
3.4 Optik Mikroskop 22
3.5 SEM (Taramalı Electron Mikroskopu) 22
3.6 FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) 22

3.7 DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetri) 23
3.8 Kapsüllerin Jel Mukavemeti 23
3.9 Simüle Edilmiş GI Koşullar Altında Serbest ve Kapsüllenmiş Probiyotik Bakterilerin Canlılığı 23
3.10 Serbest ve Kapsüllenmiş Probiyotik Bakterilerin Isıl İşlem Sonrası Canlılık Oranı 24
3.11 İstatiksel Analizler 24
4 BULGULAR VE TARTIŞMA **25**
4.1 Kapsülleme Verililiği (%EE) ve Canlı Bakteri Sayımı 25
4.2 Kapsüllerin Morfolojik Yapısı 27
4.2.1 Optik Mikroskop 27
4.2.2 SEM 29
4.3 FTIR 29
4.4 DSC 32
4.5 Kapsüllerin Jel Mukavemeti 34
4.6 Simüle Edilmiş GI Koşullar Altında Serbest ve Kapsüllenmiş Probiyotik Bakterilerin Canlılığı 34
4.7 Serbest ve Kapsüllenmiş Probiyotik Bakterilerin Isıl İşlem Sonrası Canlılık Oranı 37
5 SONUÇ **39**
KAYNAKÇA **40**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **46**

SİMGE LİSTESİ

a	Ağırlık
>	Büyüktür
rpm	Dakikada devir sayısı
dak	Dakika
gr	gram
h	Hacim
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Litre
m	Metre
µm	Mikrometre
mA	Miliamper
mg	Miligram
mm	Milimetre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
s	Saat
sn	Saniye
cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
W	Su
O	Yağ
g	Yer çekimi kuvveti
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

CFU	Koloni Oluşturan Birim
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Derneği
FT-IR	Fourier dönüşümü kızılötesi
GI	Gastrointestinal (mide-bağırsak)
GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilen
HLB	hidrofilik-lipofilik denge
PGPR	Poligliserol polirisinoleat
SCFA	Kısa zincirli yağ asitleri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WPI	Whey protein izolat (Peynir altı suyu izolatı)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 *L. helveticus'un* mikroskopik görüntüsü **5**

Şekil 2.2 Çift emülsiyon kapsül görünümü **10**

Şekil 2.3 Çift akışlı Atomizer Sistemi **16**

Şekil 2.4 GI sistemde ve sindirim sistemi koşullarında probiyotik bakterilerin karşılaştığı zorluklar **17**

Şekil 3.1 Birincil emülsiyonun üretim akışı **19**

Şekil 3.2 W2A1 ve W2A2 kapsüllerin ikincil fazının üretim akışı **20**

Şekil 3.3 W2P1 ve W2P2 kapsüllerin ikincil fazının üretim akışı **20**

Şekil 3.4 Çift emülsiyon üretim fotoğrafları **21**

Şekil 3.5 Kapsül üretim fotoğrafları ve a. W2A1 b. W2A2 c. W2P1 d. W2P2 kapsülleri **21**

Şekil 4.1 a1. W2A1 optik mikroskop görüntüsü, b1. W2A2 optik mikroskop görüntüsü, c1. W2P1 optik mikroskop görüntüsü, d1.W2P2 optik mikroskop görüntüsü; a2. W2A1 300x SEM görüntüsü, b2. W2A2 300x SEM görüntüsü, c2. W2P1 300x SEM görüntüsü, d2.W2P1 300x SEM görüntüsü; a3. W2A1 1000x SEM görüntüsü, b3. W2A2 1000x SEM görüntüsü, c3. W2P1 1000x SEM görüntüsü, d3.W2P1 1000x SEM görüntüsü **28**

Şekil 4.2 FTIR spektrumları **31**

Şekil 4.3 Kapsül bileşenlerinin DSC termogramı **33**

Şekil 4.4 Kapsüllerin DSC termogramı **33**

Şekil 4.5 İnvitro canlılık analiz sonuçları **36**

Şekil 4.6 Sıcaklık uygulaması canlılık sonuçları **38**

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Sodium aljinat, WPI ve Pektin kullanımının enkapsülasyon sisteminde kullanımının muhtemel avantajları **7**

Tablo 2.2 Enkapsülasyon yöntemleri, üretim şekli avantajları ve dezavantajları **.. 12**

Tablo2.3W2A1, W2A2, W2P1, W2P1, W2P2 jel dayanımı, boyut ve enkapsülasyon verimlilikleri **26**

ÖZET

ÇİFT EMÜLSİYON YÜKLÜ HİDROJEL YAPILARDA PROBİYOTİK BAKTERİ ENKAPSÜLASYONU

İlkay YURDAER

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ayşe KARADAĞ

Probiyotik bakteriler, fonksiyonel gıda endüstrisinde son yıllarda çokça tercih edilen insan sağlığına faydalı mikroorganizmalardır. Ancak bu mikroorganizmaların, oral yolla alındıklarında, gastrointestinal (GI) sistem içerisindeki fiziksel ve kimyasal faktörlere karşı hassas olmaları canlılıklarını korumalarını güçleştirmektedir. Gıda endüstrisinde uygulanan yüksek sıcaklık, kurutma işlemleri, oksijen varlığı, kesme kuvveti ve basınç gibi çeşitli teknolojik uygulamalar, probiyotik bakterilerin canlılıklarını korumasını güçleştirmektedir. Probiyotik bakterilerin insan sağlığı üzerinde faydalı etkiye sahip olabilmeleri için GI sisteme yaklaşık 10^6 koloni oluşturan birimden (CFU / gr) daha yüksek seviyede canlı olarak ulaşmalıdır. Çalışma kapsamında, probiyotik bakteri stres faktörlerine karşı koruyan ve koloni oluşturarak yararlı metabolitler üretebilecekleri hedef bölge olan kalın bağırsağa kadar canlı ulaşmasını sağlayan kapsüllerin çift emülsiyon (W1/O/W2) ve atomizer tekniği ile üretimi gerçekleştirilmiştir. Kapsüller, karakterize edilmiş olup termal işleme ve simüle edilmiş GI sistem koşullarına

maruz bırakılarak serbest ve kapsüllenmiş hücrelerin canlılığı değerlendirilmiştir. Sindirimin bağırsak aşamasından sonra en yüksek canlılığı aljinat (W2A1, W2A2) ve petkin aljinat (W2P1, W2P2) kaplı kapsüller sağlamış, hayatta kalma oranı sırasıyla %78,17, %80,23, %75,74, %85,10 (5,34 CFU / g, 5,82 CFU / g) olarak elde edilmiş. Pektin içeren kapsüller termal şartlara daha fazla dayanmıştır (5,1 CFU / g, 5,84 CFU / g).

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, enkapsülasyon, çift emülsiyon.

ABSTRACT

PROBIOTIC BACTERIA ENCAPSULATION IN DOUBLE EMULSION LOADED HYDROGEL STRUCTURES

İlkay YURDAER

Department of Food Engineering
Master of Science
Supervisor: Prof. Dr. Ayse KARADAG

Probiotic bacteria are health-promoting microorganisms that have recently been widely utilized in the functional food industry. However, when administered orally, their sensitivity to physical and chemical factors within the gastrointestinal (GI) tract makes it difficult for them to maintain viability. In addition, various technological processes applied in the food industry—such as high temperatures, drying, the presence of oxygen, shear stress, and pressure—further challenge the survival of probiotic bacteria. According to probiotic bacteria must reach the GI tract alive at levels higher than approximately 10^6 colony-forming units per gram (CFU / g) in order to exert beneficial effects on human health.

In this study, capsules were produced using the double emulsion (W1/O/W2) and spray-drying techniques to protect probiotic bacteria against stress factors and to ensure their survival until reaching the colon, the target site where they can colonize and produce beneficial metabolites. The capsules were characterized and subsequently exposed to thermal treatment and simulated GI conditions, after which the viability of free and encapsulated cells was evaluated. Following the intestinal stage of digestion, the highest cell viability was observed in alginate-coated (W2A1, W2A2) and pectin–alginate-coated (W2P1, W2P2) capsules, with survival rates of

78.17%, 80.23%, 75.74%, and 85.10% (5.34 CFU g^{-1}, 5.82 CFU g^{-1}), respectively. Capsules containing pectin demonstrated greater resistance under thermal conditions (5.10 CFU g^{-1}, 5.84 CFU g^{-1}).

Keywords: Probiotic, encapsulation, double emulsion.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özet

Probiyotik bakteriler, fonksiyonel gıda endüstrisinde son yıllarda çokça tercih edilen, yeterli miktarda alındıklarında konakçı canlıya sağlık açısından yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (FAO, 2002). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Saccharomyces* türlerini içeren bu mikroorganizmalar, GI sistemin mikrobiyal dengesini koruyarak bağışıklık sistemini dengede tutmaya fayda sağlar (Sanders, Merenstein, Reid, Gibson, & Rastall, 2019). Probiyotik bakteriler; intestinal epitel dokusuna patojen mikroorganizmaların bağlanmasını engeller ve kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) üretimiyle bağırsak pH'ını düşür ayrıca epitel bariyer bütünlüğünü koruyarak konakçının sağlığını olumlu yönde etkiler (Hill et al., 2014). Bu biyolojik etkileri nedeniyle, probiyotik bakteriler, fonksiyonel gıda formülasyonlarında sıkça kullanılması gıda endüstrisinde artan bir ilgi görmektedir. Ancak bu mikroorganizmalar, sindirim sistemi boyunca çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlere karşı hassas olmaları dolayısıyla ağız alındıklarında, etkinliklerini göstermeleri beklenen hedef bölge kalın bağırsağa kadar canlılıklarını koruyamama riskine sahiptirler (Karakaş, Yildirim, & Karadag, 2023; Yilmaz, Taylan, Karakas, & Dertli, 2020). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Derneği (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, probiyotik bakterilerin insan sağlığı üzerinde faydalı etkiye sahip olabilmeleri için GI sistemde yaklaşık 10^6 koloniden (CFU) daha yüksek seviyede canlı olarak kalabilmeleri gerekmektir (FAO, 2002). Bu faydaları sağlanabilmesi için probiyotiklerin üretim, depolama ve sindirim koşulları boyunca canlılıklarını koruması gerektiğinden ötürü hem stabilitelerinin hem de biyoyararlılığının artırılması yönünde çeşitli enkapsülasyon teknolojileri geliştirilmektedir (Cook, Tzortzis, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2012). Kullanılacak olan enkapsülasyon yöntemlerin seçimi; uygulama alanı, hedeflenen

suş, kullanılan taşıyıcı madde ve beklenen salım profili gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir.

Geleneksel tekniklerden biri olan ekstrüzyon, basit ekipman gereksinimi, düşük maliyet, ölçeklenebilirlik, ve yüksek sıcaklığa ihtiyaç duymama gibi avantajları nedeniyle gıda endüstrisinde sıkça tercih edilmektedir (Koh, Lim, Tan, Kobun, & Rasti, 2022). Ekstrüzyon yönteminde probiyotik bakteriyi içeren polimer çözeltileri (genellikle aljinat bazlı) bir nozul yardımıyla çapraz bağlayıcıyı içeren (genellikle kalsiyum iyonları) çözeltiye belirli hızda damlatılarak jel yapılar oluşturulur (Kailasapathy, 2002). Bu yöntemde canlılık oranları yüksek düzeyde korunabilmesine rağmen, elde edilen kapsüllerin boyutları genellikle nozul ve/veya şırınga iğnesinin boyutuna bağlıdır, ayrıca oluşan kapsüllerin yüzeyleri geniş boşluklara sahip olup geçirgen davranış gösterdiğinden daha sonraki aşamalarda bakterilere beklenen korumayı sağlayamayabilir (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003).

Bu amaçla bakterileri sadece yüzeyinde porlar (boşluklar) olan tekli bir yapı ile korumak yerine, bu kapsüllerin bir başka enkapsülasyon sistemi ile bir arada kullanılması veya farklı polimerlerin bir arada kullanılması bakterilere ilave koruma sağlayabilir. Örneğin aljinat ve kitosanın bir arada kullanıldığı çok katmanlı sistemler, mide asidi gibi zorlu koşullara karşı koruma sağlarken, ince bağırsakta çözünebilir yapılar oluşturarak hedefli taşıma ve salımı mümkün kılmaktadır (Kamalian, Mirhosseini, Mustafa, & Abd Manap, 2014).

Kullanılan tekniklerden bir diğeri ise emülsiyon-temelli enkapsülasyon, özellikle çift emülsiyon (W/O/W) sistemleri üzerinden gerçekleştirilmekte, ilave korumanın yanı sıra kontrollü salım da hedeflenmektedir. Bu yöntem sayesinde probiyotik bakteriler çok katmanlı yapılar içinde daha iyi korunmakta ve sindirim sisteminde hedeflenen bölgeye ulaşma şansı artmaktadır (Z. Zhang et al., 2021). Örneğin emülsiyonun iç su fazına yüklenen bakteriye bu şekilde ilave katman sayesinde koruma sağlanmış olmakta, ayrıca sindirim sırasında bakterinin kapsülün içerisinden su bazlı sindirim sistemine salınmasında polimer yapının bozulmasının yanı sıra yağ sindirimin de gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu sistemde, kapsüllere yüklenecek olan emülsiyonun boyutu ve stabilitesi, yüksek hızlı karıştırıcı gibi cihazlarla optimize edilerek kapsül homojenliği sağlanabilir, ayrıca emülsiyon

içeren polimer çözeltisinin çapraz bağlayıcı banyoya damlatılması sırasında nozul çapı, akış hızı gibi faktörler de optimize edilebilir (Taboada, Zapata, Karbstein, & Gaukel, 2021). Damlatma sırasında ayrıca atomizer, elektrospreyleme gibi teknikler kullanılarak da elde edilecek kapsüllerin boyutları ve homojen boyut dağılımı modifiye edilebilir. Örneğin, çift emülsiyon temelli sistemler, elektro-sprey aracılığı ile çapraz bağlanmış ve stabilitesi yüksek kapsüller elde edilebilmiştir (Karakaş et al., 2023).

