



## FARKLI KAPLAMA MATERYALLERİ İLE KAPLANMIŞ *Lactobacillus rhamnosus*'un TERMAL İNAKTİVASYON KİNETİĞİ

Emel ÜNAL TURHAN,<sup>1</sup> Zerrin ERGİNKAYA,<sup>2</sup> Adnan BOZDOĞAN,<sup>3</sup> Zerrin ASLAN<sup>4</sup>

### ÖZET

Bu çalışmada farklı kaplama materyalleri ile kaplanmış *Lactobacillus rhamnosus*'un farklı sıcaklık ve sürelerdeki termal inaktivasyon kinetiklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada probiyotik kültür olarak *L. rhamnosus* kullanılmış ve farklı kombinasyonlardaki kaplama materyalleri ile (aljinat, jelatin ve gellan gam) ekstrüzyon tekniğine göre kaplanmıştır. Mikroenkapsüle *L. rhamnosus*'un 55-60 °C'de 15 ve 30 dakikalık ısıtma işlemdeki sıcaklık dayanımları serbest kültür ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mikroenkapsüle kültürlerin sıcaklık dayanımlarının serbest kültürlerle göre daha iyi olduğu bulunmuştur. Ayrıca kaplama materyali kombinasyonunun hücrelerin canlılıkları üzerinde etkili olduğu saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** mikroenkapsülasyon, *L.rhamnosus*, termal inaktivasyon, probiyotik, ekstrüzyon

### THERMAL INACTIVATION KINETIC OF *Lactobacillus rhamnosus* MICROENCAPSULATED WITH DIFFERENT COATING MATERIALS

### ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine thermal inactivation kinetics of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* at different temperature and time. In this study *L. rhamnosus* was used as a probiotic culture and microencapsulated with coating material in different combination (alginate, gelatin and gellan gum) according to extrusion technique. Heat resistance of microencapsulated *L. rhamnosus* was compared with free culture at 55-60 °C for 15 and 30 minutes. According to our results heat resistance of microencapsulated culture was found better than free culture. Also, it was determined that difference in combination of coating material had effect on viability of probiotic cell.

**Keywords:** microencapsulation, *L. rhamnosus*, thermal inactivation, probiotic, extrusion

<sup>1</sup> Yrd.Doç.Dr. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadirli Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Gıda Tekn.Böl.

emelunal@osmaniye.edu.tr

<sup>2</sup> Prof. Dr. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Böl.

<sup>3</sup> Yrd.Doç.Dr. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Böl.

<sup>4</sup> Yüksek Lisans Öğrencisi, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Böl.

## 1. GİRİŞ

Probiyotikler, yeterli sayıda alındıklarında konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösteren mikroorganizmalardır (Makinen ve ark. 2012, Sanchez ve ark. 2012). Probiyotik mikroorganizmalar denildiğinde, daha çok laktik asit bakterileri akla gelmektedir. Ancak, konu ile ilgili yapılan birçok araştırmada, az olmakla birlikte, probiyotik etki gösteren başka mikroorganizma gruplarının (örneğin maya ve küfler) da olduğu belirlenmiştir (De vuyst ve ark. 2008).

Bir araştırmada, probiyotik kültür olarak kullanılan *L.rhamnosus*, ilk olarak 1983 yılında Barry Goldin ve Sherwood Gorbach tarafından sağlıklı bir insan bağırsağından izole edilmiştir. Diğer probiyotikler gibi, *L.rhamnosus*'un da bağırsak için yararlı özelliklerinin olmasının yanında, bağırsak ve idrar yolları patojenleri ile mücadelede ve bağışıklık sistemine önemli ölçüde yardımcı olduğu belirlenmiştir (Giovanna ve Dellaglio 2005, Nivolieza ve ark. 2012). Ayrıca, süt ürünlerinin sindirimini kolaylaştırma, ishal süresini azaltma ve böbrek enfeksiyonlarında bakteriyel enfeksiyonları bastırma gibi, sağlık üzerine olumlu etkileri de, yapılan çalışmalarda saptanmıştır (Pelto ve ark. 1998). *L. rhamnosus* da, diğer laktik asit bakterileri ürünleri gibi yoğurt, fermente süt ve fermente sosis gibi gıda ürünlerinde kullanılmaktadır (Parvez ve ark. 2006).

