BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN KEÇİBOYNUZU UNU İLE ENKAPSÜLASYONU

Elif TÜLEK

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN KEÇİBOYNUZU UNU İLE ENKAPSÜLASYONU

Elif TÜLEK
0009-0006-9844-3353

Prof. Dr. Saliha ŞAHİN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
KEÇİBOYNUZU UNU İLE ENKAPSÜLASYONU

Elif TÜLEK

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Probiyotik bakterilerin konakçı sağlığı üzerine faydalı etkiler gösterebilmeleri için gıda üretimi, depolanması ve tüketimi sonrası gastrointestinal sindirim sisteminde canlılıklarını yüksek oranda koruyabilmeleri gerekmektedir. Bunun için de probiyotik bakterilerin özellikle prebiyotik özellikteki maddelerle enkapsüle edilmesi önemlidir. Bu çalışmada öncelikle keçiboynuzu ununun (*Ceratonia siliqua* L.) fenolik bileşik içeriği, antioksidan özelliği ve fizikokimyasal içeriği (toplam şeker, toplam yağ, toplam protein, toplam diyet lif, kuru madde, nem, titre edilebilir asitlik ve kül) belirlenerek kaplama materyali olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Keçiboynuzu ununun yüksek fenolik bileşik içeriğinin yanı sıra %35,3±1,35 diyet lifi içeriği ile fonksiyonel bir kaplama materyali olarak seçilmesinin uygun olduğu ortaya koyulmuştur. *Lacticaseibacillus rhamnosus* ve *Lacticaseibacillus paracasei* probiyotik bakterileri potansiyel olarak prebiyotik özellikteki keçiboynuzu unu ile emülsiyon yöntemi kullanılarak enkapsüle edilmiştir. Her iki bakteri için enkapsülasyon koşulları Box-Behnken Dizayn ile kemometrik olarak optimize edilmiştir. *L. rhamnosus* ve *L. paracasei* kapsüllerinin enkapsülasyon verimleri sırasıyla %79,51±0,36 ve %74,98±0,20 olarak belirlenmiştir. Hazırlanan probiyotik bakteri kapsüllerinin yapı karakterizasyonları FTIR ve SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Serbest ve enkapsüle edilmiş probiyotik bakterilerin, +24°C, +4°C ve -24°C'de 28 günlük depolama sürecindeki canlılıkları incelenmiş ve kapsüllerin bakteri canlılıklarının +4°C ve -24°C'de önemli ölçüde korunduğu tespit edilmiştir. *In vitro* gastrointestinal sindirim sürecinde ise kapsüllerin serbest probiyotik bakterilere göre sindirim koşullarına karşı daha dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak keçiboynuzu unu-probiyotik bakteri kapsüllerinin fonksiyonel gıda ürünlerinde kullanımı sağlanarak hem insan sağlığına hem de gıda endüstrisine katkı sağlanabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *Ceratonia siliqua* L., enkapsülasyon, optimizasyon

2025, x + 109 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

ENCAPSULATION OF SOME LACTIC ACID BACTERIA WITH CAROB FLOUR

Elif TÜLEK

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

For probiotic bacteria to exert beneficial effects on host health, they must be able to maintain high levels of viability in the gastrointestinal digestive system after food production, storage, and consumption. For this purpose, it is important to encapsulate probiotic bacteria, especially with prebiotic substances. In this study, the phenolic compound content, antioxidant properties, and physicochemical content (total sugars, total fat, total protein, total dietary fiber, dry matter, moisture, titratable acidity, and ash) of carob flour (*Ceratonia siliqua* L.) were determined, and its usability as a coating material was investigated. It was found that carob flour, with its high phenolic compounds and dietary fiber content of 35.3±1.35%, is suitable to be selected as a functional coating material. The probiotic bacteria *Lacticaseibacillus rhamnosus* and *Lacticaseibacillus paracasei* were encapsulated by the emulsion method with carob flour, potentially prebiotic. The encapsulation conditions for both bacteria were chemometrically optimized using the Box-Behnken Design. The encapsulation efficiencies of *L. rhamnosus* and *L. paracasei* capsules were determined to be 79.51±0.36% and 74.98±0.20%, respectively. The structural characterization of the prepared probiotic bacterial capsules was carried out using FTIR and SEM analyses. The viability of free and encapsulated probiotic bacteria was analyzed at +24°C, +4°C, and -24°C during 28 days of storage, and it was found that the bacterial viability of the capsules was significantly preserved at +4°C and -24°C. *In vitro* gastrointestinal digestion showed that the capsules were more resistant to digestive conditions than free probiotic bacteria. As a result, it is predicted that carob flour-probiotic bacteria capsules can be used in functional food products and contribute to both human health and the food industry.

Key words: *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *Ceratonia siliqua* L, encapsulation, optimization

2025, x + 109 pages.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm süreçlerine bilgi, destek ve rehberlikleriyle ışık tutan; akademik rehberliğinin ötesinde, cesaretlendirici sözleri ve sabırlı yaklaşımıyla bana katkı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Saliha ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve çalışmamın ilerlemesine destek veren değerli hocalarım Doç. Dr. Önder AYBASTIER ve Doç. Dr. Aslı GÖÇENOĞLU SARIKAYA'ya teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında bana daima yardımcı olan, fikirleriyle yön veren ve çalışma ortamımı keyifli hale getiren değerli hocam Dr. Büşra KARKAR ve değerli arkadaşlarım Yüksek Kimyager İlkyaz PATIR ÇELİK, Yüksek Kimyager Gizem BAYAÇLI UYGUN, Yüksek Kimyager Serenay EYÜBOĞLU, Açelya AKLAN, Gamze YILDIZ ve Melike GÜR'e teşekkür ederim.

Yakın veya uzak fark etmeksizin manevi destekleri, samimiyetleri ve içten dostluklarıyla yanımda olan sevgili arkadaşlarım Sevde KUREYŞ, Merve ADSOY ve Duygu ULU'ya teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana koşulsuz sevgi, sabır ve destek veren canım annem Ayşe TÜLEK, babam Şevket TÜLEK ve abim Furkan TÜLEK'e teşekkür ederim.

Bana olan sevgisi, inancı ve desteğiyle her zaman yanımda olan ve bu zorlu yolculukta bana her daim güç veren nişanlım Gökmen KESEN'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı FGA-2023-1272 numaralı proje kapsamında destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Elif TÜLEK
24/02/2025

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. Probiyotikler 3
2.2. Laktik asit bakterileri (LAB) 4
2.2.1. *Lacticaseibacillus rhamnosus* 5
2.2.2. *Lacticaseibacillus paracasei* 5
2.3. Enkapsülasyon 7
2.3.1. Sprey kurutma yöntemi 9
2.3.2. Dondurarak kurutma yöntemi 10
2.3.3. Ekstrüzyon yöntemi 10
2.3.4. Emülsiyon yöntemi 11
2.4. Probiyotik bakteri enkapsülasyonu 13
2.5. Prebiyotikler 17
2.5.1. Fenolik bileşikler 18
2.5.2. Diyet lifleri 19
2.6. Sinbiyotikler 19
2.7. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) 20
3. MATERYAL ve YÖNTEM 24
3.1. Materyal 24
3.1.1. Keçiboynuzu unu (KBU) 24
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar 24
3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar 27
3.1.4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler 28
3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltiler 29
3.2. Yöntem 31
3.2.1. KBU ekstraksiyonu 31
3.2.2. KBU ekstraktlarının spektroskopik analizleri 33
3.2.3. KBU ekstraktlarının kromatografik analizi 35
3.2.4. KBU sterilizasyonu 35
3.2.5. Probiyotik bakterilerin geliştirilmesi ve aktive edilmesi 36
3.2.6. Probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonu 38
3.2.7. Probiyotik bakterilerin mikrobiyolojik analizi 40
3.2.8. Enkapsülasyon koşullarının optimizasyonu 42
3.2.9. KBU ve KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin fizikokimyasal analizleri 44
3.2.10. KBU ve KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin karakterizasyonu 44
3.2.11. Probiyotik bakterilerin *in vitro* gastrointestinal sindirimdeki canlılıkları 44
3.2.12. Probiyotik bakterilerin depolama koşullarındaki canlılıkları 48
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 49
4.1. Spektroskopik Bulgular 49
4.2. Kromatografik Bulgular 52

4.3. Probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonunun optimizasyonu 59
4.4. KBU ile KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin fizikokimyasal özellikleri 70
4.5. KBU ile KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin karakterizasyonu 73
4.6. *In vitro* gastrointestinal sindirimde LR ve LPC probiyotik bakterilerinin canlılıkları 81
4.7. Depolama koşullarında LR ve LPC probiyotik bakterilerinin canlılıkları 88
5. SONUÇ 96
KAYNAKLAR 98
ÖZGEÇMİŞ 108