1.2 Tezin Amacı

Probiyotik bakteriyi çevresel kaynaklardan gelecek stres faktörlerine (mide pH'ı, safra tuzları, sindirim enzimleri) karşı GI sistemde koruyan ve koloni oluşturarak yararlı metabolitler üretebilecekleri hedef bölge olan kalın bağırsağa kadar canlı ulaşmasını sağlayan çift emülsiyon (W1/O/W2) kapsül yapıların atomizer kullanılarak üretimi amaçlanmıştır

1.3 Hipotez

Laktik asit bakterilerinin (LAB) bir bölümü olan, çeşitli fermente gıdalardan ve nadiren insan gastrointestinal (GI) sistemlerinden izole edilen *Lactobacillus helveticus'*un bağışıklık sisteminin güçlenmesi, bağırsak mikrobiyotasında bulunabilecek patojen bakterileri inhibe etme, bağırsak mikrobiyotasını dengeleme ve biyolojik olarak aktif peptitler üreterek metabolik sağlığı destekleme gibi çok yönlü probiyotik etkileri mevcuttur. Bu çalışmada bu bakteriyi gıda sistemlerine entegre edebilmek, sıcaklık gibi gıda üretim şartlarına dayanması ve GI sistemi şartlarında canlılığını koruyarak yeterli sayıda bakterinin kalın bağırsağa ulaştırılmasını hedefleyen bir hibrit enkapsülasyon sistemi tasarlanması hedeflenmiştir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Probiyotik Bakteriler

Probiyotik bakteriler, fonksiyonel gıda endüstrisinde son yıllarda tercih edilen, yeterli miktarda alındıklarında konakçı canlıya sağlık açısından yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (FAO, 2002). İlk olarak Lilly ve Stillwell 1965 yılında yaptıkları çalışmada bazı protozoa türlerinin, log fazında başka protozoa türlerinin büyümesinin %50'ye kadar arttırdığını gözlemleyerek, bu etkiyi 'probiyotik' olarak adlandırmışlardır (Lilly & Stillwell, 1965).

Probiyotik bakteriler, genellikle sindirim sisteminde denge sağlamak, patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engellemek ve bağışıklık sistemini güçlendirmek gibi çeşitli faydalar sağlamaktadır. Probiyotik bakterilerin başlıca türleri arasında *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Saccharomyces* türleri yer almaktadır (Sanders et al., 2019).

Probiyotik bakteri, mide asidi ve safra tuzlarına karşı dirençli olma, GI sistem boyunca canlılığını sürdürebilme, bağırsak epitel hücrelerine tutunabilme, konakçı ile etkileşim kurarak bağışıklık sistemini uyarabilme ve zararlı mikroorganizmaları baskılayacak antimikrobiyal maddeler üretebilme gibi bazı özelliklere sahip olmalıdır (Ouwehand, Salminen, & Isolauri, 2002).

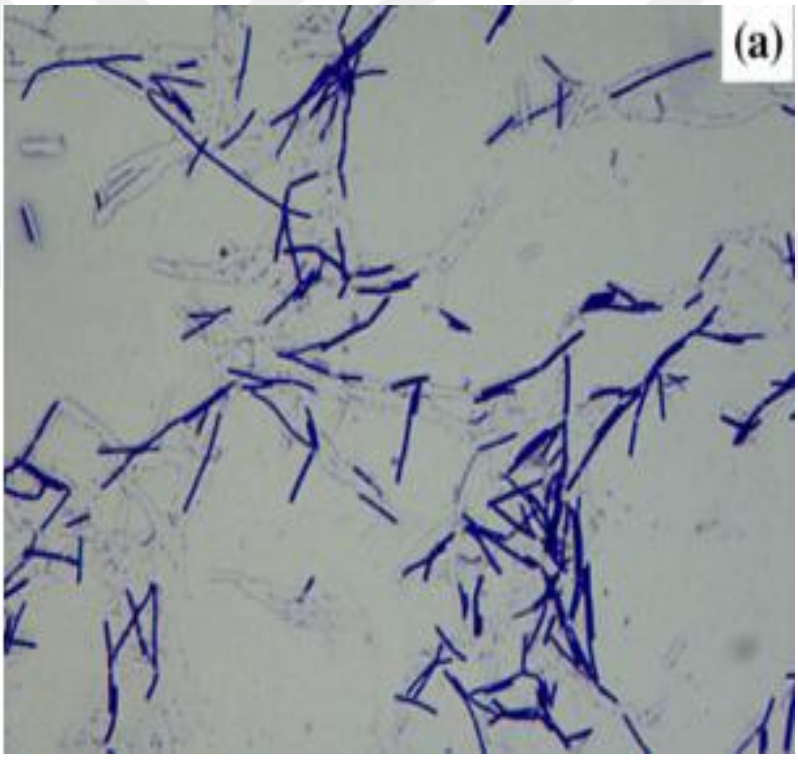
Ayrıca, probiyotiklerin metabolik faaliyetleri sonucu oluşan SCFA'lar kolon sağlığını desteklerken, bazı suşlar da laktoz intoleransı semptomlarını hafifletebilir. Probiyotikler yalnızca GI sağlığını değil, aynı zamanda ağız sağlığı, deri sağlığı ve hatta psikolojik denge üzerinde de olumlu etkiler gösterebilmektedir (Hill et al., 2014).

Tüm bu özellikler, probiyotiklerin fonksiyonel gıdalarda kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Ancak canlı sağlığına yararlı etkilerin sağlayabilmesi için probiyotik

bakterilerin gıda ürünlerinde üretim, depolama ve sindirim sürecinde canlılıklarını korumaları büyük önem taşımaktadır.

2.1.1 *Lactobacillus helveticus*

Lactobacillus helveticus, süt ve süt ürünlerinden izole edilen; homo-fermentatif, gram pozitif, fakültatif anaerob, çubuk şeklinde (Şekil 2.1), katalaz negatif ve spor oluşturmayan anaerobik bakteri olup geleneksel olarak başta peynir olmak üzere fermente süt ürünlerinde başlatıcı kültür olarak kullanılmaktadır (Slattery, O'callaghan, Fitzgerald, Beresford, & Ross, 2010; Taverniti & Guglielmetti, 2012). *L. helveticus*, güçlü bir proteolitik enzime sahip olup, kazein gibi süt proteinlerini küçük peptitlere parçalayarak hem duyusal kaliteyi artırmakta hem de biyoaktif peptitlerin üretimini sağlamaktadır (Griffiths & Tellez, 2013).



Şekil 2.1 *L. helveticus'un* mikroskopik görüntüsü (W. Li, Mutuvulla, Chen, Jiang, & Dong, 2012)

L. helveticus'un bazı suşlarının bağışıklık sistemini destekleyici ve inflamatuar yanıtı düzenleyebildiği bilinmektedir. *L. helveticus*'un bağırsak florasındaki patojen mikroorganizmaların çoğalmasını baskılayarak bağırsak mikrobiyal dengesini koruyarak desteklediğini ortaya koymuştur (Taverniti & Guglielmetti, 2012).

L. helveticus'un GI sistemde canlılıkları sürdürebilmeleri, hedef olan bağırsak epiteline canlı hücre sayısının yüksek miktarlarda ulaşabilmesi için enkapsülasyon teknolojisi ile çevresel stres faktörlerine karşı koruma sağlanabilmektedir (Rosas-Flores, Ramos-Ramírez, & Salazar-Montoya, 2013). *L. helveticus*, yalnızca klasik bir başlatıcı kültür değil, aynı zamanda değerli bir probiyotik bakteri olarak dikkat çekmektedir.

2.2 Enkapsülasyon

Fonksiyonel gıdalarda, nutrasötikler ve biyolojik olarak aktif bileşenlerin kullanımı arttıkça, bu maddelerin çevresel koşullardan korunması ve hedef salımı için enkapsülasyon teknolojileri önemli bir araç haline gelmiştir. Enkapsülasyon, aktif bileşenleri çevresel etkilerden (sıcaklık, ışık, oksijen, pH değişimi vb.) korunmasını sağlamak amacıyla, bu bileşenlerin taşıyıcı bir matriks veya kapsül materyaliyle kaplanması işlemidir.

Enkapsüle edilmiş probiyotik bakteriler, bağırsakta salım sağlayarak, hedef olan bağırsak epiteline yüksek canlılık oranıyla ulaşma ihtimalini artırabilmektedir (Rosas-Flores et al., 2013). Bu teknoloji sayesinde aktif bileşenlerin stabilitesi, biyoyararlanımı ve fonksiyonelliği korunarak ürün raf ömrü uzatılabilir.

Kapsülleme teknolojisinin daha gelişmiş bir formu olan enkapsülasyon; biyoaktif bileşenler, probiyotik bakteriler gibi hassas maddelere, küçük partikül boyutlarında geniş yüzey alanı, hızlı çözünürlük, etkili biyolojik emilim ve hassas salım kontrolü gibi önemli avantajlar sağlayabilir (Chen, Remondetto, & Subirade, 2006).

Ağızdan başlayan sindirim yolculuğunda mide asidi, safra tuzları, sindirim enzimleri gibi GI sistemde karşılaştıkları stres faktörleri nedeniyle canlılıklarını büyük oranda kaybeden probiyotik bakteriler için enkapsülasyon; karşılaşacakları bu tür faktörlere karşı fiziksel bir bariyer görevi görebilir (Cook et al., 2012). Enkapsüle edilmiş probiyotik bakteriler, bağırsakta salım sağlayarak, hedef olan bağırsağa yüksek canlılık oranıyla ulaşma ihtimalini artırabilir.

Tablo 2.1 Sodyum aljinat, WPI ve Pektin kullanımının enkapsülasyon sisteminde kullanımının muhtemel avantajları

	Sodyum Aljinat	WPI	Pektin	Kaynakça
Emülsiyon Stabilitesi	Aljinat, viskoziteyi artırarak faz ayrımını ve damlacık koalesansını engeller.	WPI, yüzey aktif protein olarak damlacıkların arayüzeyine adsorbe olur ve fiziksel stabilite sağlar.	Pektin, özellikle düşük metoksil pektin Ca^{2+} ile emülsiyon viskozitesini artırarak stabilite sağlar.	(Anal & Singh, 2007)
Duvar Yapısı	Aljinat, Ca^{2+} iyonlarıyla jel matrisi oluşturarak üretim sırasında yapısal bütünlük sağlar.	Isıl işlemle denatürasyon sonucu protein ağları oluşturur; kapsül yüzeyinde bariyer etkisi yaratır.	Pektin, jelleşerek yapısal bütünlüğe katkı sağlar.	(Anal & Singh, 2007; Ishwarya S, R, & Nisha, 2022; Krasaekoopt et al., 2003)
Kontrollü Salım ve Sindirim Dayanımı	Mide pH'ında stabil, bağırsak pH'ında şişerek kontrollü salım sağlar.	Mide pH'ında çözünmez; bağırsakta çözünerek içerik salımına katkı sunar.	Pektin, kolon pH'ında parçalanarak hedefli salım sağlar.	(Falsafi et al., 2022; Heidebach, Först, & Kulozik, 2012; Ishwarya S et al., 2022)

(Devam)

Tablo 2.1 Sodyum aljinat, WPI ve Pektin kullanımının enkapsülasyon sisteminde kullanımının muhtemel avantajları

	Sodyum Aljinat	WPI	Pektin	Kaynakça
Besinsel ve Fonksiyonel Katkı	Aljinat, doğal ve GRAS (Genel Olarak Güvenli) statüsünde bir polisakkarittir.	WPI, yüksek kaliteli amino asit profiline sahip fonksiyonel protein kaynağıdır.	Pektin, çözünür diyet lifi olarak prebiyotik etki gösterir ve bağırsak sağlığını destekler.	(Falsafi et al., 2022; Gheorghita Puscaselu, Lobiuc, Dimian, & Covasa, 2020; Said, Olawuyi, & Lee, 2023)
Sürdürülebilirlik ve Temiz Etiket	Yenilenebilir kaynak (deniz yosunu), düşük maliyetli, temiz etiketlidir.	Peynir altı suyunun değerlendirilmesiyle atık azaltımı sağlar.	Bitkisel kaynaklı (narenciye kabuğu, elma posası), temiz etiketli ve sürdürülebilir bir bileşendir.	(Falsafi et al., 2022; Gheorghita Puscaselu et al., 2020; Said et al., 2023)

Enkapsülasyonda kullanılan taşıyıcı sistemleri oluşturan polimerler oldukça çeşitlidir. Bunlar arasında proteinler (whey protein izolatı gibi) ve polisakkaritler (aljinat, pektin, inülin gibi) yer almaktadır. Bunların kullanımının enkapsülasyona sağladığı özellikler Tablo 4.1'de verilmiştir. Bu taşıyıcı maddeler hem probiyotiklerin hedef bölgeye ulaşana kadar süreçte hem de hedef bölgede hayatta kalma oranını artırmakta ayrıca bağırsak epiteline yapışmalarını kolaylaştırarak kolonizasyon kapasitelerini de yükseltmektedir (Atia et al., 2017; Gbassi, Vandamme, Ennahar, & Marchioni, 2009; Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2004; Ozcan, Saroglu, Karakas, & Karadag, 2023).

Enkapsülasyon teknolojisi, probiyotiklerin fonksiyonel gıda ve takviye ürünlerinde kullanımını kolaylaştıran ileri düzey bir taşıyıcı sistemdir. Bu teknoloji hem canlılık oranını artırması hem de biyolojik etkinliği optimize etmesi nedeniyle, gıda endüstrisinde giderek tercih edilen yenilikçi bir yöntem haline gelmiştir.

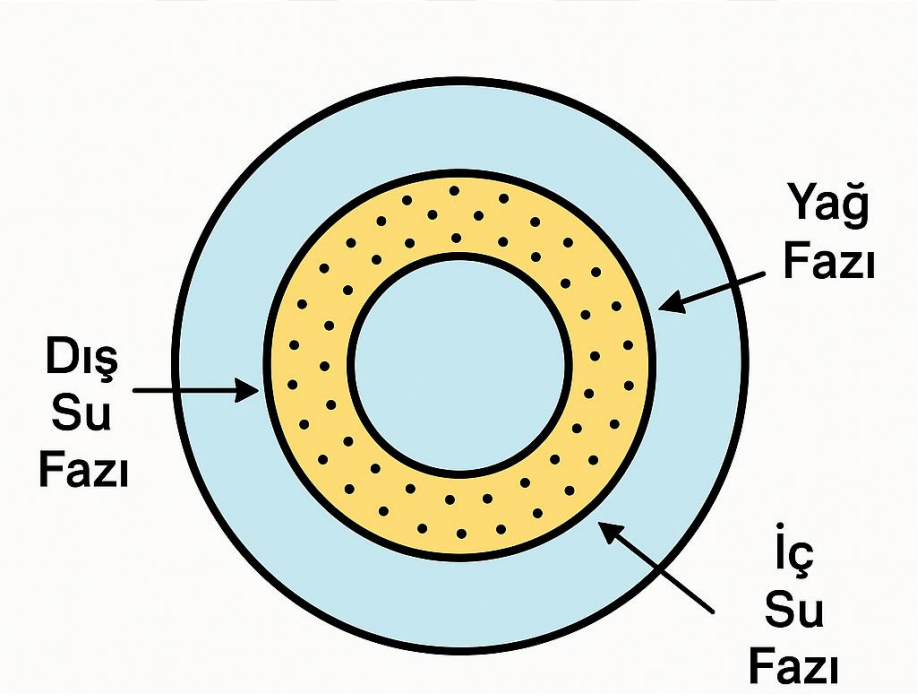
2.2.1 Emülsiyon Sistemleri ve Çift Emülsiyon

Aktif bileşenlerin çevresel koşullarda canlılıklarını koruması ve hedef bölgeye etkili şekilde taşınabilmesi için çeşitli enkapsülasyon teknikleri geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan yöntemler arasında iyonotropik jelasyon, sprey kurutma, dondurarak kurutma, emülsiyon bazlı teknikler ve koaservasyon yer almaktadır (Anal & Singh, 2007). Bu yöntemlerde kullanılan polimerler, üretim şekilleri, avantajları ve dezavantajları Tablo 4.2'te verilmiştir. Bu yöntemler, kullanılan materyal ve işlem koşullarına bağlı olarak kapsül boyutu, stabilite ve salım profili açısından farklılık göstermektedir. Özellikle emülsiyon bazlı enkapsülasyon yöntemleri, hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşenleri taşıyabilme kapasitesi nedeniyle son yıllarda dikkat çekmektedir (Rokka & Rantamäki, 2010). Tekniklerden biri olan çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$) yöntemi, iç su fazına yerleştirilen probiyotiklerin dış ortamdan korunmasını sağlarken, aynı zamanda kontrollü salım için etkili bir taşıyıcı sistem oluşturabilmektedir.