Tüketici talepleri doğrultusunda, probiyotik ürünlerin çeşitliliği artmakta ve pazardaki payı büyümektedir (Gouin 2004). Ancak probiyotik mikroorganizma içeren fonksiyonel gıdaların geliştirilmesini ve üretimini kısıtlayan bir takım engeller vardır (Anal ve ark. 2007, Hsieh ve Ofori 2007, Qi ve ark. 2006). Bunlar; gıdanın işlenmesinden kaynaklanan engeller (yüksek sıcaklık, kurutma, dondurma, yüksek basınç, asidik veya alkali ortam), tüketiminden sonra metabolizmadan kaynaklanan engeller (sindirim sistemi enzimleri, yüksek asidik ortam ve safra tuzları) ve mikroorganizmanın kendisinden kaynaklanan engellerdir (anaerobik gelişme koşulları ve zengin besin maddeleri gereksinimi, oksijen, sıcaklık, pH, inhibitörler ve rekabetçi mikroorganizmalardan kaynaklanan stres koşulları).

Probiyotik mikroorganizmaların sağlık üzerinde beklenen faydalı etkiyi sağlayabilmeleri için,  $10^6-10^7$  kob/mL veya daha fazla sayıda vücuda alınmaları ve içinde buldukları gıdanın üretimi ve raf ömrü boyunca canlı kalmaları gerekmektedir (Vasiljevic ve ark. 2008). Probiyotiklerin belirli sayıda ve düzenli olarak tüketilmelerine ilaveten, alınan bakterilerin sindirim sisteminde, mide asitliği, safra tuzları ve çeşitli enzimler vb. gibi zor koşullarda da canlılığını koruyabilmesi, uygun miktarda bağırsaklara ulaşarak kolonize olması gerekmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların canlılığının ve stabilitesinin korunması, birçok üründe, gerek işleme sırasında, gerekse depolama ve satış aşamalarında önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Probiyotik gıdalarda kullanılan mikroorganizmalarda, ürüne özgü türler olması yanı sıra, ürünün raf ömrü boyunca canlılıklarını koruyabilme özelliği de aranmaktadır. Ayrıca, probiyotik türlerin seçiminde, ilgili yeni üretim teknolojileri ve formülasyonları dikkate alınarak, fonksiyonel özellikleri olanlar öncelikli olarak seçilmektedir (Ouweland ve Isolauri 2002, Mattila-Sandholm ve ark. 2002, Knorr 1998 ). Diğer yandan, probiyotik ürünlerin, ticari olarak üretilmeden önce, pilot üretimleri gerçekleştirilerek, üretimde uygulanan işlemler sırasında ve sonrasında canlı kalma oranları belirlenmektedir (Argin 2007, Mosilhey 2003).

Gıdanın işlenmesinden kaynaklanan engellerin başında sıcaklık gelmektedir. Probiyotik gıda üretimini kısıtlayan yüksek sıcaklık uygulamaları, kullanılan mikroorganizmaların stabilitesinin, yani canlılığının korunamamasına neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda mikroenkapsülasyon (ME) tekniğinin, probiyotiklerin teknolojik özelliklerinin artırılmasında kullanılan yeni yöntemlerden biri olduğu bildirilmiştir. ME, daha önce de bahsedildiği gibi, çeşitli maddelerin 5-300µm çapındaki kapsüller içerisinde tutulması ile gerçekleşir. Probiyotiklerin ME'unda, daha çok ekstrüzyon ve emülsiyon yöntemlerinin kullanıldığı bildirilmiştir. Ekstrüzyon yöntemi kolay uygulanabilir olması, ucuz olması ve hücre canlılığını garantilemesi gibi avantajlarından dolayı daha çok tercih edilmektedir (Anal ve Singh 2007, Özer ve ark. 2009, Papagianni ve Anastasiadou 2009, Heidebach ve ark. 2009a, 2009b).

ME tekniği ile ilgili yapılan daha önceki çalışmalarda, mikroenkapsüle probiyotiklerin olumsuz koşullardaki canlı kalma süreleri incelenmiştir. Çalışmalarda mikroenkapsülasyon işleminin genel olarak hücre dayanımını arttırdığı saptanmış ve uygulanan mikroenkapsülasyon yöntemi ve kaplama materyali bileşiminin hücre dayanımı üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Argin 2007, Sanchez ve ark. 2012, Nazzaro ve ark. 2012).

Sonuç olarak, probiyotik kültürlerin canlılıkları, gıdaların sahip oldukları içeriğe veya üretimleri sırasında uygulanan işlem koşullarına göre değişkenlik göstermektedir. Probiyotiklerin canlılıklarını korumaları açısından, gıdalarda stres yaratıcı faktörlerden biri olarak bilinen sıcaklığın canlılık üzerindeki etkilerinin öncelikle *in vitro* koşullarda belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *in vitro* koşullarda elde edilen sonuçların kinetik denklemlerle desteklenmesinin gerektiği bildirilmiştir (Krasaekoopt ve ark. 2004, Annan ve ark. 2008, Mokarram ve ark. 2009, Gbassi ve ark. 2009).