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
A	Absorbans
β	Beta
dk	Dakika
rpm	Dakikadaki devir sayısı
cm^{-1}	Dalga sayısı
T	Geçirgenlik
g	Gram
v/v	Hacim/hacim
kg	Kilogram
kcal	Kilokalori
kob	Koloni oluşturan birim
R^2	Korelasyon katsayısı
w/v	Kütle/hacim
L	Litre
log	Logaritma
m	Metre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mbar	Milibar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mAU	Milli absorbans birimi
ppm	Milyonda bir kısım
M	Molarite
nm	Nanometre
N	Normalite
sa	Saat
s	Saniye
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
%	Yüzde

Kısaltmalar	**Açıklama**
ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
APİ	Apigenin
AH	Asidik hidroliz
BBD	Box-Behnken Dizayn
Ç	Çözücü

MRS	De Man Rogosa ve Sharpe
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
EPGCG	Epigallokateşin gallat
EPCG	Epikateşin gallat
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GA	Gallik asit
GAE	Gallik asit eşdeğeri
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
HYP	Hiperozid
CE	Kateşin eşdeğeri
KBU	Keçiboynuzu unu
KBU-LPC	Keçiboynuzu unu-*L. paracasei*
KBU-LR	Keçiboynuzu unu-*L. rhamnosus*
QE	Kuersetin eşdeğeri
QU	Kuersitrin
LPC	*L. paracasei*
LR	*L. rhamnosus*
LABIP	Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu
LAB	Laktik asit bakterileri
NH	Neohesperidin
SIF	Simüle bağırsak sıvısı
SGF	Simüle mide sıvısı
SA	Siringik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
LOQ	Tayin sınırı
te	Tespit edilemedi
LOD	Tespit sınırı
TCA	*trans*-sinnamik asit
TE	Troloks eşdeğeri
UV-GB	Ultraviyole/Görünür bölge
ISAPP	Uluslararası Probiyotik ve Prebiyotik Bilimsel Derneği
ANOVA	Varyans analizi
RSM	Yanıt yüzey yöntemi
HPLC-DAD	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diod serili dedektör

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Enkapsülasyon işlemi…….....	7
Şekil 2.2.	Emülsiyon yönteminin şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.3.	Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) ağacı…….	20
Şekil 2.4.	Keçiboynuzu meyvesi ve temel bileşenleri..…….	21
Şekil 2.5.	Gallik asidin kimyasal yapısı …….....	22
Şekil 3.1.	KBU'nun çözücü ekstraksiyonunun şematik gösterimi……..	32
Şekil 3.2.	KBU'nun asidik hidroliz içeren çözücü ekstraksiyonunun şematik gösterimi.....	32
Şekil 3.3.	Probiyotik bakterilerin geliştirilmesi ve aktive edilmesi……	37
Şekil 3.4.	Probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonu……...	39
Şekil 3.5.	Probiyotik bakterilerin mikrobiyolojik analizi……...	41
Şekil 3.6.	SGF ortamında sindirimin analiz şeması …….....	45
Şekil 3.7.	SIF ortamında sindirimin analiz şeması …….....	46
Şekil 3.8.	Ardışık olarak SGF ve SIF ortamında sindirimin analiz şeması....	47
Şekil 4.1.	KBU'nun çözücü ekstraktının kromatogramı (280 nm)…….	56
Şekil 4.2	KBU'nun asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktının kromatogramı (280 nm)…….	57
Şekil 4.3.	LR probiyotik bakterisinin KBU ile enkapsülasyonu için üç boyutlu yanıt-yüzey grafikleri. A) Karıştırma zamanı ve karıştırma sıcaklığının enkapsülasyon verimine etkisi B) KBU miktarı ve karıştırma sıcaklığının enkapsülasyon verimine etkisi.....	64
Şekil 4.4.	LPC probiyotik bakterisinin KBU ile enkapsülasyonu için üç boyutlu yanıt-yüzey grafikleri. A) Karıştırma zamanı ve karıştırma sıcaklığının enkapsülasyon verimine etkisi B) KBU miktarı ve karıştırma zamanının enkapsülasyon verimine etkisi.....…….....	66
Şekil 4.5.	FTIR spektrumları. A) Pektin B) Sterilize edilmiş KBU C) KBU D) KBU-LPC kapsülü E) KBU-LR kapsülü.....	75
Şekil 4.6.	KBU SEM görüntüleri. A) 2000X büyütme B) 3000X büyütme C) 5000X büyütme.....	77
Şekil 4.7.	Sterilize edilmiş KBU SEM görüntüleri. A) 2000X büyütme B) 3000X büyütme C) 5000X büyütme.....	78
Şekil 4.8.	KBU-LR kapsülü SEM görüntüleri. A) 2000X büyütme B) 3000X büyütme C) 5000X büyütme.....	79
Şekil 4.9.	KBU-LPC kapsülü SEM görüntüleri. A) 2000X büyütme B) 3000X büyütme C) 5000X büyütme.....	80
Şekil 4.10.	*In vitro* gastrointestinal sindirimin LR canlılığına etkisi. A) SGF ortamı B) SIF ortamı C) Ardışık olarak SGF ve SIF ortamı.....	85
Şekil 4.11.	*In vitro* gastrointestinal sindirimin LPC canlılığına etkisi. A) SGF ortamı B) SIF ortamı C) Ardışık olarak SGF ve SIF ortamı.....	86

Şekil 4.12. Depolama süresinin ve farklı sıcaklıkların LR canlılığına etkisi. A) +24°C B) +4°C C) -24°C……... 92
Şekil 4.13. Depolama süresinin ve farklı sıcaklıkların LPC canlılığına etkisi. A) +24°C B) +4°C C) -24°C……... 93

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.1.	*L. rhamnosus* ve *L. paracasei* probiyotik bakterilerinin özellikleri……..	6
Çizelge 2.2	Probiyotik bakteri enkapsülasyon yöntemleri.....	14
Çizelge 2.3.	Probiyotik bakteri enkapsülasyonuna ait çalışmalar……..……	15
Çizelge 2.4.	Keçiboynuzu ununun besinsel özellikleri……..……..…….	21
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları……..	24
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (devam)……	25
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (devam)……	26
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan kimyasallar……..……..…….....	27
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan kimyasallar (devam) ……..……..……..	28
Çizelge 3.3.	Çalışmada kullanılan sarf malzemeler……..……..……..	28
Çizelge 3.4.	Analizlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları…….....	29
Çizelge 3.4.	Analizlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları (devam) ……...	30
Çizelge 3.5.	HPLC-DAD gradient hareketli faz programı……..……..…	35
Çizelge 3.6.	BBD için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri……..……..	42
Çizelge 3.7.	BBD çizelgesi……..……..……..…….....	43
Çizelge 4.1.	Spektroskopik yöntemler için kalibrasyon verileri……..……..	49
Çizelge 4.2.	KBU ekstraktlarının spektroskopik analiz sonuçları……..…...	50
Çizelge 4.3.	Fenolik bileşiklerin HPLC-DAD validasyon parametreleri….....	53
Çizelge 4.4.	KBU ekstraktlarının fenolik bileşik içeriği (mg/g KBU).……...	55
Çizelge 4.5.	ANOVA analizi sonuçları……..……..……..…….	61
Çizelge 4.6.	LR ve LPC probiyotik bakterilerinin ikinci dereceden polinom denklemleri……..……..……..…….....	62
Çizelge 4.7.	LR ve LPC probiyotik bakterilerinin tahmini ve deneysel enkapsülasyon verimi.....…….....	63
Çizelge 4.8.	Optimum koşullar ve optimum koşullarda belirlenen tahmini ve deneysel enkapsülasyon verimi.....	68
Çizelge 4.9.	KBU ile KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin fizikokimyasal özellikleri	72
Çizelge 4.10.	LR ve LPC probiyotik bakterilerinin *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrası belirlenen canlı hücre sayısı.....	83
Çizelge 4.11.	LR ve LPC probiyotik bakterilerinin *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrası belirlenen canlılığı (%).....	84
Çizelge 4.12.	LR ve LPC probiyotik bakterilerinin depolama sonrası belirlenen canlı hücre sayısı.....	90
Çizelge 4.13.	LR ve LPC probiyotik bakterilerinin depolama sonrası belirlenen canlılığı (%).....	91

1. GİRİŞ

Probiyotikler "yeterli miktarda alındığında konakçı sağlığı üzerine olumlu etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmaktadır (Markowiak ve Slizewska, 2017; Bilginer ve Çetin, 2019). Gıda fermentasyonunda yaygın olarak kullanılan ve fermentasyon süreçleri sayesinde ürünlerin duyusal özelliklerini ve kalitesini artıran *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri sağlık üzerinde çeşitli etkilerle önemli bir rol oynayan ve yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır (Ayivi ve diğerleri, 2020; Zheng ve diğerleri, 2020; Latif ve diğerleri, 2023). Alerjik hastalıklar, kanser, hiperkolesterolemi, laktoz intoleransı, inflamatuar bağırsak hastalıkları, ishal ve huzursuz bağırsak sendromu gibi sağlık sorunlarının önlenmesi ve yönetimindeki faydaları sayesinde, tüketicilerin probiyotik içeren ürünlere olan ilgisi artmıştır (Grom ve diğerleri, 2020).