Emülsiyonlar, birbiri içinde çözünmeyen iki fazın, uygun bir yüzey aktif madde (emülgatör) kullanılarak birbiri içinde dağılmasıyla oluşan kolloidal sistemlerdir. En yaygın emülsiyon türleri; su içinde yağ (O/W) ve yağ içinde su (W/O) sistemleridir. O/W emülsiyonlarda yağ damlacıkları sürekli su fazı içinde

dağılmışken; W/O emülsiyonlarda ise su damlacıkları sürekli yağ fazı içinde dağılır (McClements, 2004). Gıda sanayisinde, ilaç taşıyıcı sistemlerinde ve kozmetik ürünlerde sıkça kullanılan bu sistemler, stabilite, çözünürlük ve salım kontrolü sağlamak amacıyla tercih edilmektedir.

Emülsiyon temelli kapsülleme tekniklerinin daha gelişmiş bir formu olan çift emülsiyon (W/O/W) özellikle hidrofilik aktif bileşenlerin (probiyotikler, peptitler, vitaminler) kontrollü salımını sağlamak amacıyla geliştirilmiştir. En yaygın çift emülsiyon W/O/W'dir. Ancak bazı gıda çalışmalarında O/W/O çift emülsiyonları da hazırlanabilir (Benichou, Aserin, & Garti, 2007). Çift emülsiyonlar, şekil 2.2'de gösterildiği gibi; bir su fazının yağ fazı içinde emülsifiye edilmesiyle oluşturulan ilk emülsiyonun (W/O), ikinci bir su fazı ile tekrar emülsifiye edilmesiyle elde edilen sistemlerdir. Oluşturulan bu sistemde, aktif bileşen iç fazdaki su damlacıkları içerisinde hapsedilir ve dış çevreden gelen faktörlere karşı korunmuş olur (Dickinson, 2011).



Şekil 2.2 Çift emülsiyon kapsül görünümü

Oluşturulan çift emülsiyon sistemi probiyotikler açısından, bakterilerin hem mide asidinden hem de safra tuzlarından korunarak bağırsaklarda canlı olarak salınmasını sağlayabilmesidir. Özellikle GI sistemin zorlu koşullarında, çift emülsiyon yapısı fiziksel bir bariyer oluşturarak, probiyotik mikroorganizmaların canlılık oranını

anlamlı düzeyde artırabilir (Shah & Ravula, 2000). Ayrıca çift emülsiyon sayesinde, probiyotiklerin dış ortamla doğrudan teması engellenerek oksijen, sıcaklık ve ışık gibi dış faktörlere karşı da stabilitesi artmış olur.

Çift emülsiyonların üretiminde genellikle düşük hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değerine sahip lipofilik emülgatörler (Span 80) iç W/O emülsiyonunda; yüksek HLB değerine sahip hidrofilik emülgatörler (Tween 80) ise dış su fazı için kullanılır. Kararlı yapıda çift emülsiyon elde etmek için faz oranları, emülsifikasyon süresi, viskozite, sıcaklık ve emülgatör konsantrasyonu dikkatle optimize edilmelidir (Muschiolik & Dickinson, 2017). Aksi halde faz ayrılması, damlacık koalesansı veya aktif bileşenin yapıdan ayrılması gibi istenmeyen sonuçlar meydana gelebilir.

Çift W/O/W emülsiyon sistemleri, probiyotiklerin fonksiyonel gıdalarda kullanımında hem koruma hem kontrollü salım hem de uygulama esnekliği açısından oldukça avantajlı bir taşıyıcı sistemdir. Bu sistemin geliştirilmesi ve stabil hale getirilmesi, probiyotiklerin hedeflenen etkiyi göstermesi açısından önemli bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir.

Tablo 2.2 Enkapsülasyon yöntemleri, üretim şekli avantajları ve dezavantajları

Yöntem	Kullanılan Polimerler / Malzemeler	Üretim Şekli	Avantajlar	Dezavantajlar	Kaynak
Sprey Kurutma	Maltodekstrin, gum arabic, jelatin, aljinat, pektin	Emülsiyon hazırlanır Sıcak hava ile nozulla püskürtülerek kurutulur	- Hızlı ve ölçeklenebilir - Düşük maliyetli - Uygun kapsül boyutu	- Isıya duyarlı bileşenler zarar görebilir - Probiotik canlılık azalabilir	(Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007)
Emülsiyon Temelli Yöntemler (W/O, W/O/W)	Kitosan, pektin, polilaktik asit (PLA), lesitin	Su-yağ fazları oluşturulur homojenizasyon veya ultrasonik işlem uygulanır	- Hidrofobik ve hidrofilik maddeler birlikte kapsüllenebilir - Mikro/nano boyut kontrolü sağlar	- yüzey aktif madde gerekebilir - Stabilite sınırlı olabilir	(Kumar et al., 2022)
İyonotropik Jelasyon	Aljinat, pektin, karragenan	Polimer çözeltisi Ca^{2+} gibi iyon içeren çözeltiye damlatılır Çapraz bağ oluşturarak jel yapı oluşur	- Isısız işlem - Canlı mikroorganizmalar için uygun - Biyouyumlu ve toksik olmayan malzeme kullanımı	- Yüksek aljinat kons. kullanımı bariyer özelleğini arttır, oksijen düfizyonu engellenir - Düşük aljinat kons. kullanımı zamanla kararlılık azalabilir	(Leong et al., 2016)

(Devam)

Tablo 2.2 Enkapsülasyon yöntemleri, üretim şekli avantajları ve dezavantajları

Yöntem	Kullanılan Polimerler / Malzemeler	Üretim Şekli	Avantajlar	Dezavantajlar	Kaynak
Koaservasyon	Jelatin, gum arabic, karagenan	Çift fazlı sistem oluşturulur polimer etkileşimiyle faz ayrımı gerçekleştirilir aktif madde çevresinde çökelme oluşur	- Yüksek kapsülleme verimi - Kontrollü salım özelliği	- Süreç parametrelerine çok duyarlıdır - Endüstriyel uygulama zordur	(Eghbal & Choudhary, 2018)
Lipozomal	Fosfolipidler (örneğin lesitin), kolesterol	İnce film hidrasyonu, ultrasonikasyon gibi yöntemlerle liposom vezikülleri hazırlanır	- Hem suda hem yağda çözünen maddeleri taşıyabilir - Fiziksel-kimyasal bariyer sağlayabilir - Biyouyumlu - Toksik değildir	- Stabilite düşüklüğü	(Bai et al., 2018; Ramadass, Anantharaman, Subramanian, Sivasubramanian, & Madhan, 2015; Shen et al., 2025)
Freeze-Drying (Liyofilizasyon)	Sorbitol, mannitol, trehaloz	Dondurma Vakum altında sublimasyon (kurutma) işlemi	- Uzun raf ömrü sağlar - Kapsül şekli korunabilir	- Uzun sürelidir - Ekipman maliyeti yüksektir	(Muhoza et al., 2023)

(Devam)

Tablo 2.2 Enkapsülasyon yöntemleri, üretim şekli avantajları ve dezavantajları

Yöntem	Kullanılan Polimerler / Malzemeler	Üretim Şekli	Avantajlar	Dezavantajlar	Kaynak
Ekstrüzyon	Aljinat, pektin, kitosan	Polimer çözeltisi aktif madde ile karıştırılır çapraz bağlayıcı çözeltiye damlatılarak jel oluşturulur	- Basit ve ucuz yöntem - Yüksek kapsülleme verimi -Biyopolimerlerle uyumludur	- Kapsül boyutu genellikle büyüktür - Dağılımda homojenlik sınırlı olabilir	(Zuidam & Nedovic, 2010)

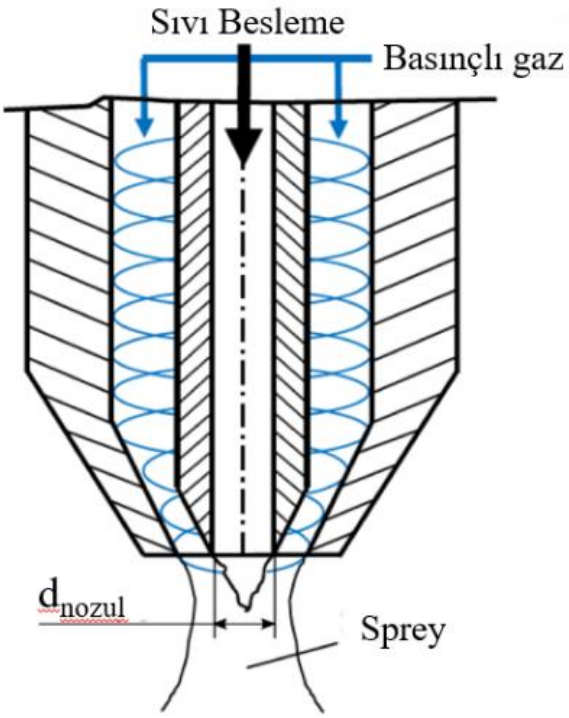
2.2.2 Atomizer Sistemi

Atomizer sistemleri genellikle yüksek basınçlı nozullar ya da dönen diskli sistemler ile çalışır (Taboada et al., 2021). Nozullu atomizerlerde sıvı, yüksek basınç altında nozula iletilerek küçük damlacıklar hâlinde püskürtülür. Bu yöntemle, özellikle 50–200 μm aralığında kontrollü kapsül boyutları elde edilebilmekte ve emülsiyonların viskozitesi, yüzey gerilimi, sıcaklık gibi parametreler sonucunda kapsül özellikleri istenilen şekilde düzenlenebilmektedir (Munoz-Ibanez, Azagoh, Dubey, Dumoulin, & Turchiuli, 2015). Atomizer sistemlerinin avantajı yalnızca damlacık boyutunun kontrolüyle sınırlı kalmaz; aynı zamanda işlem sırasında düşük sıcaklık uygulanması sayesinde, ısıya duyarlı biyolojik bileşenlerin canlılık oranı korunabilir.

Sodyum aljinat, kitosan, pektin ve karegenan gibi doğal biyopolimerler, atomizer sistemlerinde yaygın olarak taşıyıcı madde olarak kullanılır (Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011; Huang et al., 2024). Bu taşıyıcıların seçimi, kapsülün geçirgenliği, mekanik dayanımı ve hedef bölgede çözünme kabiliyeti açısından önemlidir. Örneğin sodyum aljinat, çapraz bağlanabilen yapısı ve düşük viskozitesi ile atomizerle dağıtılmaya son derece uygundur. Atomizer ile oluşturulan kapsüllerin morfolojik özellikleri (yuvarlaklık, yüzey pürüzlülüğü) ve içyapıları (gözeneklilik, yoğunluk) da seçilen polimerin reolojik özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (Permanadewi, Kumoro, Wardhani, & Aryanti, 2022). Ayrıca atomizerle üretilen kapsüller hem gıda hem de ilaç endüstrisinde kontrollü salım, stabilite artışı ve taşıyıcı sistem olarak kullanılmak üzere değerlendirilmekte; bu sayede hedeflenmiş taşıma sistemleri geliştirilmektedir.

Atomizer kullanımı her ne kadar birçok avantaja sahiptir fakat viskozitesi yüksek çözeltilerin atomizer sistemlerinde dağıtılması zorluk yaratabilir (Z. Li et al., 2013). Ayrıca çift emülsiyon sistemlerinde iç fazın dış faza geçişi sırasında probiyotik hücre kayıpları yaşanabileceği için, emülgatör seçimi (örn. Span 80, Tween 80) ve oranları, sistemin kararlılığı açısından kritik önem taşır. Literatürde yapılan çalışmalar, optimize edilmiş parametrelerle çalışan nozullu atomizer sistemlerinin, canlı probiyotiklerin biyoyararlılığını artırma ve GI ortamda hayatta kalmalarını

sağlama açısından oldukça etkili olduğunu göstermektedir (Krasaekoopt et al., 2003).



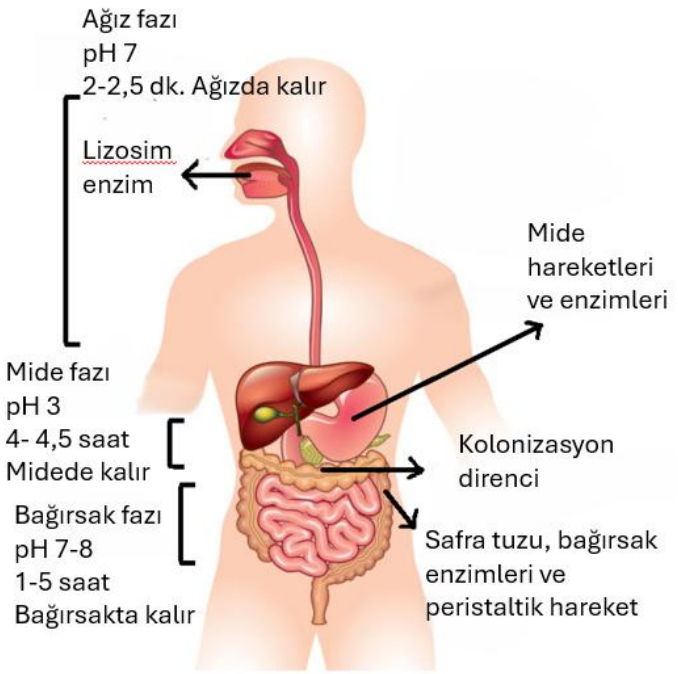
Şekil 2.3 Çift akışlı Atomizer Sistemi (Rudolph, 2012)

2.2.3 Biyoerişebilirlilik

Biyoerişebilirlik, gastrointestinal sistemde sindirimine alınan biyoaktif maddenin ve çözünme süreçlerinden geçerek biyolojik olarak kullanılabilir forma ulaşabilme kapasitesini ifade eder (Palafox-Carlos, Ayala-Zavala, & González-Aguilar, 2011). Probiyotiklerin fonksiyonel etkilerini gösterebilmesi için, tüketildikten sonra canlı halde kalmaları ve kalın bağırsağa ulaşabilmeleri gerekmektedir. Ancak gastrointestinal (GI) sistem, probiyotik canlılar için oldukça zorlu bir ortamdır. Bu nedenle, oral alımdan itibaren karşılaştıkları çevresel faktörler, biyoerişebilirliklerini doğrudan etkilemektedir (Aleman & Yadav, 2023).