Probiyotik mikroorganizmaların farklı sıcaklık ve süre ilişkilerinden yani farklı ısıl işlemlerden farklı şekillerde etkilendikleri bugüne kadar yapılan çalışmalar neticesinde bilinmektedir. Bir ısıl işlemin etkinliğinin hesaplanabilmesi için ise, ısıl işlem açısından önemli olan mikroorganizmanın ısıl direnç özelliklerinden en az birinin (D değeri, Z değeri ve F değeri) bilinmesi gerekmektedir. Mikroorganizmaların ısı etkisiyle ölümü genellikle birinci dereceden reaksiyon kinetiğine uymaktadır. Sabit sıcaklıkta ortamda bulunan mikroorganizmaların % 90'ının öldürülmesi için gerekli ısıtma süresi D-değeri olarak bilinir. Başka bir deyişle; D-değeri logaritmik canlı kalma eğrisinin bir logaritmik devreyi aşması için gerekli ısıtma süresidir (Çoksöyler 2006, Tırnaksız, 2009).

Bu çalışmanın amacı; farklı kaplama materyalleri ile kaplanmış mikroenkapsüle *L. rhamnosus*'un farklı sıcaklık (55 ve 60°C) ve sürelerdeki (15 ve 30 dakika) termal inaktivasyon kinetiklerini belirlemektir.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Probiyotik kültürlerin ekstrüzyon tekniği ile mikroenkapsülasyonu

Bu çalışmadaki denemeler 2 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, *L. rhamnosus*'un (RIUM/Hollanda) mikroenkapsülasyonunda ekstrüzyon tekniği uygulanmıştır (Chen ve ark. 2007). *L. rhamnosus*'un ekstrüzyon tekniği ile kaplama işleminde kullanılan tüm cam malzemeler ve çözeltiler 121 °C' de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Çalışmada %3 aljinat (Sigma Aldrich GmbH-USA), %4 aljinat, %3 aljinat + %1 gellan gam (Merck KGaA-Germany) ve %3 aljinat + %1 jelatin (Merck KGaA-Germany) olmak üzere 4 farklı oranda kaplama materyali çözeltileri kullanılmıştır. Kaplama materyali çözeltileri distile su kullanılarak hazırlanmış ve 121 °C' de 15 dak. sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. Probiyotik kültürü içeren süspansiyon (10<sup>8</sup> kob/mL) steril kaplama materyali çözeltilerine 1/5 oranında olacak şekilde ilave edilmiştir. Elde edilen karışım (karıştırma işleminden sonraki hücre konsantrasyonu 10<sup>7</sup> kob/mL) 0.11 mm' lik iğnesi olan şırınga ile 0.05 M'lık steril CaCl<sub>2</sub> (Merck KGaA-Germany) içerisine homojen büyüklükteki damlacıklar halinde enjekte edilmiştir. Oluşan kapsüller, yeterli sertliği kazanmaları amacıyla 30 dak. süre ile çözeltileri içerisinde bırakılmış ve sonra "whatman# 4 filtre kağıdı" ile süzülerek analizlerde kullanıma hazır hale gelmiştir (Chen ve ark. 2007). Mikrokapsüller 0.11mm'lik iğne ucundan homojen olarak damlatıldığı için genellikle boyutları birbirine yakın (yaklaşık 3,5 mm çapında) mikrokapsüller elde edilmiştir. Denemede elde edilen mikrokapsüller Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Ekstrüzyon tekniği ile elde edilmiş mikrokapsüller

## 2.2. Probiyotik kültür içeren mikrokapsüllerdeki canlı hücre sayısının belirlenmesi

Probiyotik kültür içeren 10 g mikrokapsül 90 ml fosfat tamponunda (Merck KGaA-Germany) 15 dak. homojenize edilmek suretiyle süspansiye edilmiştir. Gerekli seyreltmeler (%0.1 pepton dilüsyon ile) yapıldıktan sonra MRS-agar'a (Merck-Germany) yayma ekim yöntemi ile ekilip 48 saat 30 °C'de anaerobik inkübasyona bırakılmıştır (Harrigan 1998).

## 2.3. Mikrokapsüllerin sıcaklığa dirençlerinin belirlenmesi

10 g mikroenkapsüle bakteri 90 mL dilüsyon sıvısı içerisinde çalkalamalı su banyosunda 55 °C ve 60 °C'de 15 ve 30 dakika bekletilmiştir. Ardından oda sıcaklığına gelecek şekilde çok hızlı bir şekilde soğutulup bölüm 3.2.2'de açıklanan canlı hücre sayısını belirlemeyle ilgili mikrobiyolojik ekim işlemleri yapılmıştır (Chen ve ark. 2007).