Enkapsülasyon, katı, sıvı veya gaz haldeki gıda bileşenleri, enzim, hücre ve diğer mikroorganizmaların protein, karbohidrat veya lipit esaslı bir kaplama materyaliyle kaplanması ya da kaplama materyalinin içine hapsedilmesi prensibine dayalı bir yöntemdir (Gökmen ve diğerleri, 2012; Serna-Cock ve Vallejo-Castillo, 2013; Chawda ve diğerleri, 2017; Roshanzamir ve diğerleri, 2017). Bu yöntem oksijen, yüksek sıcaklık, düşük pH, sindirim enzimleri ve safra tuzları gibi olumsuz faktörler nedeniyle probiyotik bakterilerin işleme ve depolama gibi süreçlerde dayanıklı hale gelmesini sağlamak ve gastrointestinal sistemden geçerken canlılıklarını korumak amacıyla son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Luo ve diğerleri, 2022).

Prebiyotikler, "konağın bağırsak mikrobiyotasındaki mikroorganizmaların seçici olarak kullandığı ve sağlık üzerinde olumlu etkileri bulunan substratlar" olarak tanımlanmaktadır. Karbohidratlar en çok bilinen prebiyotikler olmasına rağmen, literatürde mineraller, polifenoller ve yağ asitleri gibi karbohidrat olmayan bileşenlerin prebiyotik potansiyeline dair umut verici sonuçlar içeren çalışmalar bulmak mümkündür (Ferreira ve diğerleri, 2023). Prebiyotikler sindirilmeksizin kalın bağırsağa ulaşarak, probiyotiklerin gelişimini ve aktivitelerini destekler. Probiyotik ve prebiyotiklerin birlikte kullanıldığı sinerjik etkileşim, sinbiyotik olarak adlandırılır. Sinbiyotikler, ürün

stabilitesini artırmada avantaj sağlayarak sindirim sistemini daha sağlıklı hale getirir. Sinbiyotiklerin alımı, çiğ sebzeler, meyveler, fermente gıdalar veya süt ürünleri gibi doğal kaynaklardan sağlanabileceği gibi, farmasötik ürünler ve fonksiyonel gıdalardan da temin edilebilir (Pandey ve diğerleri, 2015; Markowiak ve Śliżewska, 2017).

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.), *Leguminoseae* (*Fabaceae*) familyasının bir üyesi olup, Akdeniz ve Ege bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen bir bitkidir (Petkova ve diğerleri, 2017; Pazır ve Alper, 2018). Keçiboynuzu meyvesi yüksek şeker, diyet lif, fenolik bileşik ve mineral içeriği nedeniyle sağlık açısından çok değerli bir besin kaynağıdır. Keçiboynuzu ununun gıdalarda doğal bir tatlandırıcı olarak kullanılmasının yanı sıra, yüksek miktarda çözünmeyen diyet lif içeriği ve antioksidan aktivitesi ile potansiyel prebiyotik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Fadel ve diğerleri, 2006; Durazzo ve diğerleri, 2014; El Batal ve diğerleri 2016; Petkova ve diğerleri, 2017; Arab ve diğerleri, 2022; Ziar ve diğerleri, 2022).

Bu çalışmada fonksiyonel gıdalarda kullanılabilecek olan probiyotik bakteri kapsüllerinin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için probiyotik bakteriler potansiyel olarak prebiyotik özelliğe sahip olan keçiboynuzu unu ile enkapsüle edilerek depolama şartları ve sindirim süreçlerinde bakteri canlılıklarının arttırılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda keçiboynuzu ununun fenolik bileşik içeriği ve antioksidan özellikleri belirlenerek fizikokimyasal özellikleri değerlendirilmiş ve enkapsülasyonun keçiboynuzunun fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen probiyotik bakteri kapsüllerinin depolama ve *in vitro* gastrointestinal sindirimde canlılıkları incelenerek serbest probiyotik bakterilere göre üstünlükleri ortaya koyulmuştur.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Probiyotikler

Probiyotik terimi Yunanca kökenlidir ve "yaşam için" anlamına gelir. Probiyotikler, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Uluslararası Probiyotik ve Prebiyotik Bilimsel Derneği (ISAPP) tarafından, "yeterli miktarda alındığında, konakçının sağlığı üzerinde olumlu etkiler yaratan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmaktadır (Markowiak ve Slizewska, 2017; Bilginer ve Çetin, 2019). Probiyotik bir mikroorganizmanın tanımlanması için gerekli kriterler, Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu (LABIP) tarafından belirlenmiştir (Uymaz, 2010). Probiyotik potansiyeli taşıyan mikroorganizmalar;

- Patojenik özellik taşımamalıdır.
- Bağırsak epitel hücrelerine bağlanabilme yeteneğine sahip olmalıdır.
- Mide asidi ve safra tuzlarına karşı dayanıklılık göstererek gastrointestinal sistemde varlığını sürdürebilmelidir.
- Antimikrobiyal bileşikler üreterek zararlı mikroorganizmaların gelişimini engelleyebilmelidir.
- Bağışıklık sistemini uyarıcı etkiler gösterebilmelidir.
- Kolesterol azaltımı, laktaz aktivitesini artırma veya vitamin üretimi gibi faydalı metabolik işlevler gerçekleştirebilmelidir.
- Üretim ve depolama gibi teknolojik süreçlerde dayanıklılığını koruyabilmelidir.

Probiyotikler, alerjik hastalıklar, kanser, hiperkolesterolemi, laktoz intoleransı, inflamatuar bağırsak hastalıkları, ishal ve huzursuz bağırsak sendromu gibi çeşitli sağlık sorunlarının önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Artan farkındalık ve bilimsel kanıtlar, tüketicilerin probiyotik içeren ürünlere olan ilgisini artırmıştır. Yoğurt, süt tozu, fermente tatlılar, peynir, dondurma, tahıllar ve meyve suları gibi birçok gıda probiyotiklerle zenginleştirilmekte ve probiyotik bakterilerle üretilen preparatların kullanımı giderek artış göstermektedir (Uymaz, 2010; Grom ve diğerleri, 2020). Genellikle probiyotik ürünlerde bakteri canlılığının 10^6-10^7 kob/mL-g düzeyinde olması,

günlük tüketimle ise 10^6-10^9 kob/g probiyotik alınması önerilmektedir. Bu canlılık, hem insan vücudu için yararlı etkide olabilmeleri hem de eklendikleri gıdaların üretim ve depolama süreçlerinde hayatta kalmaları için önemli kabul edilmektedir. (Gismondo ve diğerleri, 1999; Bilginer ve Çetin, 2019). *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri sağlık üzerinde çeşitli etkilerle önemli bir rol oynayan ve yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır (Uymaz, 2010; Latif ve diğerleri, 2023).

2.2. Laktik asit bakterileri (LAB)

LAB, gram-pozitif, spor üretmeyen, oksijenli solunum yapmayan ancak oksijene toleranslı bakterilerdir ve fermentasyon sırasında karbohidratları kullanarak laktik asidi ana fermentasyon ürünü olarak üretirler (Capurso, 2019; Zheng ve diğerleri, 2020). Tarım, gıda ve klinik sektörlerde önemli bir yere sahip olan bu bakteriler, özellikle gıda fermentasyonunda yaygın olarak kullanılmakta ve fermentasyon süreçleri sayesinde ürünlerin duyusal özelliklerini ve kalitesini artırmaktadır. Sadece fermente gıda üretiminde değil, aynı zamanda sağlık alanında sundukları faydalarla dikkat çeken bazı LAB'ler, probiyotik olarak sınıflandırılmaktadır (Ayivi ve diğerleri, 2020; Zheng ve diğerleri, 2020).