Ağız yolu ile alınan probiyotik bakteri, mideye ulaşan probiyotikler, tükürük lizozim enzimi, bakteriyel hücre duvarlarını parçalayarak bazı probiyotikleri daha bu aşamada inaktive edebilmektedir (Aleman & Yadav, 2023; Ragland & Criss, 2017). Ardından mideye ulaşan probiyotikler mide asidi nedeniyle pH 1,5–3,0

aralığında oldukça asidik bir ortamla karşılaşırlar. Bu düşük pH değeri, özellikle asit hassasiyeti yüksek olan türler için ciddi canlılık kayıplarına yol açabilir (Mendonça et al., 2022). Mide asidinin, pankreatik ve safra tuzunun karışmasıyla ince bağırsakta pH değeri genellikle 7,5 ile 8,5 arasında değişkenlik gösterir. Ancak bu alkali pH aralığı, laktik asit bakterileri (LAB) için uygun bir büyüme ortamı sunmaz; hatta bazı suşlar, örneğin probiyotik *Lactobacillus rhamnosus*, bu koşullarda canlılıklarını kaybedebilir (Mendonça et al., 2022).



Şekil 2.4 GI sistemde ve sindirim sistemi koşullarında probiyotik bakterilerin karşılaştığı zorluklar (Aleman & Yadav, 2023)

Tüm bu kimyasal zorluklara ek olarak, GI sistemdeki peristaltik hareketler, yani kasılma-dalga hareketleri de probiyotik bakterinin mukozaya tutunmasını zorlaştırabilir ve kolonizasyon şanslarını azaltabilir (Kong et al., 2020). Bu mekanik stres faktörleri, özellikle kapsülsüz halde bulunan probiyotikler için ciddi canlılık kayıplarına neden olabilmektedir.

Probiyotik bakterilerin hedef bölge olan kolona canlı ulaşabilmesini sağlamak için, özellikle kapsülleme teknolojileri geliştirilmiş ve bu teknolojiler aracılığıyla probiyotik bakterilerim biyoerişebilirliği artırılmaya çalışılmıştır. Uygun taşıyıcı sistemler sayesinde, probiyotikler mide ve bağırsak koşullarına direnç göstererek

daha etkin ve uzun süreli fayda sağlayabilmektedir (Huq, Khan, Khan, Riedl, & Lacroix, 2013).

Biyoerişilebilirlik, ağızdan alınan bir bileşiğin sindirim sırasında salınarak absorpsiyona uygun hale gelme oranını tanımlar. Bu bağlamda, çift emülsiyon yöntemiyle hazırlanmış ve atomizerle stabil hâle getirilmiş kapsüller, probiyotik hücrelerin sindirim sisteminde korunaklı kalmasına yardımcı olur (Vanare, Singh, Chen, & Kong, 2025). Özellikle sodyum aljinat gibi polimerlerle oluşturulan yapılar, düşük pH ortamında (mide) şişerek koruyucu bir bariyer oluştururken, bağırsak pH'ında çözünerek hedefli salımı mümkün kılar (Mandal, Puniya, & Singh, 2006).

3
MATERYAL VE YÖNTEM

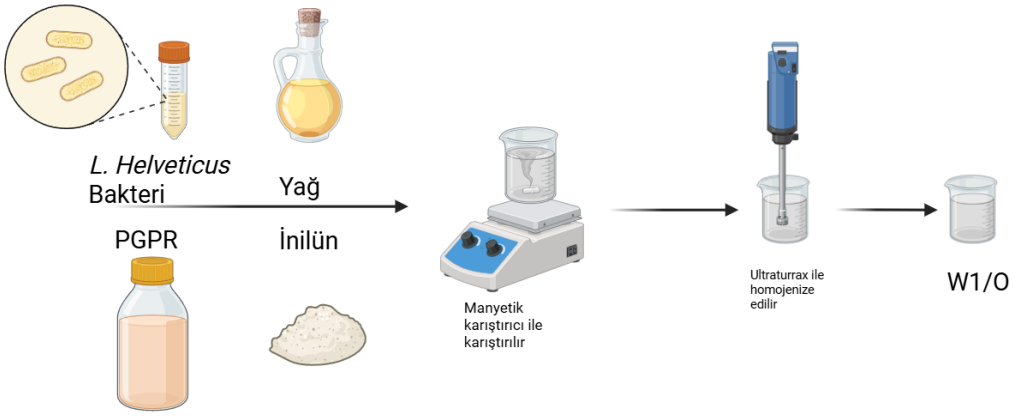
3.1 Materyal

Ayçiçek yağı (YUDUM) yerel bir süpermarketten satın alınmştır. Sodyum aljinat [Algogel 3001, 300–500 kDa, mannuronik-glukuronik (M/G) oranı 0,5–0,7] ve poligliserol polirisinoleat (PGPR) Cargill'den (İstanbul, Türkiye) alınmıştır. Peynir altı suyu proteini izolatı (WPI, saflık>%90) Hardline Hipro'dan (Kavi Gıda, Kocaeli, Türkiye) alınmıştır. İnülin (P95) Orafti, Beneo'dan (Artisan, Türkiye) hediye edilmiştir. Pepsin (P7012), pankreatin (P7545), safra tuzları (P8631), Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyeri ve agarı elde edilmiştir. Trisodyum asetat ve $CaCl_2$ Merck'ten (Darmstadt, Almanya) alınmıştır. Kullanılan diğer tüm reaktifler analitik saflıktadır. Probiyotik bakteri Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden sağlanmıştır.

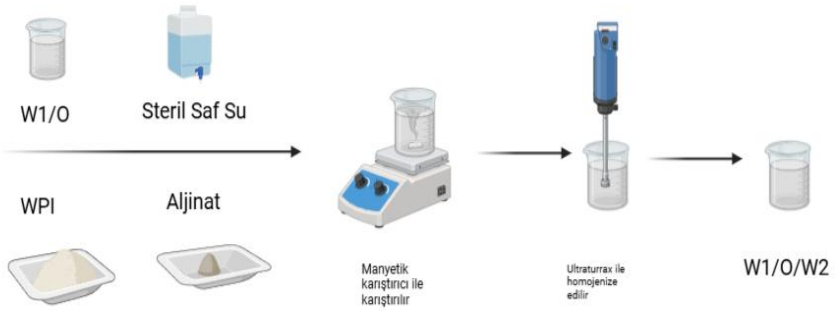
3.2 Probiyotik Bakteri Enkapsülasyonu ve Karakterizasyonu

3.2.1 *L. Helveticus* içeren W1/O/W2 Çift Emülsiyon Üretimi

Probiyotik bakteri içeren iç su fazı W1, Ayçiçek yağı, poligliserol polirisinoleat (PGPR) ve inülin içeren yağ fazı (O) ultraturraks ile 2000 rpm hızda 3 dakika boyunca emülsifiye edilerek birincil emülsiyon (W1/O) hazırlanmıştır (Şekil 3.1).



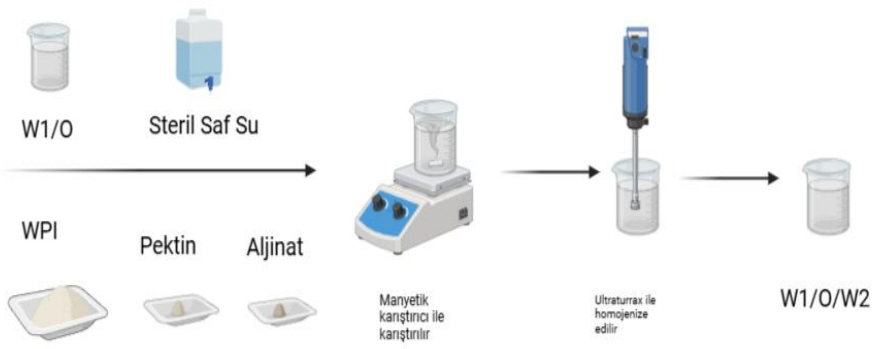
Şekil 3.1 Birincil emülsiyonun (W1/O) üretimi



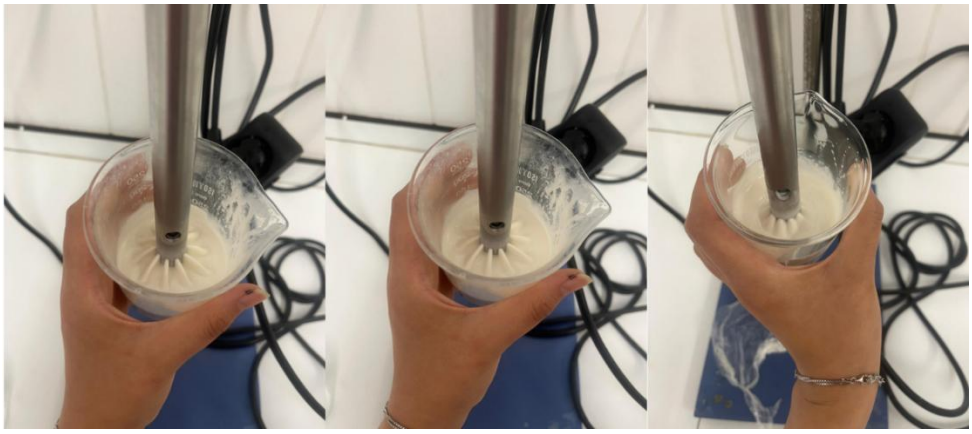
Şekil 3.2 W2A1 ve W2A2 kapsüllerin ikincil fazının üretim akışı

Hazırlanan birincil emülsiyon (W1/O) dış su fazı içinde dağıtılarak ikincil emülsiyon oluşturulur. Burada dış su fazı (W2) içerisinde sodyum aljinat ve WPI çözdürülmüş ve ultraturraks ile 2000 rpm hızda 6 dakika emülsifiye edilerek çift emülsiyon (W2A) üretilmiştir (Şekil 3.2).

Ayrıca dış su fazında pektin çözdürülerek W2P emülsiyonları üretilmiştir (Şekil 3.3).



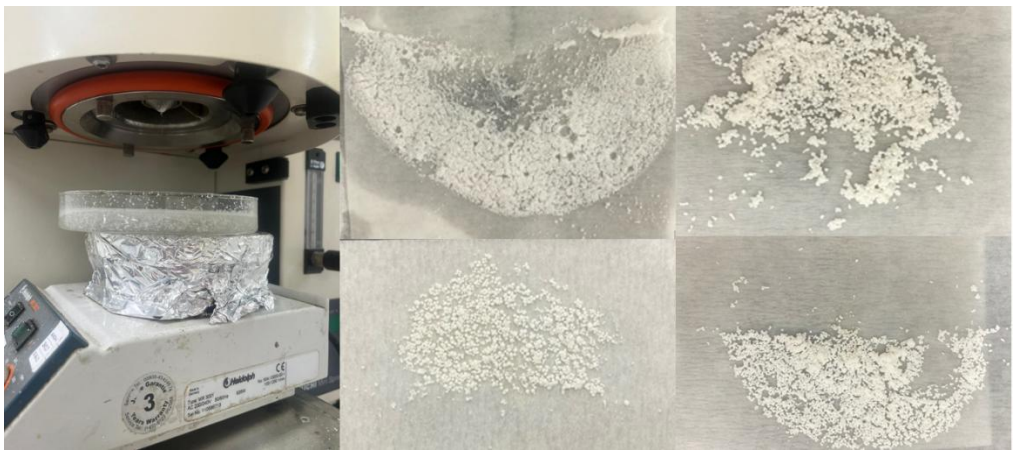
Şekil 3.3 W2P1 ve W2P2 kapsüllerin ikincil fazının üretim akışı



Şekil 3.4 Çift emülsiyon üretim fotoğrafları

3.2.2 Emülsiyon Dolgulu Kapsül Üretimi

Elde edilen iki farklı çift fazlı emülsiyon, atomizer sistemiyle %10 (a/h) kalsiyum klorür ($CaCl_2$) çözeltisi içeren toplama kabına toplanarak çift emülsiyon içeren kapsül şeklinde yapılar elde edilmiştir. Sadece aljinat içeren çift emülsiyon hava akışı 10 m^3/s'de sabit tutularak 5 L/saat (W2A1), 20 L/saat (W2A2) besleme akışıyla farklı boyutlada kapsüller üretilmiştir. Pektin+aljinat içere çift emülsiyon hava akışı 10 m^3/s'de sabit tutularak 10 L/saat (W2P1), 20 L/saat (W2P2) besleme akışıyla farklı boyutlarda kapsüller toplama kabına toplanmış. Bir saat sonra siteril falkonlara alınıp +4 °C buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.5 Kapsül üretim fotoğrafları ve a. W2A1 b. W2A2 c. W2P1 d. W2P2 kapsülleri

3.3 Kapsülleme Verimliliği (%EE) ve Canlı Bakterilerin Sayımı

Canlı hücre sayısı Karakaş vd. (Karakaş et al., 2023)'nin yönteminde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Kapsüller (1 g), 30 mL %0,1 Tween 80 (T80) içeren trisodium sitrat tanponunda (30 g/L, pH 8,9) çözülmüştür. Çözülen kapsüller 120 rpm hızda çalkalayıcıda bir gece boyunca çalkalanmıştır. Serbest kalan hücreler, peptonlu su ile 10 kez seri olarak seyreltilerek MRS agara ekilmiştir. 37 °C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Serbest ve kapsüllenmiş suşların koloni oluşturan birimlerinin sayısı (log CFU/g) belirlenmiş ve %EE (3.1) şu şekilde hesaplanmıştır:

$$\%EE=(\log C/\log T)\times 100 \quad (3.1)$$

C, kapsüllerden salınan canlı hücrelerin hesaplanan sayısı;

T, yüklenen probiyotik hücrelerin sayısına dayalı teorik hücre sayısı.

3.4 Optik Mikroskop

Kapsül yapılar optik mikroskop altında incelenmiştir (CKX41; Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) ve boncukların ortalama boyutu (en az 50 örnek) ImageJ programı (National Institutes of Health, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak optik mikroskopi görüntülerinden hesaplanmıştır.

3.5 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)

Kurutulan kapsüllerin yüzey morfolojisi, bir taramalı elektron mikroskobu (SEM, Quanta 450 FEG; FEI, Graz, Avusturya) ile gözlemlenmiştir. Kapsül numuneleri, 40 mA akım yoğunluğu kullanılarak vakum altında ince bir altın-platin tabakasıyla (Agar Manual Sputter Coater B7340; Agar Scientific, Stansted, UK) kaplanmıştır. Kapsüllerin morfolojisi, 300x ila 1000x arasında değişen büyütmelerde düşük vakum altında, 10 kV hızlanma voltajında analiz edilmiştir.

3.6 FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)

Kurutulan kapsüller ve kapsül bileşenleri Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları, bir FTIR spektrofotometresi (ATR-FT-IR; Bruker Tensor 27, Karlsruhe, Almanya)

kullanılarak elde edilmiştir. Tüm spektrumlar 4000-600 cm^{-1} dalga boyu aralığında 2 cm^{-1} çözünürlükte absorpsiyon modunda kaydedilerek alınmıştır.