## 2.4. Termal inaktivasyon kinetiklerinin hesaplanması

Bu çalışmada mikroorganizmaların ısı etkisiyle inaktivasyonu birinci dereceden reaksiyon kinetiğine göre hesaplanmıştır (Çoksöyler 2006, Tırnaksız 2009). Çalışmada "Microsoft Office Excel 2007" programından yararlanılarak logaritmik canlı kalma eğrisi (termal inaktivasyon eğrisi) çizilerek  $k$ ,  $D$ ,  $t_{1/2}$  ve  $R^2$  değerleri hesaplanmıştır. Termal inaktivasyonun hesaplanması ile ilgili termal inaktivasyon eğrilerinden elde edilen eşitlikler aşağıda ayrıntılı olarak gösterilmiştir (Felicio ve ark. 2011).

$$-dN/dT = kN \text{ (Eşitlik 1)}$$

Bu eşitlikte " $k$ " mikroorganizmaların ölüm hız değişimini, " $-dN/dt$ " zamanla mikroorganizma derişiminin azalma hızını, " $N$ " t zaman (mesela sterilizasyon süresi sonunda) sonra sabit sıcaklıkta (sabit gaz derişiminde veya gama radyasyon dozunda) yaşayan mikroorganizma sayısını veya yükünü göstermektedir. Bu eşitliğin integrali alındığında 2, 3 ve 4 numaralı eşitlikler elde edilir (Çoksöyler 2006, Tırnaksız 2009).

$$N = N_0 e^{-kt} \text{ (Eşitlik 2)}$$

$$\ln N = \ln N_0 - kt \text{ (Eşitlik 3)}$$

$$\log N = \log N_0 - kt \log e \text{ (Eşitlik 4)}$$

Bu eşitliklerde  $N_0$ , ısıl işlem öncesi mikroorganizma yükünü (bioburden) göstermektedir.  $N$  ve  $N_0$  değerleri % olarak veya birim hacimdeki mikroorganizma sayısı olarak alınabilir (Çoksöyler 2006, Tırnaksız 2009)

## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 3.1. Farklı sıcaklık ve sürelerde *L. rhamnosus*'un canlı hücre sayısı

Başlangıçtaki konsantrasyonu  $10^7$  kob/mL olan *L. rhamnosus* suşunun 50 ve 60 °C'de 15 dakika ve 30 dakika bekletildikten sonraki canlılığı çizelge 1'de gösterilmiştir. Çizelge 1'den de görüldüğü üzere *L. rhamnosus*'un canlılığı farklı sıcaklık ve sürede uygulanan sıcaklık uygulamasına göre değişkenlik gösterdiği gibi farklı kaplama materyallerinden de farklı şekillerde etkilenmiştir. Ayrıca serbest kültürlerin sıcaklık uygulamasına olan dayanımlarının mikroenkapsüle kültürlerden daha kötü olduğu görülmektedir. Bu durum daha önceki çalışmalarda sıklıkla bahsedilen mikrenkapsülasyonun hücre dayanımını arttırdığı yönündeki bilgileri desteklemiştir (Heidebach ve ark. 2009a, 2009b).

Daha önce yapılan farklı araştırmalarda, mikroenkapsülasyonun stres faktörlerine karşı koruyucu bir rol üstlendiği belirlendiği için, bu çalışmada farklı kaplama materyali kombinasyonları ve sıcaklık koşullarının etkisi, birlikte karşılaştırılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları da destekleyici olarak, genel olarak 30 dakikalık bir sıcaklık uygulamasının 2-4 log kob/mL aralığında değişen canlı hücre kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Ding ve Shah 2007, Babu ve Nithyalakshmi 2011, Sanchez ve ark. 2012). Nitekim bu çalışmadaki sonuçlar incelendiğinde, 55 °C'de 30 dakika sıcaklık uygulamasının mikroenkapsüle edilmiş örneklerdeki hücre sayısında yaklaşık 2-2.5 log kob/g düşüğe neden olduğu, buna karşın 60 °C'de 30 dakikalık sıcaklık uygulamasının yaklaşık 4-5 log kob/g düzeyinde düşüğe neden olduğu saptanmıştır.