Orla-Jensen (1919), laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasına yönelik temel bir monograf yayımlamış ve bu sistem; glikoz fermentasyonu, hücre morfolojisi, şeker kullanım kapasitesi ve optimum gelişme sıcaklığı gibi faktörlere dayanarak *Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc* ve *Streptococcus* olmak üzere dört cinsi tanımlamıştır. LAB, şekerleri fermente ederek asit üretim özelliklerine ve belirli sıcaklıklarda gelişme kapasitelerine göre farklı cinslere/türlere göre sınıflandırılmıştır. Ayrıca karbohidratları fermente etme yeteneklerine göre homofermentatif (örneğin, *Lactococcus* ve *Streptococcus* türleri, bir glikozdan iki molekül laktat üretir) veya heterofermentatif (örneğin, *Leuconostoc, Wiessella* ve bazı *Lactobacillus* türleri, laktat, etanol ve karbondioksit üretir) olarak ayrılabilmektedir. Geleneksel sınıflandırma, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere dayanırken, günümüzde moleküler karakterizasyon daha önemli bir sınıflandırma aracı olmuştur. Moleküler yöntemler arasında rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA, 16S rRNA gen sekanslaması,

polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı parmak izi analizi ve çoklu PCR yöntemleri yer almaktadır (Ayivi ve diğerleri, 2020).

Lactobacillus cinsi, çeşitliliği nedeniyle 25 cins olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Zheng ve diğerleri, 2020): *Lactobacillus, Paralactobacillus, Lacticaseibacillus, Loigolactobacilus, Lactiplantibacillus, Limosilactobacillus, Lentilactobacillus, Lapidilactobacillus, Ligilactobacillus, Liquorilactobacillus, Levilactobacillus, Latilactobacillus, Secundilactobacillus, Schleiferilactobacillus, Paucilactobacillus, Acetilactobacillus, Apilactobacillus, Amylolactobacillus, Agrilactobacillus, Holzapfelia, Fructilactobacillus, Furfurilactobacillus, Dellaglioa, Companilactobacillus* ve *Bombilactobacillus.*

2.2.1. *Lacticaseibacillus rhamnosus*

Lacticaseibacillus rhamnosus (LR), gram-pozitif, spor oluşturmayan ve oksijensiz ortamlarda L(+) laktik asit ve etanol üretebilen fakültatif heterofermentatif bir probiyotik bakteridir. LR, doğal olarak insan bağırsak florasında bulunur ve düşük pH seviyelerine karşı dayanıklıdır. LR takviyesi, akut ishal, antibiyotik kaynaklı ishal, fonksiyonel gastrointestinal rahatsızlıklar, solunum yolu enfeksiyonları ve atopik hastalıklar gibi çeşitli sağlık sorunlarına karşı faydalı etkiler göstermektedir (Collins ve diğerleri, 1989; Goldin ve diğerleri, 1992; Capurso, 2019; Leser ve Baker, 2024).

2.2.2. *Lacticaseibacillus paracasei*

Lacticaseibacillus paracasei (LPC) *g*üçlü probiyotik aktiviteye sahip bir mikroorganizma olduğu birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Gram-pozitif, spor oluşturmayan ve fakültatif heterofermentatif olan bu probiyotik bakteri oksijensiz ortamlarda L(+) laktik asit ve etanol üretebilme özellikleriyle bilinmektedir. LPC bağırsak mikrobiyotasına özgüdür ve düşük pH seviyelerine karşı dayanıklıdır. LPC'nin faydalı etkileri çeşitli sindirim bozuklukları, enfeksiyon hastalıkları, obezite ve depresyon hastalarında yapılan klinik çalışmalarla desteklenmiştir (Collins ve diğerleri, 1989; Leboš Pavunc ve diğerleri, 2023).

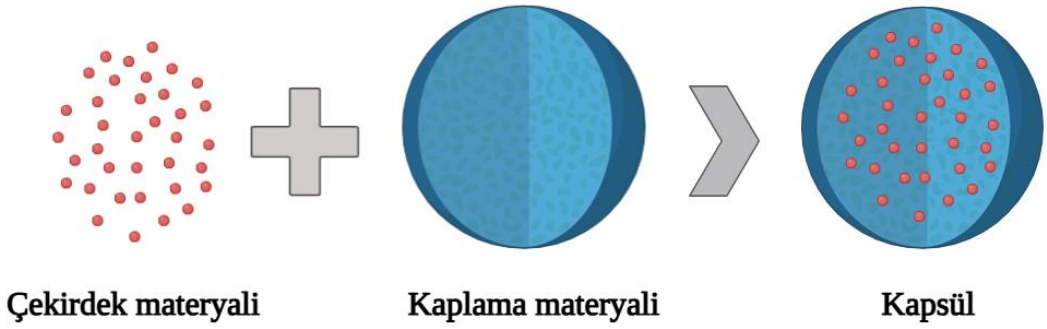
Probiyotiklerin klinik etkilerindeki farklılıklar, probiyotikler ile konakçı arasındaki etkileşimlerin tam olarak anlaşılmamasından kaynaklanmaktadır. Probiyotiklerin sağlık üzerindeki koruyucu etkilerini daha iyi anlayabilmek için, probiyotik-konakçı etkileşimlerinin moleküler düzeyde incelenmesi ve probiyotiklerin mikrobiyota üzerinden konakçı fizyolojisiyle nasıl etkileştiğinin araştırılması gerekmektedir (Leser ve Baker, 2024). *Lacticaseibacillus* cinsine ait *L. rhamnosus* ve *L. paracasei* probiyotik bakterilerinin özellikleri Çizelge 2.1'de verilmektedir (Collins ve diğerleri, 1989; Zheng ve diğerleri, 2020).

Çizelge 2.1. *L. rhamnosus ve L. paracasei* probiyotik bakterilerinin özellikleri

Özellik	***Lacticaseibacillus rhamnosus***	***Lacticaseibacillus paracasei***
Alan	Bacteria	Bacteria
Şube	Bacillota	Bacillota
Sınıf	Bacilli	Bacilli
Takım	Lactobacillales	Lactobacillales
Familya	*Lactobacillaceae*	*Lactobacillaceae*
Cins	*Lacticaseibacillus*	*Lacticaseibacillus*
Tür	*L. rhamnosus*	*L. paracasei*
Hücre Şekli	Çubuk şeklinde, genellikle kare uçlarla, tek başına veya zincirler halinde bulunur.	Çubuk şeklinde, genellikle kare uçlarla, tek başına veya zincirler halinde bulunur.
Gelişim sıcaklığı	5-45°C	10-40°C (bazı suşlar 5-45°C)
Habitat	Süt ürünleri, fermente et, balık, sebzeler, tahıllar, atık su, insanlar (ağız, vajina, bağırsak), omurgasızlar, klinik kaynaklar	İnsan ağız boşluğu, fermente tahıllar, sebzeler, etler, süt ürünleri, omurgasızlar

2.3. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon; katı, sıvı veya gaz haldeki gıda bileşenleri, enzim, hücre ve diğer mikroorganizmaların uzun süreli korunması, stabilizasyonu ve kontrollü salımı için protein, karbohidrat veya lipit esaslı bir kaplama materyaliyle kaplanması ya da kaplama materyalinin içine hapsedilmesi prensibine dayalı bir yöntemdir (Şekil 2.1) (Gökmen ve diğerleri, 2012; Serna-Cock ve Vallejo-Castillo, 2013; Chawda ve diğerleri, 2017; Roshanzamir ve diğerleri, 2017). Kaplanan materyal çekirdek, yük, aktif bileşen, dolgu veya iç faz materyali gibi farklı adlarla ifade edilebilir. Kaplama işlemini yapan materyal ise duvar, taşıyıcı, zar, kabuk veya kaplama materyali olarak adlandırılabilir (Huq ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.1. Enkapsülasyon işlemi

Enkapsülasyon sürecinde, mikrokapsüller (1 µm ile birkaç yüz mikrometre arasındaki çaplarda), submikron kapsüller (yüzlerce nanometreden 1 µm'ye kadar olan çaplarda) ve nanokapsüller (1 nm ile birkaç yüz nanometre arasındaki çaplarda) mikroenkapsülasyon ve nanoenkapsülasyon yöntemleriyle elde edilir (Shishir ve diğerleri, 2018).

Enkapsülasyon, gıda ve ilaç endüstrilerinde geniş bir kullanım alanına sahip en yaygın yöntemdir (Shishir ve diğerleri, 2018; Saifullah ve diğerleri, 2019). Gıda ürünlerinde genel olarak katı ve sıvı yağlar, polifenoller, vitaminler, aroma bileşenleri, mineraller, oleoresinler, enzimler ve probiyotik bakteriler enkapsüle edilmektedir (Gökbulut ve Öztürk, 2018). Enkapsülasyonun gıda endüstrisindeki kullanım amaçları aşağıda yer almaktadır (Desai ve Jin Park, 2005; Koç ve diğerleri, 2010).