3.7 DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetri)

Kapsüllerin termal özellikleri, nitrojen gazı akışı altında DSC (SDT Q600, TA Instruments, New Castle, DE) kullanılarak elde edilmiştir. Kurutulmuş kapsüller ve kapsül bileşenleri (6-8 mg) alüminyum kaplara tartılmış ve hava geçirmez şekilde kapatılmıştır. Kapatılan alüminyum kaplar, 30 mL/dk nitrojen akışı altında 10 °C/dk sıcaklık artışı ile 10- 300 °C arasında ısıtılarak analiz gerçekleştirilmiştir.

3.8 Kapsüllerin Jel Mukavemeti

Tek eksenli sıkıştırma testleri, TA-XT Plus tekstür analiz cihazı (Stable Micro Systems, Godalming, UK) ile 2 mm silindirik prob ve 5 kg'lık bir yük bloğu yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Kapsüller, 100 µL hacme (çap, 10 mm; yükseklik, 3 mm) karşılık gelecek şekilde 2 mL' lik bir cam şişeye (çap, 10 mm; yükseklik, 30 mm) yerleştirilmiş ve kapsüller 1 mm/s hızla başlangıç yüksekliğinin %70' ine ulaşana kadar sıkıştırılmıştır (Karakaş et al., 2023). Sonuçlar, numunelerin sertliğini ve sıkıştırma için gereken maksimum kuvvete karşı mukavemeti temsil eden kuvvet (*g*) cinsinden verilmiştir.

3.9 Simüle Edilmiş GI Koşullar Altında Serbest ve Kapsüllenmiş Probiyotik Bakterilerin Canlılığı

Simüle edilmiş ağız sıvısı (SSF), mide sıvısı (SGF) ve bağırsak sıvısı (SIF), hazırlanmış ve tüm sindirim sıvıları, sterilizasyon için 0,22 µm' lik bir filtreden geçirilmiştir (Minekus et al., 2014). Bakteri içeren kapsül (1g) ve serbest *L. Helveticus* (1 mL) farklı iki steril test tüpüne tartılmıştır ve 0,7 mL SSF ile karıştırılmıştır, α-amilaz (75 U / mL) ve $CaCl_2$ (0,75 mM) ilavesi sonrasında karışım 37 °C' de (pH 7) çalkalama banyosunda 2 dk bekletilmiştir. Ağız karışımı, 1,5 mL SGF, $CaCl_2$ (0,075 mM) ve pepsin (2000 U / mL) ilave edilerek karıştırılmış ve 37 °C'de (pH 3,0) 2 sa 100 rpm hızdaki çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Mide karışımı, pH 7'de 2,2 mL SIF, $CaCl_2$ (0,3 mM), pankreatin (100 U / mL) ve taze safra (10 mM) eklenerek çalkalamalı su banyosunda 37 °C' de 3 sa sürecek şekilde inkübe edilmiştir. Kapsüllerin sodyum sitrat çözeltisi (%3 a/h) ile

parçalanmasıyla kapsül içerisindeki bakteriler açığa çıkarılmış ve her sindirim aşamasından sonra (ağız, mide ve bağırsak) serbest ve enkapsüle sistemden geri kazanılan bakteriler MRS agara ekim yapılarak sayılmış ve hayatta kalma oranı (%) hesaplanmıştır. Bu hesaplama, sindirim sonrası canlı bakterilerin sayısının sindirim öncesi başlangıçtaki canlı bakteri sayısına oranlanması ile yapılmıştır.

3.10 Serbest ve Kapsüllenmiş Probiyotik Bakterilerin Isıl İşlem Sonrası Canlılık Oranı

Peptonlu su içinde süspanse edilen (30 ml) serbest bakteriler (1 ml) ve kapsüller (1 g), pastörizasyon koşullarını karşılayacak şekilde 65 °C' de 30 dak, 72 °C'de 3 dak ve 72 °C'de 30 s sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Test tüplerindeki sıcaklık, termal bir ölçer kullanılarak doğrulanmış olup ısıl işlem görmüş tüplerin, oda sıcaklığına ulaştırmak için, tüpler bir buzlu su banyosuna daldırılmış, kapsüller parçalanmış ve canlı hücreler MRS agara ekim yapılarak 3.3'teki yönteme göre sayılmıştır.

3.11 İstatiksel Analizler

Tüm uygulamalar ve analizler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, SPSS (IBM, versiyon 20, Armonk, NY) yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) biçiminde sunulmuş; gruplar arası anlamlı farklar ($p \leq 0,05$) Tukey'nin post hoc testi ve bağımsız örneklem t-testi ile belirlenmiştir. Grafikler ise Origin 9.0 (OriginLab Co., ABD) programı kullanılarak hazırlanmıştır.

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Kapsülleme Verililiği (%EE) ve Canlı Bakteri Sayımı

Kapsül boyutu kapsülasyon sisteminin verimini etkileyen faktörlerdendir. Kapsül boyutu, kapsüllenen maddenin korunmasını ve salım davranışını doğrudan etkilemektedir (Pupa et al., 2021). Yapılan çalışmada incelenen dört farklı formülasyona ait ortalama kapsül boyutları ve enkapsülasyon verimlilikleri Tablo 4.1'te sunulmuştur. Kapsülleme verimliliği açısından örnekler arasında anlamlı fark bulunmuştur.

Tablo 2.3 W2A1, W2A2, W2P1, W2P1, W2P2 jel dayanımı, boyut ve enkapsülasyon verimlilikleri

Örnek	Jel Dayanımı (güç, g)	Boyut (µm)	Enkapsülasyon Verimi (%)
W2A1	$38,89 \pm 2,86^{a}$	$387,78 \pm 96,55^{b}$	$78,17 \pm 2,12^{bc}$
W2A2	$36,25 \pm 3,69^{a}$	$1075,86 \pm 137,98^{a}$	$80,23 \pm 0,05^{b}$
W2P1	$33,12 \pm 2,77^{ab}$	$414,02 \pm 161,68^{b}$	$75,74 \pm 1,64^{c}$
W2P2	$25,63 \pm 0,65^{b}$	$1169,71 \pm 157,18^{a}$	$85,10 \pm 1,92^{a}$

4.2 Kapsüllerin Morfolojik Yapısı

Kapsüllerin morfolojik özellikleri, ürünün işlevselliği, salım profili ve fiziksel stabilitesi üzerinde doğrudan etkilidir. Geliştirilen W2A1, W2A2, W2P1 ve W2P2 kapsüllerin optik mikroskop ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.1).

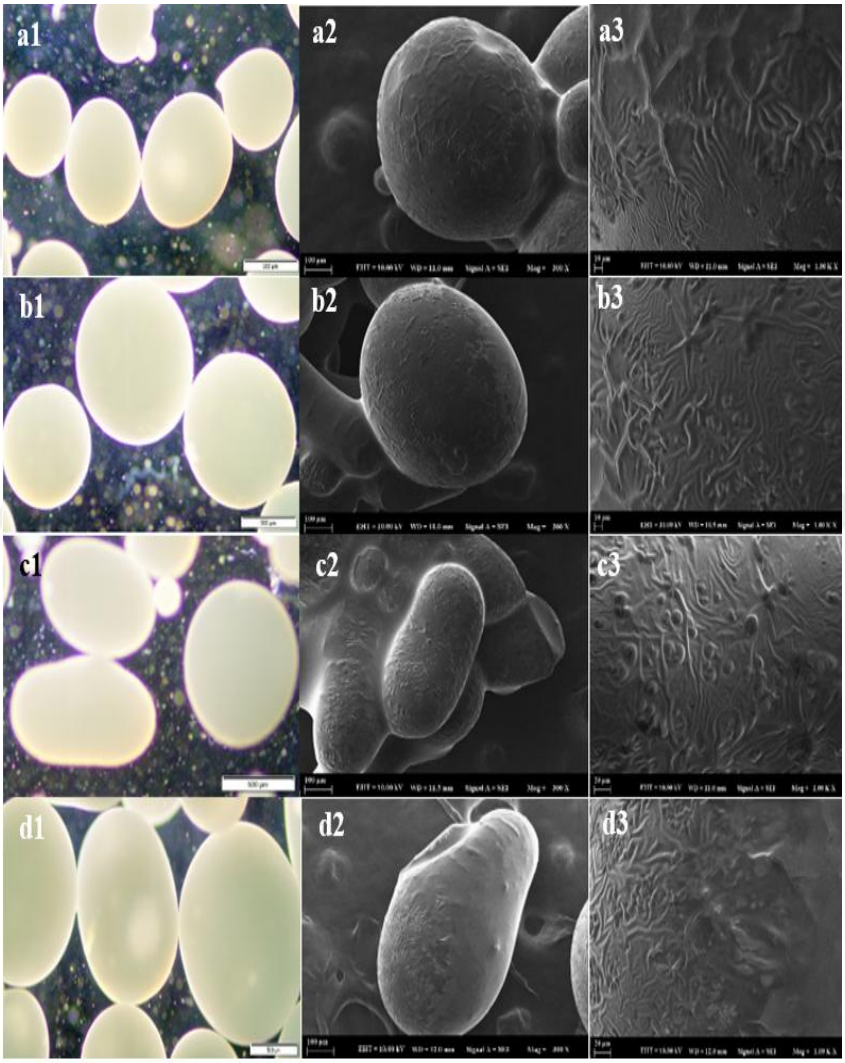
4.2.1 Optik Mikroskop

Optik mikroskopta alınan görüntüler, kapsüllerin genel şekil bütünlüğünü ve boyut farklılıklarını ortaya koymaktadır. Görüntülerde tüm formülasyonların kapsül formu oluşturduğu görülmekle birlikte, kullanılan polimerlerin kapsül yapısına etki ettiği görünmektedir. Üretim sırasında değiştirilen parametrenin kapsül boyutu ve morfolojisini önemli ölçüde etkilediği görülmektedir.

Tablo 2.3'te boyutları verilen W2A1 387,78 ± 96,55 µm, W2A2 1075,86 ± 137,98 µm 'dir. İki ürün arasında manipüle edilen besleme akışının farklılığından dolayı boyut farkı ortaya çıktığı gözlenmiştir. Üretim sırasında hava akışının sabit tutularak besleme akışının arttırılması boyuttaki bu farklılığa neden olmuştur. Nozula ulaşan besleme çözeltisinin miktarı arttıkça, nozulda çözelti miktarı artmış olup püskürtme sırasında daha fazla çözelti olduğu için kapsül boyutları büyümüştür (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007). W2A1 formülasyonu, küçük çaplı, küresel ve yüzey olarak düzgün kapsüller içermektedir. Aljinat içeren kapsülasyon sistemlerinde kalsiyum iyonları ile çapraz bağlanma oldukça hızlı ve zayıf kontrollü gerçekleştiğinden, homojen yapılar elde edilmektedir (Lee & Mooney, 2012). W2A2 formülasyonu, W2A1 ile aynı formülasyona sahip olmasına karşı atomizerın besleme akışının arttırılarak kapsül boyutunun arttırmayı hedeflendiği için daha büyük çaplı kapsüllerden oluşmaktadır. Büyük boyutlu kapsüller iç su fazını daha fazla koruma potansiyeline sahiptir (Rajaonarivony, Vauthier, Couarraze, Puisieux, & Couvreur, 1993; Rokka & Rantamäki, 2010).

Tablo 2.3'te boyutları verilen W2P1 414,02 ± 161,68 µm, W2P2 1169,71 ± 157,18 µm 'dir. Boyut farklılığı üretim sırasında besleme akışının arttırılmasıyla boyutu artmıştır. W2P1 formülasyonu, pektin ve aljinatın birlikte kullanıldığı formülasyon

olup W2A1'den büyük boyuta sahip kapsüller içermektedir. Mikroskop altında incelenen kapsüllerin oval ve kısmen düzensiz şekillerde olduğu görülmüştür. Pektin ve aljinat jel oluştururken rekabet ederek Ca^{2+} iyonları ile bağlanması, bağlanma bölgelerinde düzensizlik oluşturmakta ve kapsüllerin küresel değil, daha oval şekillere neden olmaktadır (Karakas, Ordu, Bozkurt, & Karadag, 2022). W2P2 formülasyonundan elde edilen kapsüller daha büyük ve belirgin şekilde düzensiz yapıdadır. Ayrıca pektin varlığı, aljinatın oluşturduğu kompakt ağ yapısını zayıflatabilmektedir (Hu et al., 2021). (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 a1. W2A1 optik mikroskop görüntüsü, b1. W2A2 optik mikroskop görüntüsü, c1. W2P1 optik mikroskop görüntüsü, d1.W2P2 optik mikroskop görüntüsü; a2. W2A1 300x SEM görüntüsü, b2. W2A2 300x SEM görüntüsü, c2. W2P1 300x SEM görüntüsü, d2.W2P1 300x SEM görüntüsü; a3. W2A1 1000x SEM görüntüsü, b3. W2A2 1000x SEM görüntüsü, c3. W2P1 1000x SEM görüntüsü, d3.W2P1 1000x SEM görüntüsü

4.2.2 SEM

SEM görüntüleri, kapsüllerin yüzey pürüzlülüğü, porozite düzeyi ve morfolojik bütünlüğü hakkında yorum yapmamızı sağlamaktadır. Şekil 4.1'deki görüntülerde kapsül yüzeyinde çatlaklar, çıkıntılar ve deformasyonları gözlememizi sağlayarak formülasyonların morfolojisini göstermektedir.

W2A1 örneğinde yüzey, hafif pürüzlü ancak genel olarak düzgün ve çatlak içermeyen bir yapı görünmektedir. Aljinatın kalsiyumla oluşturduğu "yumurta kutusu" yapısı, kapsül yüzeyinin düz ve sağlam olmasına katkı sağladığı, bu yapı hem kontrollü salım hem de sindirim koşullarına dayanıklılık açısından avantaj sağladığı söylenebilir (Grant, Morris, Rees, Smith, & Thom, 1973).

W2A2 formülasyonunda yüzeyde belirgin bir deformasyon gözlenmemekle birlikte, boyut büyüklüğüne bağlı olarak yüzey kıvrımları ve daha belirgin porlar oluşmuştur. Daha büyük kapsüllerde, jel matrisi içinde iyonik difüzyonun eşit olmaması yüzey bozulmalarına neden olabilir (Chan et al., 2011).

W2P1 örneği, mikroskobik düzeyde kabarcıklı yapı ve yüzey çatlakları sergilemiştir. Bu durum, pektin ve aljinatın heterojen dağılımı ve çapraz bağlanma dengesizliğinin sonucudur.