**Çizelge 1.** *L. rhamnosus* sayısı (log kob/g)

	%3 aljinat	%4 aljinat	%3 aljinat +%1 gellan gam	%3 aljinat +%1 jelatin	Serbest kültür
A	5,30	5,91	5,72	6,04	3,78
B	4,48	4,78	4,92	5,23	3,04
C	3,30	3,83	4,60	4,26	2,89
D	2,08	2,73	2,92	3,32	1,43
K	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00

A: 55°C'de 15 dak., B: 55°C'de 30 dak., C: 60°C'de 15 dak., D: 60°C'de 30 dak., K: Kontrol

Teoh ve ark.(2011), tarafından yapılan çalışmada, 55, 60, 65 °C'lerde 0, 15 ve 30 dak.'lık sıcaklık uygulamalarının mikroenkapsüle edilmiş *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium pseudocatenulatum* canlılıkları üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda mikroenkapsülasyon işleminin önemli derecede koruyucu etki gösterdiği istatistiki olarak tespit edilmiştir. 60 °C'de 30 dak. sıcaklık uygulamasının *L.acidophilus*'un canlı hücre sayısında 1,99 log'luk bir düşüşe neden olurken, *B. pseudocatenulatum* canlı hücre sayısında 0,85 log'luk bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlarda da görüldüğü üzere farklı bakterilerin sıcaklık işleminden etkilenme düzeylerinin de farklı olduğu görülmüş ve bizim çalışmamızda elde edilen sonuçları desteklemiştir.

Ding ve Shah (2007), mikroenkapsüle probiyotik kültürlerin sıcaklık uygulamalarından etkilenme düzeyini inceledikleri çalışmalarında 65 °C'de 30 dakikalık bir sıcaklık uygulamasında mikroenkapsüle kültürlerde 4,17 log'luk bir düşüş gözlenirken serbest kültürlerde 6,74 log'luk bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar çalışmamızda elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermiştir.

### 3.2. *L. rhamnosus*'un termal inaktivasyon kinetiği

Daha önceki literatür çalışmalarında da belirtildiği üzere termal inaktivasyon kinetiği 1. dereceden kinetiğe girmektedir (Felicio ve ark. 2011, Oğuzhan ve Yangılar 2013). Çalışmada iki farklı sıcaklıkta *L.rhamnosus* probiyotik kültürünün dayanımı ile ilgili termal inaktivasyon kinetik denklemleri elde edilmiştir (Çizelge 2). Termal inaktivasyon kinetik denklemlerinden hesaplanan termal inaktivasyon parametreleri çizelge 3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Termal inaktivasyon denklemleri

Koşullar	Termal inaktivasyon kinetik denklemi*
55 °C'de % 3 aljinat	$y = -0,084t + 6,853, R^2=0,9614$
55 °C'de % 4 aljinat	$y = -0,074t + 7,008 R^2=0,9998$
55 °C'de % 3 aljinat +%1 gellan gum	$y = -0,069t + 6,920 R^2=0,9816$
55 °C'de % 3 aljinat +%1 jelatin	$y = -0,059t + 6,975 R^2=0,9977$
55 °C'de serbest kültür	$y = -0,132t + 6,585 R^2=0,8839$
60 °C'de % 3 aljinat	$y = -0,164t + 6,587, R^2=0,9221$
60 °C'de % 4 aljinat	$y = -0,142t + 6,655 R^2=0,9274$
60 °C'de % 3 aljinat +%1 gellan gum	$y = -0,136t + 6,880, R^2=0,9899$
60 °C'de % 3 aljinat +%1 jelatin	$y = -0,123t + 6,700, R^2=0,9252$
60 °C'de serbest kültür	$y = -0,122t + 6,698 R^2=0,9252$

\*D= 2,303/k ve  $t_{1/2}=0,693/k$

Çizelge 3. Termal inaktivasyon parametreleri

	55° C				60° C			
	k	$t_{1/2}$	D	R <sup>2</sup>	k	$t_{1/2}$	D	R <sup>2</sup>
Serbest kültür	0,132	5,25	17,45	0,88	0,186	3,73	12,4	0,93
%3 aljinat	0,084	8,25	27,42	0,96	0,164	4,23	14,04	0,92
%4 aljinat	0,074	9,36	31,12	0,99	0,142	4,88	16,18	0,93
%3 aljinat +%1 gellan gam	0,069	10,04	33,23	0,98	0,136	5,1	16,93	0,99
%3 aljinat+%1 jelatin	0,059	11,75	39,03	0,99	0,123	5,63	18,77	0,93

k:hız sabiti(1/dakika);  $t_{1/2}$ : yarılanma süresi(dakika); D değeri: sabit sıcaklıkta mikroorganizma sayısının % 90'ının inaktive olması için gerekli olan ısıtma süresidir.

Yukarıdaki parametrelerden k değeri; mikroorganizmaların ölüm hız değişimini ifade etmektedir. k değeri ne kadar büyük ise ölüm de o kadar çok olmaktadır (Çoksöyler 2006). Elde edilen k değerlerine bakıldığında serbest kültürün en yüksek k değerine (0,132) sahip olduğu görülmektedir. Bu durumda k değerinden de ispatlandığı üzere serbest kültürlerin ısı işlem ile ölümlerinin mikroenkapsüle kültürlerle göre daha çok oldukları görülmektedir. Kaplama materyallerinden ise elde edilen en düşük k değerine göre %3 aljinat ve % 1 jelatin ile kaplanmış olan probiyotik kültürlerin canlılıklarını daha iyi korudukları saptanmıştır. Sonuç olarak kaplanmış örneklerde serbest kültüre göre k değeri daha düşük olduğu için ölüm de daha az olmuş ve probiyotik kültürlerin canlılığı mikroenkapsülasyon işlemi ile korunmuştur.