- Çekirdek materyalinin nem, sıcaklık, oksijen ve ışık gibi çevresel faktörlerin olumsuz etkilerinden koruyarak fiziksel yapısının stabil kalmasının sağlanması.
- Çekirdek materyalin diğer bileşenlerle reaksiyona girmesinin engellenmesi.
- Çekirdek materyalin küçük miktarlarda homojen bir şekilde karıştırılabilir hale getirilmesi.
- Buharlaşmaya bağlı kayıpların önlenmesi.
- İşleme ve taşımada daha kolay kullanım imkanı sunması.
- Aktif bileşenlerin istenilen noktada ve zamanda kontrollü bir şekilde salınması.
- İstenmeyen tat ve kokuların gizlenmesi.

Enkapsülasyonda genellikle kaplama materyali olarak (Koç ve diğerleri, 2010; Serna-Cock ve Vallejo-Castillo, 2013),

- Agar, sodyum aljinat, karragenan, gam arabik, kitosan, pektin, nişasta, selüloz, sakkaroz, maltodekstrin ve mısır şurubu gibi karbohidratlar,
- Vaks, parafin, monogliserit, digliserit, stearik asit, tristearin ve yağlar gibi lipitler,
- Gluten, kazein, kazeinat, albümin, jelatin, nohut ve peynir altı suyu gibi proteinler kullanılmaktadır.

Kaplama materyalinin bileşimi, kapsülün işlevsel özelliklerini doğrudan etkiler. İdeal bir kaplama materyalinin sahip olması gereken tüm özellikleri tek bir materyalde bir araya getirmek genellikle zordur. Bu nedenle, farklı materyallerin bir arada kullanılması, daha verimli ve etkili sonuçlar elde etmek için yaygın bir yaklaşımdır. Enkapsülasyonda ideal bir kaplama materyalinin sahip olması gereken özellikler aşağıda belirtilmiştir (Koç ve diğerleri, 2010; Serna-Cock ve Vallejo-Castillo, 2013; Geniş ve Tuncer, 2019).

- Yüksek konsantrasyonlarda reolojik özellikleri iyi olmalıdır.
- Emülsiyon ve dispersiyon özellikleri iyi olmalıdır.
- Çekirdek materyalini etkili bir şekilde kaplamalı ve hem kaplama hem de depolama sürecinde çekirdek materyalinin özelliklerini korumalıdır.

- Kullanılacak çözücüde kolayca çözünebilecek bir yapıya sahip olmalıdır.
- Uygun maliyetli olmalıdır.

Enkapsülasyon işleminde kapsül oluşturmak için ekstrüzyon, emülsiyon, sprey kurutma, sprey soğutma, dondurarak kurutma, lipozom, akışkan yatak kaplama, koaservasyon, inklüzyon kompleksi oluşturma, santrifüj ekstrüzyonu, döner süspansiyon ayırma, çarpışmalı aerosol teknolojisi ve rennet ile jelleştirilmiş protein gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Gibbs ve diğerleri, 1999; Martín ve diğerleri, 2015; Kavitake ve diğerleri, 2018). Bu yöntemler, farklı uygulama alanlarına uygun kapsüller oluşturmak için kaplama materyallerinin etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır. Probiyotikleri içeren kapsüllerin oluşumunda temel olarak sprey kurutma, dondurarak kurutma, ekstrüzyon ve emülsiyon yöntemi kullanılmaktadır (Chávarri ve diğerleri, 2012; Uran ve diğerleri, 2017; Latif ve diğerleri, 2023).

2.3.1. Sprey kurutma yöntemi

İlk kez 1930'larda bir aromanın enkapsülasyonu için kullanılan sprey kurutma, gıda bileşenleri üretiminde yaygın olarak kullanılan, büyük ölçekli sanayi uygulamalarına uygun ve ekonomik bir yöntemdir. Sprey kurutma, aktif bileşenin kaplama materyalinde çözünerek emülsiyon veya süspansiyon oluşturduğu bir enkapsülasyon yöntemidir. Çözücüler genellikle jelatin, modifiye nişasta veya bitkisel gam gibi hidrokolloidlerdir (Chávarri ve diğerleri, 2012).

Sprey kurutma işleminde, sıvı karışım atomize edilerek küçük damlacıklara ayrılır. Biyoaktif bileşikler içeren bu damlacıklar, sıcak hava ile kurutularak kapsüller oluşturulur. Bu süreç, kapsüllerin oksijen ve diğer zararlı etmenlere karşı bir bariyer oluşturmasını sağlar, bu da biyoaktif bileşiklerin stabilitesinin korunmasına yardımcı olur. Ancak, sprey kurutma işleminde uygulanan yüksek sıcaklıklar, uçucu bileşiklerin veya ısıya duyarlı bileşenlerin bozulmasına neden olabilir. Özellikle, probiyotiklerin enkapsülasyonu sırasında yüksek kurutma sıcaklıkları, bakterilerin canlılık oranını olumsuz yönde etkileyebilir ve bu da uzun vadeli depolama sırasında stabilitenin bozulmasına yol açabilir. Bu nedenle sprey kurutma işlemi, kurutma sıcaklığı, süresi ve

kullanılan kaplama materyali gibi parametrelerin optimizasyonunu gerektirir (Shishir ve diğerleri, 2018).

2.3.2. Dondurarak kurutma yöntemi

Dondurarak kurutma veya liyofilizasyon yöntemi, neredeyse tüm ısıya duyarlı materyallerin, suda çözünebilen esansların, doğal aromaların ve ilaçların enkapsülasyonu için kullanılan basit bir yöntemdir. Dondurarak kurutma ile enkapsülasyon, çekirdek materyallerin matris çözeltilerinde homojenize edilmesi ve ardından birlikte liyofilize edilmesiyle gerçekleştirilir. Bu süreç donma, birincil kurutma (süblimasyon) ve ikincil kurutma (desorpsiyon) olmak üzere üç aşamalı bir işlemden oluşur. Suyun buza dönüştürülmesinin ardından düşük sıcaklık ve basınçta süblimasyon yoluyla buz uzaklaştırılır. Sonrasında, donmamış su, desorpsiyon yoluyla istenilen nem seviyesine ulaşana kadar giderilir. Giderim, örneğin cam geçiş sıcaklığı gibi faktörlere bağlı olarak birkaç saatten birkaç güne kadar sürebilir. Bu yöntem, uzun süren kurutma süresi ve yüksek maliyeti ile pahalı bir teknoloji olmasının yanı sıra, genellikle belirsiz kapsül formlarının oluşmasına neden olur (Fang ve Bhandari, 2010; Shishir ve diğerleri, 2018).

Probiyotiklerin enkapsülasyonu için tercih edilen yöntemlerden biri olan dondurarak kurutma, genellikle yalnızca ürünün depolama aşamasında stabilite sağlar. Tüketim sırasında ise stabilite sağlanamaz veya sınırlı düzeyde sağlanır. Bu nedenle, bu yöntem genellikle enkapsülasyon sürecinin ikinci adımı olarak kullanılır. Dondurarak kurutma, emülsifikasyon veya jel mikrokürelere hapsolma gibi yöntemlerle enkapsüle edilmiş probiyotikleri kurutmak için kullanılan etkili bir yöntemdir. Bu şekilde, gastrointestinal sistemdeki stabiliteyi artırmak ve probiyotik tüketiminin faydalı etkisini optimize etmek mümkündür (Chávarri ve diğerleri, 2012).