W2P2 formülasyonu, yapısal olarak en zayıf morfolojiyi sergilemiştir. SEM görüntülerinde buruşmuş ve kırılmış yapılar görülmektedir. Kapsül çapının büyüklüğü, kalsiyum iyonlarının jel ağı içinde eşit dağılmasını engellemiş olabilir. Bu da kapsülün mekanik stabilitesini olumsuz etkilemiştir (Karakas et al., 2022)

Yüzey bütünlüğü bakımından en başarılı formülasyon W2A1 olurken, en zayıf yapı W2P2'de gözlenmiştir. SEM verileri, optik mikroskop bulgularını destekler nitelikte olup, sadece aljinat içeren jel kapsüller (W2A1 ve W2A2) daha düzgün ve kompakt yapı oluşturduğu, pektin ilavesinin yapıda küresellikten uzaklaşıp ovalleşmesine ve yüzeyinde pürüzlülük oluşturmuştur.

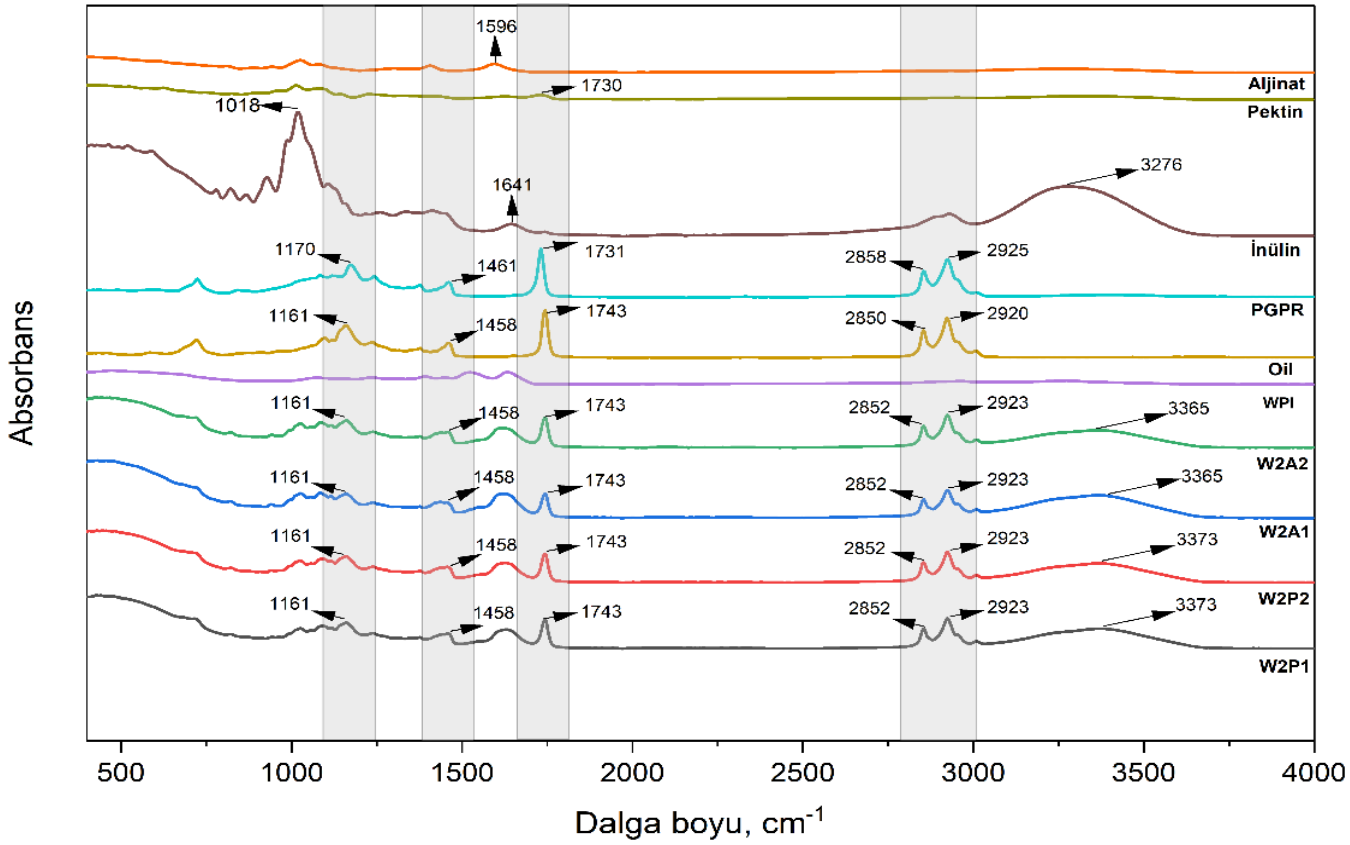
4.3 FTIR

Kapsül üretiminde kullanılan bileşenlerin (aljinat, pektin, inülin, PGPR, yağ, whey protein izolat) ve geliştirilen formülasyonların (W2A1, W2A2, W2P1, W2P2) yapısal karakterizasyonu FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi)

yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen FTIR spektrumları Şekil 4.2'te sunulmuştur.

Aljinat spektrumunda 1596 cm^{-1}'de gözlenen pik, karboksilat gruplarına (COO^-) ait asimetrik gerilme titreşimini, 1410–1450 cm^{-1} bandı ise simetrik gerilme titreşimlerini göstermektedir. Pektin örneğinde 1730 cm^{-1}'de gözlenen belirgin bant esterleşmiş karboksil gruplarına ait karbonil (C=O) gerilmesini temsil etmektedir. Ayrıca 1018 cm^{-1}'deki sinyal, pektinin C–O–C gerilmelerine işaret etmektedir(Muliawati, Siswanta, & Aprilita, 2021). İnülin spektrumunda 1170 cm^{-1}'de ve daha düşük dalga boylarında görülen bantlar C–O gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 3276 cm^{-1}'deki geniş bant O–H gerilmesini göstermekte olup, inülinin hidrofilik karakterini desteklemektedir. 1641 cm^{-1} ve 1461 cm^{-1} bantları sırasıyla H–O–H bükülmesi ve CH_2 bükülme modlarını temsil etmektedir. PGPR örneğinde 1741 cm^{-1} civarındaki pik alifatik C–H gerilme titreşimlerine işaret etmektedir. 2858 cm^{-1} ve 2925 cm^{-1} bantları ise ester karbonil (C=O) gruplarının varlığını göstermektedir. Yağ örneğinde de benzer şekilde 1741–1743 cm^{-1} aralığında ester karbonil pikleri ve 2850–2920 cm^{-1} aralığında C–H gerilmeleri belirgin şekilde gözlemlenmiştir (Nosal et al., 2021). Whey protein izolat (WPI) spektrumunda 1458 cm^{-1}'de CH_2 bükülme titreşimleri, 3365 cm^{-1}'de ise protein yapısına ait N–H ve O–H gerilmeleri izlenmiştir (Popescu et al., 2021).

Formülasyonlara ait spektrumlarda (W2A1, W2A2, W2P1, W2P2) hem çekirdek bileşenler hem de kapsül matrisleri ile ilgili karakteristik pikler tespit edilmiştir. Bu örneklerde 1161 cm^{-1}'de C–O–C gerilmeleri, 1452–1458 cm^{-1}'de CH_2 bükülmeleri, 1743 cm^{-1}'de ester karbonil grupları ve 2852–2925 cm^{-1} aralığında C–H gerilme titreşimleri gözlenmiştir. 3365–3373 cm^{-1} arasında yer alan geniş bantlar, özellikle hidrojen bağları ve protein-polimer etkileşimlerine işaret etmektedir.



Şekil 4.2 FTIR septrumları

4.4 DSC

DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetri) analizi, formülasyonda kullanılan hammadde ve örneklerin termal özelliklerini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu analiz ile bileşenlerin cam geçiş sıcaklığı (Tg), erime noktaları ve olası bozunma sıcaklıkları belirlenerek, ısıya karşı dayanıklılıkları değerlendirilmiştir.

Hammaddelere ait DSC termogramları Şekil 4.3'te verilmiştir. Yağ ve PGPR örneklerinde 10 - 300 °C sıcaklık aralığında belirgin bir endotermik ya da ekzotermik geçiş gözlemlenmemiştir.

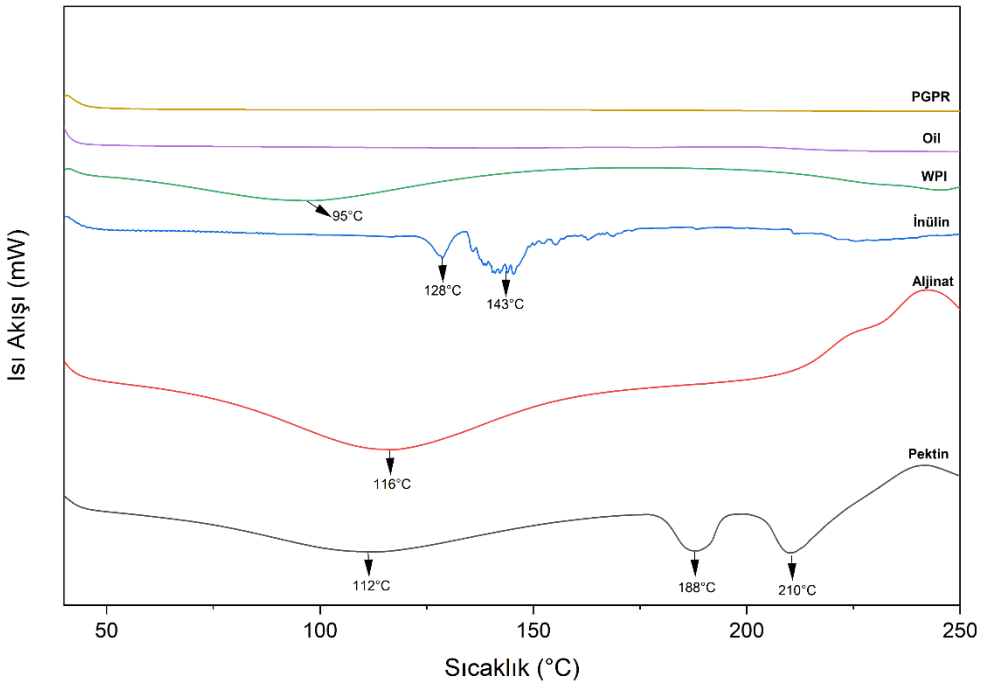
İnülin örneği 128 °C ve 143 °C'de iki farklı endotermik geçiş göstermiştir. Bu geçişlerin, inülinin kristal yapısındaki erime ve olası parçalanma olaylarına karşılık geldiği düşünülmektedir. İnülinin erime sıcaklığı 110–150 °C arasında bildirilmektedir (Ronkart et al., 2007).

Aljinat örneğinde yaklaşık 116 °C'de gözlemlenen endotermik geçiş, polimerik yapıdaki suyun uzaklaştırılması veya ağ yapısının yeniden düzenlenmesi ile ilişkilendirilmektedir. Aljinatın termal geçişlerinin 100–130 °C arasında değiştiğini belirtmiştir.

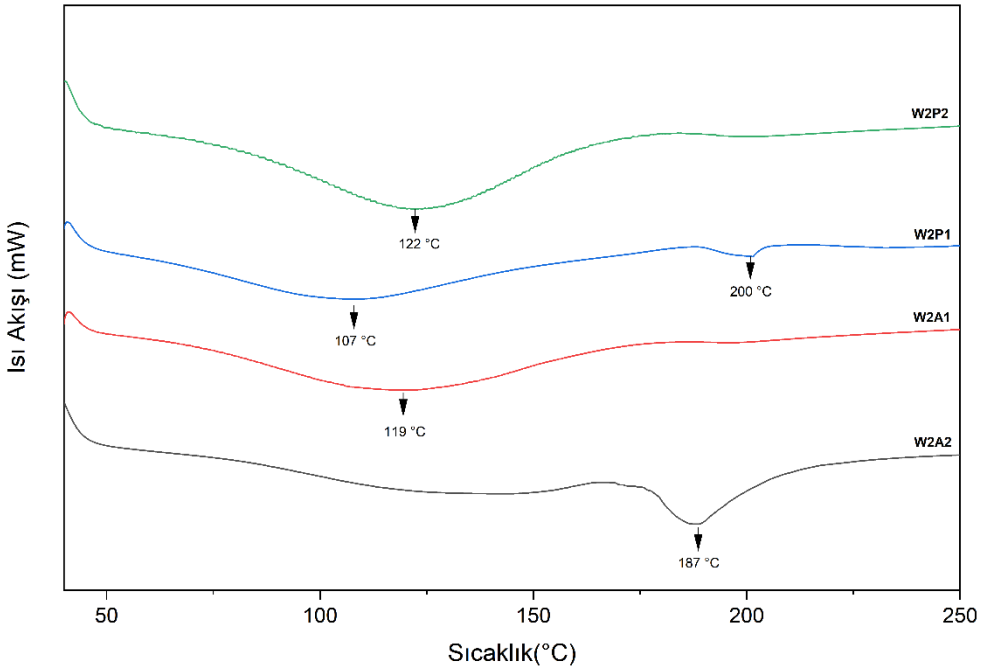
Pektin örneği ise 112 °C, 188 °C ve 210 °C'de üç farklı endotermik pik göstermiştir. İlk geçiş, yapıdaki nemden kaynaklı bir erime piki olabilirken, daha yüksek sıcaklıklardaki pikler pektinin kısmi bozunma ile ilişkilendirilebilir. Pektinin çok aşamalı termal geçişler gösterebileceğini ve bunun yapısal çeşitliliğinden kaynaklandığını belirtmiştir.

Geliştirilen formülasyonlara ait DSC termogramları Şekil 4.4'te gösterilmiştir. W2A2 formülasyonunda yaklaşık 187 °C'de bir endotermik geçiş gözlemlenmiştir. Yüksek sıcaklıkta gerçekleşen bu pik, kararlı bir yapı oluştuğunu düşündürmektedir. W2A1 formülasyonunda 119 °C civarında gözlemlenen endotermik geçiş, polimer-protein etkileşimlerinden kaynaklı erime sıcaklığı olabilir. Bu etkileşim, yapının ısıya karşı duyarlılığını etkileyebilmektedir. W2P1 formülasyonu 107 °C ve 200 °C'de iki ayrı geçiş göstermektedir. W2P2 formülasyonu ise 122 °C'de bir erime piki göstermektedir. Bu sıcaklık inülinin

karakteristik erime sıcaklığı aralığına denk gelmekte olup (Ronkart et al., 2007), bileşenler arası sinerjik etkileşimle oluşmuş bir yapı olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4.3 Kullanılan malzemelerin DSC termogramı



Şekil 4.4 Kapsüllerin DSC termogramı

4.5 Kapsüllerin Jel Mukavemeti

Geliştirilen formülasyonların jel dayanımı değerleri Tablo 4.1'te verilmiştir. Jel dayanımı açısından örnekler arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur ($p < 0.05$). En yüksek jel dayanımı 38,89 ± 2,86 g ile W2A1 formülasyonunda ölçülmüş, bunu W2A2 (36,25 ± 3,69 g) ve W2P1 (33,12 ± 2,77 g) izlemiştir. En düşük dayanım ise 25,63 ± 0,65 g ile W2P2 örneğinde kaydedilmiştir.