$t_{1/2}$  değeri ise mikroorganizmaların yarılanma süresini ifade etmektedir (Baranyi ve Roberts 1994).  $t_{1/2}$  değerinden de görüldüğü üzere serbest kültürlerin yarılanma süresi kaplanmış örneklerle göre daha düşük bulunmuştur. Bu durumda mikroenkapsüle kültürleri yarılanmanın da serbest kültüre göre daha zor olduğu t değerlerinden de görülmektedir.

D değeri ise, mikroorganizmaların yüzde 90'ının inaktive olması için gerekli olan süreyi ifade etmektedir. D değerlerinden de görüldüğü üzere mikroenkapsüle kültürlerin inaktive edilmesi için daha çok süreye ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

$R^2$  değeri elde edilen D ve k değerlerine göre, yapılan işlemin ve bulunan sonuçların güvenilirliğini ifade eden bir değerdir.  $R^2$  değeri 1'e ne kadar yakın ise deneme verilerinin güvenilirliği o kadar yüksektir. Elde edilen  $R^2$  değerlerine bakıldığında sonuçların güvenilirliğinin genelde yüksek olduğu görülmektedir (Baranyi ve Roberts 1994). Bu da denememizde elde edilen sonuçların tutarlı olduğunu göstermektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda, 55, 60 ve 65 °C sıcaklıklarda 15-60 dakika arasında ısıya maruz bırakılan *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium lactis* types B1 O4 ve *Bifidobacterium lactis* gibi probiyotik bakterilere uygulanan mikroenkapsülasyon işleminin hücrelerin ısı toleranslarını arttırdığı tespit edilmiştir (Freire ve ark. 2013, Ding ve Shah 2007). Çalışmamızda elde edilen termal inaktivasyon parametreleri bu literatür bilgilerini doğrulamıştır. Nitekim çalışmamızda serbest kültürlerin yarılanma sürelerinin daha düşük olması ve inaktivasyon oranlarının daha yüksek olması mikroenkapsülasyonun hücre dayanımını arttırmada avantajlı bir işlem olduğunu desteklemiştir.

Özetle sonuçlarımızdan da görüldüğü üzere mikroenkapsülasyon işlemi serbest kültüre göre hücre dayanımını arttırmış, ancak sayıları probiyotik gıdalarda olması gereken mikroorganizma sayısının altına düşmüştür. Dolayısı ile bu ısıl işlemde sonra gıda probiyotik özelliğini kaybetmiştir. Isıl işlem uygulanacak gıdalarda işlemde kaynaklı hücre kayıpları da göz önünde bulundurularak, daha yoğun konsantrasyonda probiyotik kültür içeren kapsüllerin kullanılması uygun bulunmaktadır (Al-Furaih et al., 2016). Nitekim sonuçlarımıza baktığımızda uygulanan ısıl işleme ve kaplama materyali kombinasyonuna göre canlı hücre konsantrasyonunda yaklaşık 1-5 log kob/mL arasında düşüş gözlenmiştir. Bu yüzden kapsüllerde ısıl işlemde sonra gerçekleşecek düşüşte bile probiyotik özelliğini yitirmeyecek düzeyde probiyotik kültür ilavesi ile üretime başlanmalıdır.

#### 4. SONUÇ

Probiyotik kültürlerin canlılıklarının stres yaratıcı faktörlere yani gıdaların sahip oldukları içeriğe veya üretimleri sırasında uygulanan işlem koşullarına göre değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Probiyotiklerin canlılıklarını korumaları açısından, gıdalarda stres yaratıcı faktörlerin canlılık üzerindeki etkilerinin öncelikle *in vitro* olarak belirlenmesi gerekmektedir. *In vitro* koşullarda elde edilen sonuçların kinetik denklemlerle ifadesinin ise farklı koşullarda hangi sonuçların çıkacağı tahmin edilmesi açısından yararlı olacağı bildirilmiştir. Çalışmamızda mikroenkapsülasyon işlemi serbest kültüre göre hücre dayanımını arttırmış, ancak sayıları probiyotik gıdalarda olması gereken mikroorganizma sayısının altına düşmüştür. Dolayısıyla bu ısıl işlemde sonra gıda probiyotik özelliğini kaybedecektir. Bu bakımdan ısıl işlem uygulanacak probiyotik gıdalarda ısıl işlem sonunda yaşanacak kaybın göz önünde bulundurularak başlangıçta yüksek konsantrasyonlarda probiyotik ilavesi gerekmektedir. İlave edilecek probiyotik kültür miktarı ise, ısıl işlemin hücre sayısı üzerindeki etki düzeyinin kinetik denklemlerle saptanması ile mümkün olacaktır. Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen kinetik denklemler ile *L. rhamnosus*'un farklı sıcaklık ve süre koşullarından etkilenme durumlarının tahmin edilmesi mümkün olmuştur. Ancak tahmin oranının yükseltilmesi için, elde edilen sonuçlarla da yetinilmemeli çok daha farklı sıcaklık ve sürelerde yani geniş aralıktaki faktörlerde de canlılık dayanımları belirlenmeli ve daha ayrıntılı değerler (Z ve F değerleri gibi) hesaplanmalıdır.