2.3.3. Ekstrüzyon yöntemi

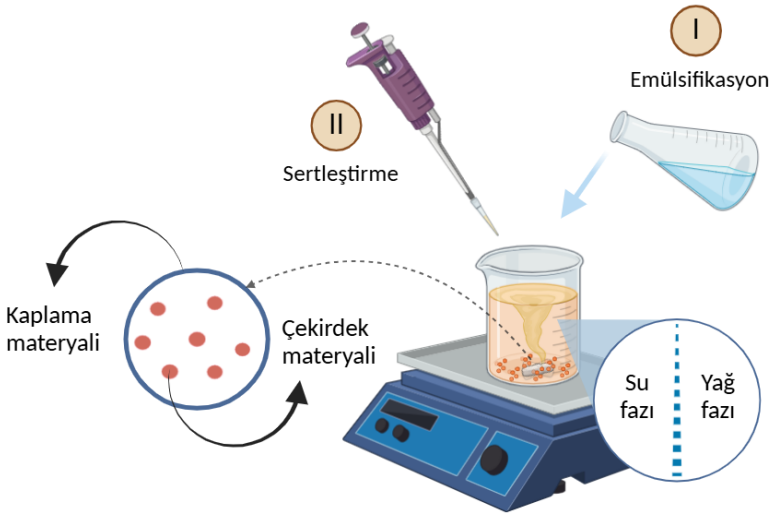
Ekstrüzyon, hidrokolloidlerle kapsüller üretmek için en eski ve en yaygın kullanılan enkapsülasyon yöntemlerinden biridir. Bu yöntemde, öncelikle bir hidrokolloid çözeltisi hazırlanır ve içerisine çekirdek materyali eklenir. Daha sonra bu süspansiyon, bir şırınga

iğnesi aracılığıyla damlacıklar halinde çok değerlikli bir katyon içeren çözeltiye bırakılır. Damlacıkların boyut ve şekli, kullanılan şırınga iğnesi çapına ve çözeltinin üzerine damlatılma mesafesine bağlı olarak değişir (Krasaekoopt ve diğerleri, 2003).

Ekstrüzyon yöntemi basit yapısı, düşük maliyeti ve hücre canlılığını yüksek oranda koruma özellikleriyle tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntem, zararlı çözücüler kullanılmaksızın hem aerobik hem de anaerobik koşullarda gerçekleştirilebilir ve genellikle aljinat gibi biyouyumlu kaplama materyalleriyle uygulanır. Bununla birlikte, ekstrüzyonun büyük ölçekli üretimdeki en önemli sınırlaması, kapsüllerin yavaş oluşumu nedeniyle verimli bir şekilde uygulanamamasıdır (Choińska-Pulit ve diğerleri, 2015).

2.3.4. Emülsiyon yöntemi

Emülsiyon yöntemi, hidrofobik, hidrofilik ve ısıya duyarlı bileşiklerin kapsüllenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, bir yağ fazı ve bir su fazı olmak üzere birbiri içerisinde karışmayan en az iki sıvı bir emülsiyon oluşturur; bir sıvı, diğer sıvı içinde küçük damlacıklar halinde dağılır. Çekirdek fazı hidrofilik olduğunda su/yağ emülsiyonu, çekirdek fazı hidrofobik olduğunda ise, yağ/su emülsiyonu olarak adlandırılır. Bu emülsiyonlar için genellikle kanola, ayçiçeği veya mısır yağı gibi bitkisel yağlar tercih edilir. Ayrıca, temel yöntemin bir modifikasyonu olan su/yağ/su ya da yağ/su/yağ gibi çift emülsiyon yöntemleri de bulunmaktadır. Emülsiyonun stabil kalması için emülgatörlerin kullanılması gerekmektedir. Emülsiyon, çapraz bağlayıcı madde eklenmesiyle kırılır ve kapsüller sertleşir. Elde edilen kapsüller ardından çöktürme yoluyla toplanır (Kailasapathy, 2002; Chávarri ve diğerleri, 2012; Choińska-Pulit ve diğerleri, 2015; Eghbal ve diğerleri, 2022) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Emülsiyon yönteminin şematik gösterimi

Probiyotik bakterilerin enkapsülasyonu için literatürde yaygın olarak kullanılan emülsiyon yöntemi ile elde edilen kapsüller geniş bir boyut dağılımı göstermektedir. Karıştırma ve homojenizasyon işlemleriyle uygun boyut dağılımı elde etmeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Emülsiyonun iç faz partikül boyutunun küçülmesi, oluşan kapsüllerin boyutunun da küçülmesine neden olmaktadır. Emülsiyon yönteminde hücrelerin canlılık oranı yüksek tutulabilir; ancak, şiddetli karıştırma, hücrelerin kapsüllere düzensiz bir şekilde ilave edilmesi ve bitkisel yağın sterilize edilememesi hücre canlılığını olumsuz etkilemektedir. Emülsiyon yönteminde, kaplama materyali olarak karragenan, keçiboynuzu gamı, selüloz asetat ftalat, aljinat, kitosan ve jelatin gibi çeşitli maddeler kullanılmaktadır. Bu materyaller, emülsiyonun stabilitesini ve kapsüllerin özelliklerini belirlemede önemli rol oynamaktadır (Chávarri ve diğerleri, 2012; Gbassi ve Vandamme, 2012; Gökmen ve diğerleri, 2012; Choińska-Pulit ve diğerleri, 2015).

Kapsüllerin karakterizasyonu; kimyasal, fiziksel, fizikokimyasal ve organoleptik yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. İleri düzey fiziksel ve fizikokimyasal yöntemler, kapsüllerin yapısını doğrudan gözlemlemeye veya yapısal özelliklerine ilişkin veri sağlamaya olanak tanımaktadır. Her bir yöntemin avantajları ve sınırlamaları bulunmakta olup, bu yöntemler özellikle farmasötik ve biyolojik araştırmalarda yaygın olarak

kullanılmaktadır (Shahidi ve Han, 1993; Gökmen ve diğerleri, 2012). Bu amaçla kullanılan yöntemler arasında,

- Elektron mikroskobu,
- Taramalı elektron mikroskobu,
- Elektron spin rezonansı spektroskopisi,
- Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi,
- Ultrasonik absorpsiyon,
- Floresans söndürme ve
- Radyoaktif izleyiciler yer almaktadır.

2.4. Probiyotik bakteri enkapsülasyonu

Probiyotik bakteriler, oksijen, yüksek sıcaklık, düşük pH, sindirim enzimleri ve safra tuzları gibi streslere karşı hassasiyetleri nedeniyle işleme, depolama ve gastrointestinal geçiş sırasında canlılıklarını yitirebilmektedir. Probiyotik bakterilerin gıda endüstrisinde kullanımını sınırlayan bu zorlukları aşmak ve probiyotiklerin canlılığını korumak için çeşitli enkapsülasyon yöntemleri geliştirilmiştir (Luo ve diğerleri, 2022). Çizelge 2.2'de probiyotik bakteri enkapsülasyonuna ait bazı yöntemler sunulmaktadır (Serna-Cock ve Vallejo-Castillo, 2013). Çizelge 2.3'te ise probiyotik bakteri enkapsülasyonlarına ait bazı çalışmalar verilmektedir.

Çizelge 2.2. Probiyotik bakteri enkapsülasyon yöntemleri

Yöntem	Mekanizma	Maliyet	Uygulama kolaylığı	Partikül tipi	Partikül boyutu (µm)
Sprey kurutma	Dehidrasyon	Düşük	Evet	Yaklaşık küresel	3-100
Dondurarak kurutma	Süblimasyon ve desorpsiyon	Yüksek	Hayır	Düzensiz	-
Ekstrüzyon	Retikülasyon	Düşük	Evet	Küresel	1600-5000
Emülsiyon	Emülsifikasyon	Düşük	Evet	Küresel	25-2000

Çizelge 2.3. Probiyotik bakteri enkapsülasyonuna ait çalışmalar

Probiyotik bakteri	**Kaplama materyali**	**Yöntem**	**Kaynak**
Bifidobacterium bifidum *Lactobacillus gasseri*	Aljinat-kitosan	Ekstrüzyon	Chávarri (2010)
Bifidobacterium Bb-12	Peynir altı suyu proteini	Sprey kurutma	de Castro-Cislaghi vd. (2012)
Lactobacillus reuteri DPC16	Aljinat-yağsız süt tozu	Ekstrüzyon	Zhao vd. (2012)
Lactobacillus reuteri DSM 17938	Aljinat, kitosan	Sprey kurutma	Malmo vd. (2013)
Lactobacillus casei/paracasei CTC1677 *Lactobacillus casei/paracasei* CTC1678 *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679	Glikoz, laktoz, trehaloz, yağsız süt	Dondurarak kurutma	Jofré vd. (2015)
Lactiplantibacillus plantarum NRRL B-4496 *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495	Jelatin	Emülsiyon	da Silva vd. (2023)
Lactiplantibacillus plantarum V2	Kitosan-inülin	Ekstrüzyon	Rojas-Espina vd. (2024)
Lacticaseibacillus casei DSM 20011 *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079	İğde unu	Emülsiyon	Karkar vd. (2024b)

Zhao vd. (2012) yaptıkları çalışmada *L. reuteri* DPC16 hücrelerini aljinat-yağsız süt tozu ile enkapsüle ederek 2 sa simüle edilmiş mide ve 5 sa simüle edilmiş bağırsak sisteminden geçişi sırasında canlılıklarını koruma yeteneğini incelemiştir. Serbest bakteriler (10^9 kob/mL), simüle mide sıvısında 90 dk inkübe edildikten sonra tespit edilmemiştir. Buna karşın, kapsüllenmiş hücre canlılığında (5×10^8 kob/g) 2 sa sonra, 1 log biriminden daha az bir kayıp yaşanmış ve simüle mide sıvısı içinde canlı hücreler tespit edilmemiştir. Simüle bağırsak sıvısına maruz kalan kapsüllenmiş hücrelerin canlılığı biraz azalmış ve sızıntı sonucu hücreler simüle bağırsak sıvısı içinde tespit edilmiştir. Başlangıçta 3-4 mm çapında olan kapsüller, simüle mide sıvısında küçülmüş ancak yapısal bütünlüğünü korumuştur. Bağırsak sıvısında ise kapsüller şişmiş, ardından gözle görülebilir bir dağılma meydana gelmiş ve bu durum, canlı hücrelerin kontrollü bir şekilde serbest kalmasına neden olmuştur.