W2P1 ve W2P2 formülasyonları hem aljinat hem de pektin içermeleri bakımından diğer örneklerden ayrışmaktadır. Pektin ilavesi ile aljinat ve pektin Ca^{2+} iyonuyla bağlanabilmek için rekabete girmiş olup bağlanmada homojenliği bozmuş olabilir. Jel yapısındaki çapraz bağları bu nedenle daha gevşek ve daha açık gözenekli hâle gelmektedir. Oluşan yapı, uygulanan yüke karşı daha az dirençli olur ve bu nedenle jel mukavemeti düştüğünü gösterebilmektedir (Karakas et al., 2022).

W2P1 formülasyonunda jel dayanımı 33,12 ± 2,77 g olarak belirlenmiş ve W2P2'den anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak W2P2 formülasyonunda jel dayanımı belirgin şekilde düşmüş ve 25,63 ± 0,65 g olarak ölçülmüştür. Aynı formülasyona sahip iki jel kapsülün farklı boyutlarda olması (W2P1, 414,02 ± 161,68 µm; W2P2, 1169,71 ± 157,18 µm), jel mukavemetinde de farklılık yaratmaktadır. Kapsül boyutu, jel ağındaki iyonik çapraz bağların oluşması üzerinde etkilidir. Daha büyük boyutlu kapsüllerde kütle/hacim oranı artar bu nedenle Ca^{2+} iyonlarının oluşturulan kapsül matriksi içerisine difüzyonu daha sınırlı olmakta ve çapraz bağlanma homojenliği azalmaktadır. Bu nedenle büyük kapsüller, yüzey kısmında daha iyi bağlanma yapısı gösterirken, iç kısımlarında ise daha gevşek bir ağ yapısı sergilemekte olup mukavemeti düşürmektedir. Buna karşılık daha küçük boyutlu kapsül, iyonların difüzyonu daha kolay olması nedeniyle daha homojen çapraz bağlanmış ağ yapısı oluşturmakta ve uygulanan yüke daha fazla mukavemet göstermiştir (Chan et al., 2011).

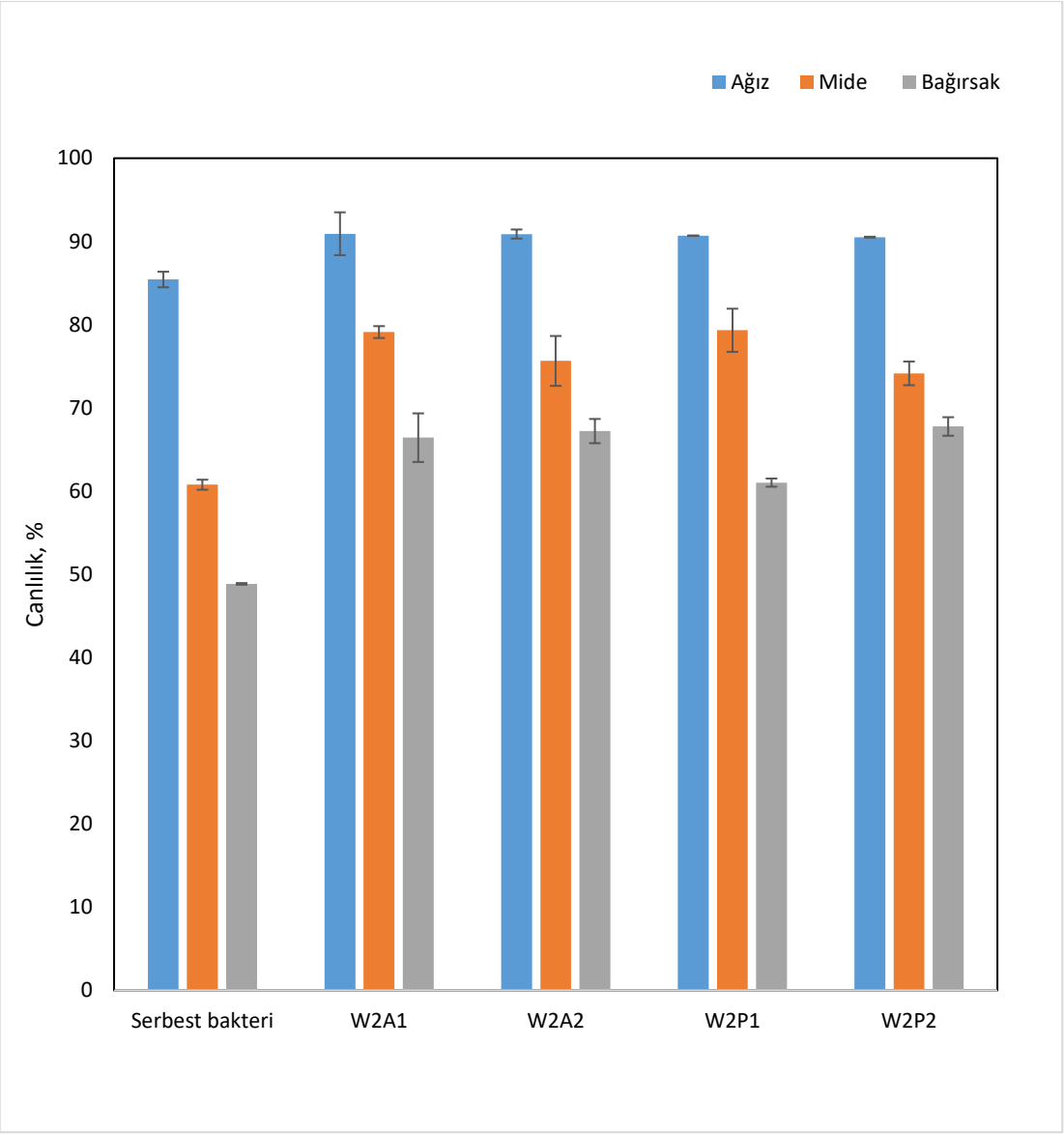
4.6 Simüle Edilmiş GI Koşullar Altında Serbest ve Kapsüllenmiş Probiyotik Bakterilerin Canlılığı

Sindirim sistemi boyunca probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürebilmesi, fonksiyonel gıda ürünlerinin etkinliği açısından kritik bir faktördür. Probiyotik bakteriler, mide ve bağırsak ortamlarında karşılaştıkları asidik pH,

sindirim sindirim enzimleri ve safra tuzları nedeniyle canlılıklarını önemli ölçüde kaybetmektedir. Bu olumsuzluklara karşı, kapsülleme teknolojisi probiyotiklerin korunmasında etkili bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Oliveira et al., 2024). Şekil 4.5'te yer alan verilere göre, serbest haldeki probiyotikler ağız ortamında %87 canlılık gösterirken, mide ve bağırsak ortamlarında bu oranlar sırasıyla %60 ve %48'e kadar düşmektedir. Bu düşüş, bakterilerin GI sistem koşullarına doğrudan maruz kalmasından kaynaklanmaktadır.

Kapsülleme ile hazırlanan W2A1, W2A2, W2P1 ve W2P2 formülasyonlarında ise, tüm sindirim aşamalarında serbest bakterilere kıyasla belirgin şekilde daha yüksek canlılık oranları elde edilmiştir. Ağız ortamında tüm kapsül grupları %90'larda canlılık sergileyerek yüksek koruma sağlamıştır. Ağız ortamının nötr pH'ı ve düşük enzimatik aktivitesi nedeniyle, bu aşamada kapsül sistemlerinin büyük farklılık göstermediği düşünülmektedir. Ancak mide ortamına geçildiğinde, kapsül sistemlerin koruyucu etkisi daha açık biçimde ortaya çıkmaktadır. Aljinat temelli W2A1 ve W2A2 kapsüllerinde mide ortamı sonrası canlılık oranları sırasıyla %78 ve %74 olurken, aljinat ve pektin içeren W2P1 ve W2P2 kapsüllerinde bu oranlar %77 ve %73 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, aljinat ve pektin gibi doğal polimerlerin sinerjik yapısının mide asiditesine karşı etkili bir fiziksel bariyer sağladığını göstermektedir (Mahmoud, Abdallah, El-Shafei, Tawfik, & El-Sayed, 2020).

Bağırsak ortamına geçildiğinde canlılık oranlarında bir miktar düşüş gözlemlenmiş, ancak kapsül formülasyonların koruyuculuğu devam etmiştir. W2P2 sistemi %67 ile en yüksek bağırsak canlılığını göstermiş, ardından %66 ile W2A2, %65 ile W2A1 ve %60 ile W2P1 sistemleri gelmiştir. Kapsüllere pektin eklenmesi kapsüllerin canlılık üzerinde etkisi olmadığını gösterirken; kapsül boyutunun canlılık üzerinde belirleyici olduğu söylenebilir. Daha büyük kapsül yapısına sahip W2A2 ve W2P2 kapsüller dış çevreye karşı daha etkili bir fiziksel engel oluşmuş ve bu sayede hücreler bağırsak ortamında daha uzun süre hayatta kalabilmesini sağlayabilir (Ramos, Cerqueira, Teixeira, & Vicente, 2018). Ayrıca pektin, intestinal ortamda çözünürlüğü yüksek bir polimer olduğu için hedeflenmiş salım açısından avantaj sağlamaktadır (Huang et al., 2024).



Şekil 4.5 *İnvitro* canlılık analiz sonuçları

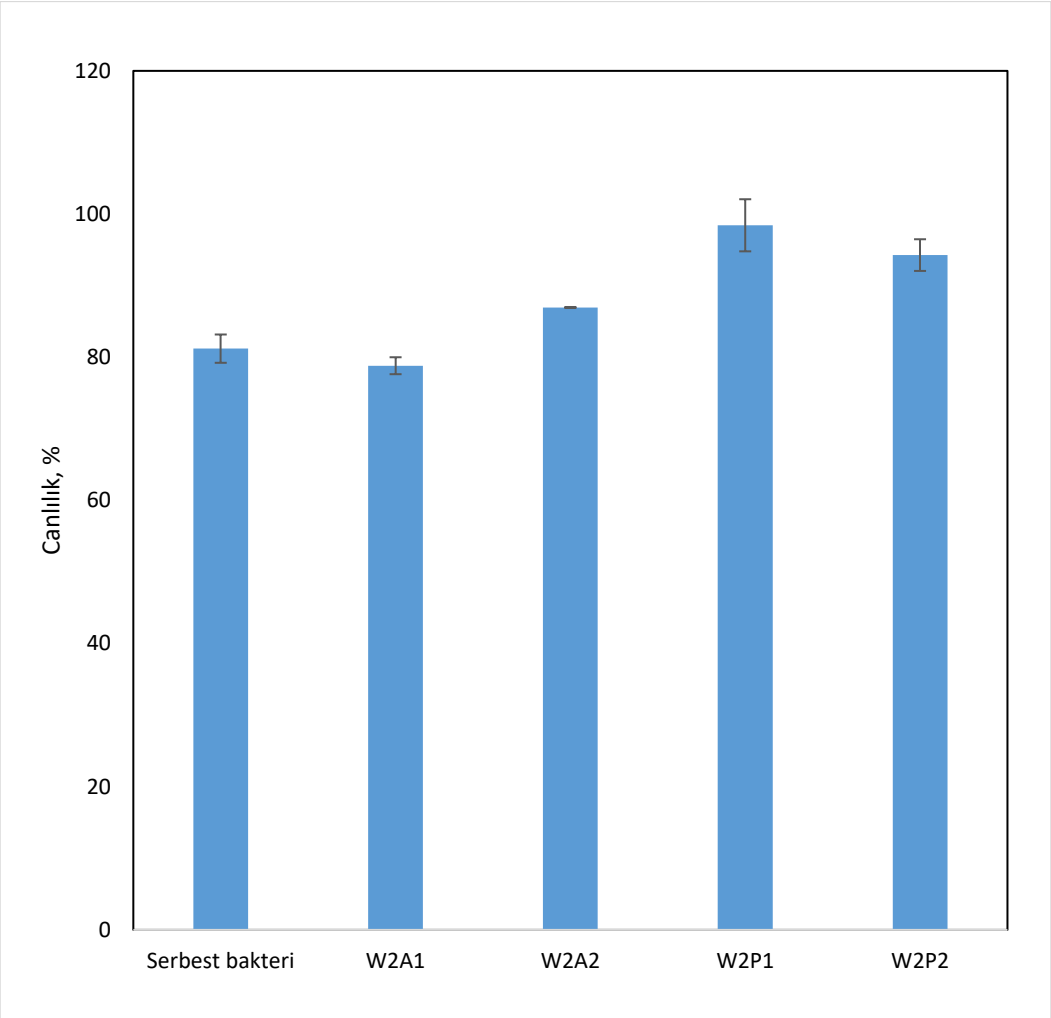
Genel olarak değerlendirildiğinde, kapsülleme teknolojisinin sindirim sisteminin farklı bölgelerinde probiyotik canlılığını sürdürebilmek açısından etkili olduğu ve kapsül boyutu ile polimer kompozisyonunun bu koruyuculuğun derecesini etkilediği söylenebilir. Kapsülleme stratejilerinde aljinat ve pektin gibi doğal biyopolimerlerin kullanımı, hem gıda güvenliği açısından kabul edilebilir hem de fonksiyonel performans açısından etkilidir. Bu bağlamda, kapsül tasarımı yapılırken sadece içerik değil, fiziksel boyut ve morfolojik yapı da dikkatle optimize edilmelidir (L. D. H. Zhang, 2020).

4.7 Serbest ve Kapsüllenmiş Probiyotik Bakterilerin Isıl İşlem Sonrası Canlılık Oranı

Probiyotik bakteri kapsüllerin termal stabiliteleri 72 °C'de 30 saniyelik pastörizasyon koşullarında canlılık gözlenmiştir (Şekil 4.6). Diğer ısıl işlemler (65 °C'de 30 dakika ve 72 °C'de 3 dakika) sonrasında canlı probiyotik bakterilere rastlanmazken, yalnızca 72 °C'de 30 saniyelik kısa süreli işlemden sonra kapsüller canlılık göstermiştir. Bu durum, özellikle kısa süreli yüksek sıcaklıklara karşı geliştirilen kapsül yapıların belirli bir ısı şokuna direnç gösterebildiğini ortaya koymaktadır.

Serbest bakteri grubunda canlılık oranı %82,2 iken, W2P1 ve W2P2 formülasyonlarında bu oranın sırasıyla %98,1 ve %94,6'ya kadar çıktığı görülmüştür. Bu sonuçlar, pektin içeren çift emülsiyon sistemlerinin termal koruma kapasitesini artırdığını göstermektedir. Özellikle pektin protein ile kombinasyonunun, ısıl stres altında hücreleri çevresel zararlardan koruyarak kapsülün yapısal bütünlüğünü muhafaza ettiği düşünülmektedir (Bordini et al., 2023). Bu bulgular literatürde yer alan, pektin gibi polisakkaritlerin jel oluşturma ve termal bariyer sağlama yetenekleri ile uyumludur (Burgain et al., 2011; Rokka & Rantamäki, 2010). Pektinin de Ca^{2+} iyonları ile etkileşime girerek düzenli çapraz bağlar kurması aljinat jel ağının gözenek yapısını sıkılaştırır. Sıkışan gözenek yapısından kaynaklı sadece aljinat içeren kapsüllerden daha dayanıklı olduğu söylenebilir (Karakas et al., 2022). Ancak, işlem süresinin uzaması durumunda (örneğin 3 dakikaya çıkarıldığında), sıcaklığın etkisinin daha baskın hâle gelerek canlılığın tamamen ortadan kalktığı görülmüştür.