## 5. KAYNAKLAR

- Al-Furaih, L.Y., Ababutain, I.M., Abd-El-Khalek, A.B., and Abdel-Salam, A.M., 2016. Effect of different microencapsulation materials on stability of *Lactobacillus plantarum* DSM 20174. *African Journal of Biotechnology*, 15(24), 1207-1216.
- Annan, N.T, Borza, A.D. and Hansen, L.T., 2008. Encapsulation in Alginate-Coated Gelatin Microspheres Improves Survival of The Probiotic *Bifidobacterium Adolescentis* 15703t During Exposure To Simulated Gastro-Intestinal Conditions. *Food Res Int*, 41, 184–193.
- Anal, A.K. and Singh, H., 2007. Recent Advances in Microencapsulation of Probiotics for Industrial Applications and Targeted Delivery. *Trends Food Science And Technology* 18 (5), 240–251.
- Argin, S., 2007. Microencapsulation of Probiotic Bacteria in Xanthan-Chitosan Polyelectrolyte Complex Gels. Ph. D. Dissertation, University of Maryland, College Park, Amerika, 70p.
- Babu, G., and Nithyalakshmi, V., 2011. Influence of Prebiotic Composition on Probiotic Survivability in Calcium Alginate Coated Synbiotic Microcapsules at Thermal Incubation. *Agricultural Journal*, 6(5): 231-236.
- Baranyi, J. and Roberts, TA., 1994. A Dynamic Approach to Predicting Bacterial Growth in Food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3-4): 277-294.
- Chen, M., Chen, K. and Kuo, Y., 2007. Optimal Thermotolerance of *Bifidobacterium Bifidum* In Gellan–Alginate Microparticles, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 98, No. 2.
- Çoksöyler, N., 2006 Gıdalarda Mikroorganizmaların İnaktivasyonunun Modellenmesi, Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- De Vuyst, L., Falony G. and Leroy F., 2008. Probiotics in Fermented Sausages. *Meat Sci*, 80, 75–78.
- Ding, W.K. and Shah, N.P., 2007. Acid, Bile, And Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria. *Journal of Food Science* 72 (9), M446–M450.
- Felicioa, M.T.S., Ramalheirab, R., Ferreirab, V., Brandãob, T., Silvab, J., Hoggb, T. and Teixeiraa, P., 2011. Thermal Inactivation of *Listeria Monocytogenes* from Alheiras, Traditional Portuguese Sausage During Cooking. *Food Control*, 22(12):1960-1964.
- Freire, C.B.F., Prudêncio, E.S., Pinto S.S., Muñoz I.B. and Amboni R.D.M.C., 2013. Effect of Microencapsulation on Survival of *Bifidobacterium* Bb-12 Exposed to Simulated Gastrointestinal Conditions And Heat Treatments. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1):39-44.
- Gbassi, G.K., Vandamme, T., Ennahar, S. and Marchioni, E., 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus Plantarum* Spp in An Alginate Matrix Coated With Whey Proteins. *Int J Food Microbiol*, 129, 103–105.
- Giovanna E.F. and Dellaglio, F., 2005. Taxonomy of *Lactobacilli* And *Bifidobacteria*. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* 8: 44–61.
- Gouin S., 2004. Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies And Trends. *Trends Food Sci Tech*, 15, 330–347.
- Harrigan, W.F., 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology* (3.Edition), Academic Press Ltd., Usa.
- Heidebach, T., Först, P. and Kulozik, U., 2009a. Transglutaminase-Induced Caseinate Gelation For The Microencapsulation of Probiotic Cells. *Int Dairy J*, 19, 77–84.
- Heidebach, T., Först, P. and Kulozik, U., 2009b. Microencapsulation of Probiotic Cells by Means of Rennet-Gelation of Milk Proteins. *Food Hydrocolloids*, 23, 1670–1677.