Bir diğer çalışmada (Malmo ve diğerleri, 2013) probiyotik hücrelerin ısı ve sindirim koşullarına karşı direncini arttırarak probiyotik çikolatalı sufle elde edilmesi hedeflenmiştir. *L. reuteri* DSM 17938, aljinat matrisi içine sprey kurutma yöntemiyle enkapsüle edilip, ardından kitosan ile kaplanmıştır. Sonuçlar, aljinat kapsüllerinin, *in vitro* deneylerde aside tolerans ve ısıya karşı direnç sağlamadığını, ancak çikolatalı sufle pişirme sonrası *L. reuteri* popülasyonunun %7'sinin hayatta kalmasını sağladığını göstermiştir. Aljinat ve kitosan kaplı kapsüller, *in vitro* deneylerde asit toleransını artırarak simüle mide koşullarında 3 sa boyunca hücre popülasyonu sabit kalmış ve ısıya karşı daha iyi direnç sağlamıştır. Ayrıca, çikolatalı suflenin pişirilmesi sonrasında *L. reuteri* popülasyonunun %10'u hayatta kalmıştır ve bakteri popülasyonun probiyotik bir ürün olarak kabul edilemeyecek kadar düşük olduğu bildirilmiştir.

Jofré vd. (2015) glikoz, laktoz ve trehaloz gibi şekerlerin tek başına veya yağsız süt ile kombinasyon halinde kullanımının, dondurarak kurutulmuş üç potansiyel probiyotik suşun depolama sırasında (4°C ve 22°C'de 39 hafta) canlılıkları üzerindeki koruyucu etkisini değerlendirmiştir. *L. casei*/*L. paracasei* suşları için yağsız süt, trehaloz-yağsız süt ve laktoz-yağsız süt kombinasyonları, *L. rhamnosus* için ise yağsız süt, laktoz ve laktoz-yağsız süt kombinasyonu en etkili koruyucu maddeler olarak belirlenmiştir. Trehalozun yüksek maliyeti nedeniyle, endüstriyel uygulamalarda laktoz veya yağsız süt (tek başına

ya da kombinasyon halinde) kullanılması önerilmiştir. Glikoz dışındaki şekerlerin oda sıcaklığında kısa süreli depolama sırasında probiyotik bakterilerin canlılığını uzatmak için kullanılabileceği bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada (da Silva ve diğerleri, 2023) jelatin kullanılarak yağ/su emülsifikasyonu ile *L. acidophilus* ve *L. plantarum* probiyotikleri enkapsüle edilmiştir. Sonuçlar, *L. acidophilus* ve *L. plantarum* kapsüllerinin sırasıyla 26,08±1,74 µm ve 21,56±4,17 µm çaplara ve %89,6±4,2 ve %81,1±9,4 kapsülleme verimliliklerine sahip olduğunu göstermiştir. Enkapsülasyon işleminin 5°C ve 25°C'de 120 günlük depolama süresince *L. acidophilus* ve *L. plantarum*'un canlılığını korumak ve sürdürmek için olumlu özellikler gösterdiği belirtilmiştir.

2.5. Prebiyotikler

Prebiyotikler, "konağın bağırsak mikrobiyotasındaki mikroorganizmaların seçici olarak kullandığı ve sağlık üzerinde olumlu etkileri bulunan substratlar" olarak tanımlanmaktadır. Sindirilmeksizin kalın bağırsağa ulaşıp probiyotik bakterilerin gelişimini ve aktivitesini teşvik ederek konağın sağlığını desteklerler (Bilginer ve Çetin, 2019). Kuşkonmaz, sarımsak, bal, şeker pancarı, yer elması, muz, hindiba, bezelye, soğan, arpa, buğday, çavdar, domates, soya fasulyesi, insan ve inek sütü gibi çeşitli besin ürünleri doğal prebiyotikler olarak çeşitli çalışmalar sonucu belirlenmiştir ve son zamanlarda deniz yosunları ve mikroalglerde de prebiyotik özellikler tespit edilmiştir. Laktüloz, laktitol, ksilitol ve mannitol içeren polioller; frukto-oligosakkaritler, galakto-oligosakkaritler, izomalto-oligosakkarit, ksilo-oligosakkarit, inülin gibi oligosakkaritler ve polidekstroz, dekstrin, β-glukanlar, pektin ve lignin ile temsil edilen lifler gibi prebiyotikler hem besleyici hem de gıdalarda fonksiyonel özellik geliştirici olarak kullanılırken, sağlık üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı geniş çapta araştırılan bileşenlerdir. Karbohidratlar en çok bildirilen prebiyotikler olmasına rağmen, literatürde mineraller, polifenoller ve yağ asitleri gibi karbohidrat olmayan bileşenlerin prebiyotik potansiyeline dair umut verici sonuçlar içeren çalışmalar bulmak mümkündür (Davani-Davari ve diğerleri, 2019; Ferreira ve diğerleri, 2023).

Bir bileşiğin prebiyotik olarak kabul edilmesi için aşağıdaki kriterleri karşılaması gerekmektedir (Singarayar ve diğerleri, 2024).

- Tamamen sindirilmeden veya emilmeden alt gastrointestinal sisteme ulaşabilmelidir.
- Asit ve enzimatik emilime direnç göstermelidir.
- Yerel mikroflora tarafından sindirilmelidir.
- Patojenler yerine yararlı mikroorganizmaların gelişmesini iyileştirmelidir.
- Bakterilerin metabolizmasını değiştirerek bağırsakta faydalı maddelerin üretimini sağlamalıdır.
- Sağlık üzerindeki etkileri kanıtlanmış olmalıdır.

2.5.1. Fenolik bileşikler

Bitkilerin ikincil metabolitleri olarak bilinen fenolik bileşikler, serbest radikal hasarına karşı koruyucu etkileri, antioksidan özellikleri ve metal şelatlayıcı olarak işlev görmeleriyle tanınmaktadır. Bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren aromatik bir halkadan oluşan fenolik bileşikler içerdikleri fenol halkalarına ve bu halkalar arasındaki bağlanmadaki yapısal farklılıklara göre genellikle birkaç sınıfa ayrılırlar. Fenolik bileşikler esas olarak (Stavrou ve diğerleri, 2018);

- Flavonoidler,
- Fenolik asitler,
- Tanenler (hidrolize edilebilir ve kondanse),
- Stilbenler ve
- Lignanlar olarak sınıflandırılmaktadır.

Sebze, meyve ve diğer bitkilerin kalitesini belirleyen fenolik bileşikler, bağırsak mikrobiyotası üzerinde prebiyotik etkiler göstererek mikrobiyota bileşimine ve sağlığına katkıda bulunmaktadır. Bu özellikleri sayesinde vücut sağlığı üzerinde önemli etkilere sahip olmaktadır (Öztürk ve Yılmaz, 2024). Fenolik bileşiklerin antimikrobiyal, antiviral, antialerjik, antiinflamatuar, antidiyabetik, antipatojenik ve antitrombotik özelliklerinin

yanı sıra diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar üzerinde koruyucu etkileri olduğu yapılan araştırmalar ile ortaya koyulmaktadır (Kolaç ve diğerleri, 2017; Stavrou ve diğerleri, 2018).

2.5.2. Diyet lifleri

Diyet lifleri, meyve, sebze, baklagil ve tahıllarda bulunan, ince bağırsakta sindirilmeye direnç gösteren ve kalın bağırsakta kısmi veya tam olarak fermente olabilen bileşenlerdir. Suda çözünürlük özelliklerine göre çözünür ve çözünür olmayan lifler olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılmaktadır (Salçın ve Ercoşkun, 2021).