Bu bulgular literatürde yer alan, pektin gibi polisakkaritlerin jel oluşturma ve termal bariyer sağlama yetenekleri ile uyumludur (Burgain et al., 2011; Rokka & Rantamäki, 2010). Ancak, işlem süresinin uzaması durumunda (örneğin 3 dakikaya çıkarıldığında), sıcaklığın etkisinin daha baskın hâle gelerek canlılığın tamamen ortadan kalktığı görülmüştür.



Şekil 4.6 Sıcaklık uygulaması canlılık sonuçları

5
SONUÇ

Bu çalışmada, *Lactobacillus helveticus* suşunun çift emülsiyon (W1/O/W2) yapıları ile farklı polimer matrislerinde enkapsülasyonu gerçekleştirilmiş ve bu kapsül yapıların fiziksel, termal ve fonksiyonel özellikleri değerlendirilmiştir. WPI, inülin, aljinat ve pektin gibi gıda uyumlu bileşenler kullanılarak hazırlanan formülasyonlar, emülsiyon kararlılığı, morfolojik yapı, jel mukavemeti, FTIR ve DSC analizleriyle karakterize edilmiştir. Ayrıca, probiyotik bakterilerin simüle gastrointestinal koşullar ve ısıl işlem sonrası canlılık düzeyleri incelenmiştir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, pektin ve aljinat kombinasyonuyla hazırlanan kapsül sistemlerinin, hem mide asidi gibi zorlu koşullara hem de pastörizasyon benzeri ısıl uygulamalara karşı yüksek dayanım sağladığı görülmüştür. Genel olarak değerlendirildiğinde, kapsülleme teknolojisinin sindirim sisteminin farklı bölgelerinde probiyotik canlılığını sürdürebilmek açısından etkili olduğu ve kapsül boyutu ile polimer kompozisyonunun bu koruyuculuğun derecesini etkilediği söylenebilir. Kapsülleme stratejilerinde aljinat ve pektin gibi doğal biyopolimerlerin kullanımı, hem gıda güvenliği açısından kabul edilebilir hem de fonksiyonel performans açısından etkilidir. Bu bağlamda, kapsül tasarımı yapılırken sadece içerik değil, fiziksel boyut ve morfolojik yapı da dikkatle optimize edilmelidir. SEM ve optik mikroskop analizleri kapsüllerin morfolojik bütünlüğünü doğrulamış,

Bu tez kapsamında geliştirilen çift emülsiyon tabanlı hidrojel kapsül sistemlerinin, probiyotiklerin hem teknolojik işlemlere karşı stabilitesini hem de gastrointestinal sistemde hayatta kalma potansiyelini artırabileceği görülmüştür. Bu durum, fonksiyonel gıdalarda probiyotiklerin etkin şekilde taşınması ve kontrollü salımı için umut vadeden bir yöntem olduğunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKÇA

Aleman, R. S., & Yadav, A. (2023). Systematic review of probiotics and their potential for developing functional nondairy foods. *Applied Microbiology, 4*(1), 47-69.

Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology, 18*(5), 240-251.

Atia, A., Gomma, A. I., Fliss, I., Beyssac, E., Garrait, G., & Subirade, M. (2017). Molecular and biopharmaceutical investigation of alginate–inulin synbiotic coencapsulation of probiotic to target the colon. *Journal of Microencapsulation, 34*(2), 171-184.

Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2007). W/O/W double emulsions stabilized with WPI–polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 294*(1-3), 20-32.

Bordini, F. W., Rosolen, M. D., da Luz, G. d. Q., Pohndorf, R. S., de Oliveira, P. D., Conceição, F. R., . . . Pieniz, S. (2023). Development of a microencapsulated probiotic delivery system with whey, xanthan, and pectin. *Brazilian Journal of Microbiology, 54*(3), 2183-2195.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering, 104*(4), 467-483.

Chan, E.-S., Lim, T.-K., Voo, W.-P., Pogaku, R., Tey, B. T., & Zhang, Z. (2011). Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. *Particuology, 9*(3), 228-234.

Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology, 17*(5), 272-283.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of controlled release, 162*(1), 56-67.

Dickinson, E. (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics, 6*(1), 1-11.

Falsafi, S. R., Karaca, A. C., Deng, L., Wang, Y., Li, H., Askari, G., & Rostamabadi, H. (2022). Insights into whey protein-based carriers for targeted delivery and controlled release of bioactive components. *Food Hydrocolloids, 133*, 108002.

FAO, F. (2002). WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *World Health Organization: Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 1-11.

Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., & Marchioni, E. (2009). Microencapsulation of Lactobacillus plantarum spp in an alginate matrix

coated with whey proteins. *International journal of food microbiology, 129*(1), 103-105.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International, 40*(9), 1107-1121.

Gheorghita Puscaselu, R., Lobiuc, A., Dimian, M., & Covasa, M. (2020). Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders. *Polymers, 12*(10), 2417.

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS letters, 32*(1), 195-198.

Griffiths, M. W., & Tellez, A. M. (2013). Lactobacillus helveticus: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiology, 4*, 30.

Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical reviews in food science and nutrition, 52*(4), 291-311.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., . . . Salminen, S. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 11*(8), 506-514.

Hu, X., Liu, C., Zhang, H., Hossen, M. A., Sameen, D. E., Dai, J., . . . Li, S. (2021). In vitro digestion of sodium alginate/pectin co-encapsulated Lactobacillus bulgaricus and its application in yogurt bilayer beads. *International journal of biological macromolecules, 193*, 1050-1058.

Huang, Y., Lu, Z., Liu, F., Lane, J., Chen, J., Fu, X., . . . Zhang, B. (2024). Osteopontin enhances the probiotic viability of Bifidobacteria in pectin-based microencapsulation subjected to in vitro infant gastrointestinal digestion. *Food Hydrocolloids, 149*, 109634.

Huq, T., Khan, A., Khan, R. A., Riedl, B., & Lacroix, M. (2013). Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Critical reviews in food science and nutrition, 53*(9), 909-916.

Ishwarya S, P., R, S., & Nisha, P. (2022). Advances and prospects in the food applications of pectin hydrogels. *Critical reviews in food science and nutrition, 62*(16), 4393-4417.

Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology, 3*(2), 39-48.

Kamalian, N., Mirhosseini, H., Mustafa, S., & Abd Manap, M. Y. (2014). Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of Bifidobacterium pseudocatenulatum G4 in simulated gastrointestinal fluid. *Carbohydrate polymers, 111*, 700-706.

Karakas, C. Y., Ordu, H. R., Bozkurt, F., & Karadag, A. (2022). Electrosprayed chitosan-coated alginate–pectin beads as potential system for colon-targeted

delivery of ellagic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 102*(3), 965-975.

Karakaş, C. Y., Yildirim, R. M., & Karadag, A. (2023). Encapsulation of Lactobacillus plantarum ELB90 by electrospraying in a double emulsion (W1/O/W2) loaded alginate beads to improve the gastrointestinal survival and thermal stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 103*(7), 3427-3436.

Koh, W. Y., Lim, X. X., Tan, T.-C., Kobun, R., & Rasti, B. (2022). Encapsulated probiotics: Potential techniques and coating materials for non-dairy food applications. *Applied Sciences, 12*(19), 10005.

Kong, C., Cheng, L., Krenning, G., Fledderus, J., de Haan, B. J., Walvoort, M. T., & de Vos, P. (2020). Human milk oligosaccharides mediate the crosstalk between intestinal epithelial Caco-2 cells and lactobacillus plantarum WCFS1in an in vitro model with intestinal peristaltic shear force. *The Journal of Nutrition, 150*(8), 2077-2088.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International dairy journal, 13*(1), 3-13.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International dairy journal, 14*(8), 737-743.

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science, 37*(1), 106-126.

Li, W., Mutuvulla, M., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2012). Isolation and identification of high viscosity-producing lactic acid bacteria from a traditional fermented milk in Xinjiang and its role in fermentation process. *European Food Research and Technology, 235*, 497-505.

Li, Z., Wu, Y., Yang, H., Cai, C., Zhang, H., Hashiguchi, K., . . . Lu, J. (2013). Effect of liquid viscosity on atomization in an internal-mixing twin-fluid atomizer. *Fuel, 103*, 486-494.

Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science, 147*(3659), 747-748.

Mahmoud, M., Abdallah, N. A., El-Shafei, K., Tawfik, N. F., & El-Sayed, H. S. (2020). Survivability of alginate-microencapsulated Lactobacillus plantarum during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon, 6*(3).

Mandal, S., Puniya, A., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated Lactobacillus casei NCDC-298. *International dairy journal, 16*(10), 1190-1195.

McClements, D. J. (2004). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*: CRC press.

Mendonça, A. A., Pinto-Neto, W. d. P., da Paixão, G. A., Santos, D. d. S., De Morais Jr, M. A., & De Souza, R. B. (2022). Journey of the probiotic bacteria: Survival of the fittest. *Microorganisms, 11*(1), 95.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., . . . Dupont, D. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food–an international consensus. *Food & function, 5*(6), 1113-1124.

Muliawati, N. T., Siswanta, D., & Aprilita, N. H. (2021). Development of a simple Fe (II) ion colorimetric sensor from the immobilization of 1, 10-phenanthroline in alginate/pectin film. *Indonesian Journal of Chemistry, 21*(2), 411-420.

Munoz-Ibanez, M., Azagoh, C., Dubey, B. N., Dumoulin, E., & Turchiuli, C. (2015). Changes in oil-in-water emulsion size distribution during the atomization step in spray-drying encapsulation. *Journal of food engineering, 167*, 122-132.

Muschiolik, G., & Dickinson, E. (2017). Double emulsions relevant to food systems: preparation, stability, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16*(3), 532-555.

Nosal, H., Moser, K., Warzała, M., Holzer, A., Stańczyk, D., & Sabura, E. (2021). Selected fatty acids esters as potential PHB-V bioplasticizers: Effect on mechanical properties of the polymer. *Journal of Polymers and the Environment, 29*, 38-53.

Oliveira, W. d. C., Brito, L. P. d., Souza, E. A. G. d., Lopes, I. L., Oliveira, C. A. d., Calaça, P. R. d. A., . . . Costa, E. D. (2024). The Yeast-Based Probiotic Encapsulation Scenario: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Applied Sciences, 14*(13), 5461.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). *Probiotics: an overview of beneficial effects.* Paper presented at the Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 1–5 September 2002, Egmond aan Zee, the Netherlands.

Ozcan, B. E., Saroglu, O., Karakas, C. Y., & Karadag, A. (2023). Encapsulation of purple basil leaf extract by electrospraying in double emulsion (w/o/w) filled alginate-carrageenan beads to improve the bioaccessibility of anthocyanins. *International journal of biological macromolecules, 250*, 126207.

Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of food science, 76*(1), R6-R15.

Permanadewi, I., Kumoro, A., Wardhani, D., & Aryanti, N. (2022). Effect of viscosity on iron encapsulation using alginate as a carrying agent in a controlled spray drying process. *Food Research, 6*(5), 56-67.

Popescu, V., Molea, A., Moldovan, M., Lopes, P. M., Mazilu Moldovan, A., & Popescu, G. L. (2021). The influence of enzymatic hydrolysis of whey proteins on the properties of gelatin-whey composite hydrogels. *Materials, 14*(13), 3507.

Pupa, P., Apiwatsiri, P., Sirichokchatchawan, W., Pirarat, N., Muangsin, N., Shah, A. A., & Prapasarakul, N. (2021). The efficacy of three double-

microencapsulation methods for preservation of probiotic bacteria. *Scientific reports, 11*(1), 13753.

Ragland, S. A., & Criss, A. K. (2017). From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS pathogens, 13*(9), e1006512.

Rajaonarivony, M., Vauthier, C., Couarraze, G., Puisieux, F., & Couvreur, P. (1993). Development of a new drug carrier made from alginate. *Journal of pharmaceutical sciences, 82*(9), 912-917.

Ramos, P. E., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2018). Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. *Critical reviews in food science and nutrition, 58*(11), 1864-1877.

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

Ronkart, S. N., Deroanne, C., Paquot, M., Fougnies, C., Lambrechts, J.-C., & Blecker, C. S. (2007). Characterization of the physical state of spray-dried inulin. *Food Biophysics, 2*, 83-92.

Rosas-Flores, W., Ramos-Ramírez, E. G., & Salazar-Montoya, J. A. (2013). Microencapsulation of Lactobacillus helveticus and Lactobacillus delbrueckii using alginate and gellan gum. *Carbohydrate polymers, 98*(1), 1011-1017.

Rudolph, M. (2012). Nanoparticle-Polymer-Composites the solution and spray drying process with an emphasis on colloidal interactions. 2012. *Technische Universität Bergakademie Freiberg: Freiberg*.

Said, N. S., Olawuyi, I. F., & Lee, W. Y. (2023). Pectin hydrogels: Gel-forming behaviors, mechanisms, and food applications. *Gels, 9*(9), 732.

Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 16*(10), 605-616.

Shah, N., & Ravula, R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology, 55*(3), 139.

Slattery, L., O'callaghan, J., Fitzgerald, G., Beresford, T., & Ross, R. (2010). Invited review: Lactobacillus helveticus—a thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *Journal of dairy science, 93*(10), 4435-4454.

Taboada, M. L., Zapata, E., Karbstein, H. P., & Gaukel, V. (2021). Investigation of oil droplet breakup during atomization of emulsions: comparison of pressure swirl and twin-fluid atomizers. *Fluids, 6*(6), 219.

Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2012). Health-promoting properties of Lactobacillus helveticus. *Frontiers in Microbiology, 3*, 392.

Vanare, S. P., Singh, R. K., Chen, J., & Kong, F. (2025). Double emulsion microencapsulation system for Lactobacillus rhamnosus GG using pea protein and cellulose nanocrystals. *Foods, 14*(5), 831.

Yilmaz, M. T., Taylan, O., Karakas, C. Y., & Dertli, E. (2020). An alternative way to encapsulate probiotics within electrospun alginate nanofibers as monitored under simulated gastrointestinal conditions and in kefir. *Carbohydrate Polymers, 244*, 116447.

Zhang, L. D. H. (2020). Recent advances in probiotics encapsulation by electrospinning. *ES Food & Agroforestry, 2*, 3-12.

Zhang, Z., Gu, M., You, X., Sela, D. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2021). Encapsulation of bifidobacterium in alginate microgels improves viability and targeted gut release. *Food Hydrocolloids, 116*, 106634.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Yurdaer, I., Karakas, C.Y., Metin-Yıldırım R. & Karadag A., "Çift emülsiyon (W1/O/2) yüklü hidrojel yapılarda probiyotik bakteri enkapsülasyonu" 8th International Congress on Agriculture, Environment and Health, 22-24 May, 2025, Aydin, Turkey.