- Hsieh, Y.P. and Ofori, J.A., 2007. Innovations in Food Technology for Health. *Asia Pac J Clin Nutr*, 16 (1), 65-73.
- Knorr, D., 1998. Technology Aspects Related To Microorganisms in Functional Foods. *Trends Food Sci Tech*, 9, 295-306.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H., 2004. The Influence of Coating Materials On Some Properties of Alginate Beads And Survivability of Microencapsulated Probiotic Bacteria. *Int Dairy J*, 14, 737–743.
- Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhliid, R., And Ananta, E., 2012. Science and Technology For The Mastership Of Probiotic Applications in Food Products. *Journal of Biotechnology*, in Press.
- Mattila-Sandholm, T., Arinena, P.M., Crittenden, R., Mogensen, A.G., Fond, R. and Saarela, M., 2002. Technological Challenges for Future Probiotic Foods. *Int Dairy J*, 12, 173–182.
- Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Najafi M.B.H. and Shahidi, F., 2009. The Influence of Multi Stage Alginate Coating on Survivability of Potential Probiotic Bacteria in Simulated Gastric and Intestinal Juice. *Food Res Int*, 42, 1040–1045.
- Mosilhey, S.H., 2003. Influence of Different Capsule Materials on The Physiological Properties of Microencapsulated *Lactobacillus Acidophilus*. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Institut Für Lebensmitteltechnologie, Doctor-Ingenieur, El-Beheira, Agypten, 154p.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A. and Orlando, P., 2009. Fermentative Ability of Alginate-Prebiotic Encapsulated *Lactobacillus Acidophilus* and Survival Under Simulated Gastrointestinal Conditions. *Journal of Functional Foods*, 1, 319–323.
- Nivolieza, A., Camares, O., Paquet-Gachinat, M., Bornes, S., Forestier, C. and Veisseire, P., 2012. Influence of Manufacturing Processes on in Vitro Properties of The Probiotic Strain *Lactobacillus Rhammosus* Lcr35. *Journal of Biotechnology*, 160, 236– 241.
- Oğuzhan, P. and Yangılar, F., 2013. Gıdalarda Mikroorganizma İnaktivasyonunun Modellemesi Ve Uygulaması. *Journal of Tekirdağ Agricultural Faculty*, 10(3): 54-58.
- Özer, B., Kırmacı, H.A., Şenel, E., Atamer, M. ve Hayaloğlu, A., 2009. Improving The Viability of *Bifidobacterium Bifidum* Bb-12 and *Lactobacillus Acidophilus* La-5 in White-Brined Cheese By Microencapsulation. *Int Dairy J*, 19, 22–29.
- Papagianni, M. and Anastasiadou, S., 2009. Encapsulation of *Pediococcus Acidilactici* Cells in Corn and Olive Oil Microcapsules Emulsified by Peptides and Stabilized With Xanthan in Oil-İn-Water Emulsions: Studies on Cell Viability Under Gastro-İntestinal Simulating Conditions. *Enzyme Microb Tech*, 45, 514–522.
- Pelto, L., Isolauri, E., Lilius, E.M., Nuutila, J. and Salminen, S., 1998. Probiotic Bacteria Down-Regulate The Milk-İnduced Inflammatory Response in Milk-Hypersensitive Subjects but Have An Immunostimulatory Effect in Healthy Subjects. *Clin Exp Allergy*, 28:1474–1479.
- Parvez, S., Malik, K.A.S., Kang, A.H. and Kim, H.Y., 2006 . Probiotics and Their Fermented Food Products Are Beneficial for Health. *Journal of Applied Microbiology* Issn 1364-5072 .
- Ouwehand, A.C. and Isolauri, S.S.E., 2002. Probiotics: An Overview of Beneficial Effects. *A Van Leeuw J Microb*, 82, 279–289.
- Qi, W.T., Maj Yu, W.T., Xie, Y.B., Wang, W. and Ma, X., 2006. Behavior of Microbial Growth And Metabolism in Alginate–Chitosan–Alginate (Aca) Microcapsules. *Enzyme Microb Tech*, 38, 697–704.



Sanchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P. and Margolles, A., 2012. Toward Improving Technological and Functional Properties of Probiotics in Foods. *Trends in Food Science & Technology* 26, 56-63.

Teoh, P.L., Mirhosseini, S.H., Mustafa, S. and Manap, M.Y.Z., 2011. Tolerance of Free and Encapsulated Probiotics Towards Heat Treatment and High Sodium Concentration. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.9 (1):69-73.

Tırnaksız, F., 2009. Modern Farmasötik Teknoloji: Sterilizasyon. *Teb Eczacılık Akademisi Yayını*. 63-89.

Vasiljevic, T. and Shah, N.P., 2008. Probiotics—From Metchnikoff To Bioactives. *Int Dairy J*, 18, 714–728.