- Çözünür lifler (pektin, β-glukan, galaktomannan, inülin gibi) suyu emip çözelti oluştururken, kolesterolü düşürmeye ve glukoz emilimini azaltmaya yardımcı olur.
- Çözünür olmayan lifler (lignin, selüloz, hemiselüloz gibi) ise suyu tutarak bağırsak hareketlerini düzenler.

Çözünür liflerin, çözünür olmayan liflerden daha az yaygın olduğu düşünülse de prebiyotik özellik göstererek bağırsak sağlığını destekleyebileceği bilinmektedir (Yangilar, 2013).

2.6. Sinbiyotikler

Yaşam koşulları ve beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler, doğal floradaki bozulmalarla ilişkilendirilmektedir. Bu durum obezite, inflamatuar hastalıklar ve bazı kanser türlerinin yaygınlaşmasına yol açarak probiyotik ve prebiyotiklere olan talebi artırmıştır (Bakır, 2012). İnsan bağırsak sistemi, mikroorganizmaların oluşturduğu karmaşık bir ekosistemle doludur. Prebiyotikler, konakçının bağırsak ekosisteminde bulunan mikroorganizmaları seçici olarak uyarır. Sinerjik olarak etkili olan probiyotiklerin ve prebiyotiklerin birleşimini tanımlamak için “sinbiyotik” terimi kullanılmaktadır. Sinbiyotikler hem ürün stabilitesini artırır hem de probiyotiklerin canlılığını artırarak bağırsak sağlığını geliştirir. Bu işlevlerin desteklenmesi için

sinbiyotiklerin diyette yer alması gerekmektedir. Bu maddeler, çiğ sebze, meyve, fermente gıdalar veya süt ürünleri gibi doğal kaynaklarla alınabileceği gibi farmasötik ürünler ve fonksiyonel gıdalar aracılığıyla da temin edilebilir. Özellikle yoğurt gibi süt ürünlerinde sinbiyotikler, ürünün depolama süresi boyunca stabilitesini koruması açısından önemlidir (Pandey ve diğerleri, 2015; Markowiak ve Śliżewska, 2017; Köse ve diğerleri, 2019).

2.7. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.)

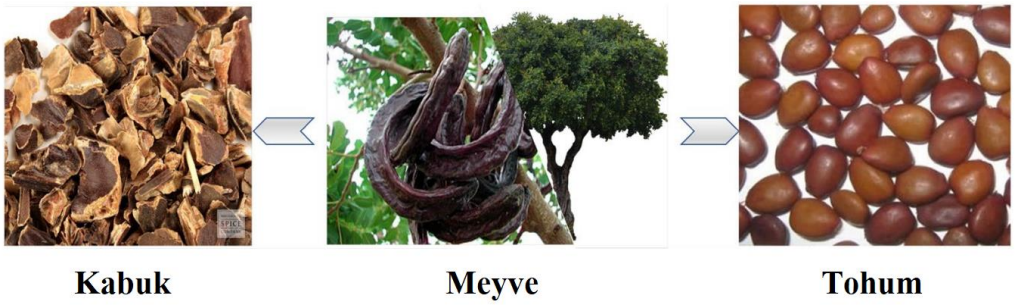
Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.), *Leguminoseae* (*Fabaceae*) familyasının bir üyesi olup, Akdeniz ve Ege havzasının çoğu ülkesinde antik çağlardan beri yetiştirilen bir bitkidir (Petkova ve diğerleri, 2017; Pazır ve Alper, 2018). Keçiboynuzu ağacı, zemin seviyesine kadar uzayan dalları ile 6-12 m'lik ve bazen 20 m'yi aşan bir yüksekliğe ulaşır (Kumazawa ve diğerleri, 2002) (Şekil 2.3). Keçiboynuzu ağacı, İspanya, Portekiz, Fas, Yunanistan, İtalya, Türkiye, Lübnan, Cezayir, Tunus, Mısır ve Kıbrıs'ta yetiştirilmektedir. Keçiboynuzunun yıllık küresel üretiminin 100.000 tonun üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (Hssaini ve diğerleri, 2024).



Şekil 2.3. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) ağacı (Mayordomo-Maya ve Hermosilla-Pla, 2024)

Keçiboynuzu meyvesi kahverengi renklidir ve boyu bazı koşullarda 25 cm'ye kadar ulaşabilir (Kumazawa ve diğerleri, 2002). Meyve, %90 yenilebilir kısım (posa) ve %10 tohumdan oluşur (Pazır ve Alper, 2018). Keçiboynuzu unu keçiboynuzu meyvesinin kabuk ve tohumundan elde edilir (Şekil 2.4). Tohumlar esas olarak galaktomannanlardan

oluşur (Petkova ve diğerleri, 2017). Ticari olarak satın alınan keçiboynuzu ununun besin değeri incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 2.4'te özetlenmiştir.

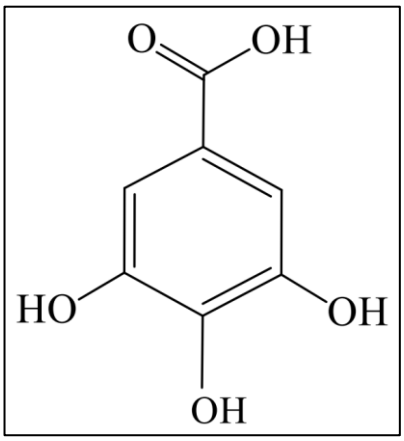


Şekil 2.4. Keçiboynuzu meyvesi ve temel bileşenleri (Zhu ve diğerleri, 2019)

Çizelge 2.4. Keçiboynuzu ununun besinsel özellikleri (Petkova ve diğerleri, 2017)

Özellik	Değer
Nem (%)	7,56±0,16
Kül (%)	2,25±0,02
Karbohidrat (%)	85,50±0,02
Toplam çözünür karbohidrat (%)	57,44±3,30
İndirgen şeker (%)	8,60±1,72
Glikoz (%)	3,25±0,42
Fruktoz (%)	4,16±0,21
Sükroz (%)	34,13±1,45
Enerji (kcal/100 g)	370,37

Keçiboynuzunun toplam fenolik madde miktarı 100 g'da 45 ile 5376 mg gallik asit eşdeğerine kadar değişmektedir. Keçiboynuzunda bulunan başlıca fenolik bileşikler gallik asit, (+)-kateşin, (-)-epikateşin, (-)-epikateşingallat, (-)-epigallokateşin, (-)-epigallokateşingallat, mirisetin, kuersetin, tanen bileşikleri ve bunların türevleridir (Kumazawa ve diğerleri, 2002; Stavrou ve diğerleri, 2018). Keçiboynuzunda en fazla bulunan fenolik bileşik olan gallik asit (Şekil 2.5), özellikle yağların oksidasyonunu yavaşlatmada çok etkili olan bir antioksidandır (Pazır ve Alper, 2016; Pazır ve Alper, 2018).



Şekil 2.5. Gallik asidin kimyasal yapısı (Delfanian ve diğerleri, 2021)

Şeker, diyet lif, mineraller ve fenolik bileşikler gibi yüksek miktarda ve çeşitte besin maddelerine sahip olan keçiboynuzu meyvesinin kimyasal bileşimi çeşide, kökene ve hasat zamanına bağlı olarak değişmektedir. Keçiboynuzu fonksiyonel özelliklere sahip fitokimyasal bileşenleri, aroma özellikleri ve beslenme faydaları nedeniyle gıda, tekstil, kozmetik ve ilaç endüstrileri için önemli bir potansiyele sahiptir (Kumazawa ve diğerleri, 2002; Petkova ve diğerleri, 2017; Pazır ve Alper, 2018; Brassesco ve diğerleri, 2021).

Keçiboynuzu tohumları, toz (un), şurup, keçiboynuzu gamı ve D-pinitol gibi bazı ticari ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Keçiboynuzu tohumları mikroorganizmalar için gelişme ortamı olarak, emülsiyonların ve dispersiyonların stabilizatörü olarak, gıda endüstrisinde kıvamlaştırıcı olarak ve farmasötik endüstrisinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Kumazawa ve diğerleri, 2002; Petkova ve diğerleri, 2017; Pazır ve Alper, 2018). Keçiboynuzu şurubunun müshil ve idrar söktürücü gibi ilaçlarda kullanıldığı bilinmektedir. Keçiboynuzu posası, hayvan yemi, farmasötik ürünler ve etanol üretimi gibi birçok alanda geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Keçiboynuzu kabukları, sitrik asit, antiemetik ürünler (bulantı önleyici) ve pastacılık ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca keçiboynuzu kabuklarının antioksidan katkı maddesi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Ahmed ve diğerleri, 2009).

Keçiboynuzu unu, yüksek şeker içeriği nedeniyle doğal bir tatlandırıcı olarak değerlendirilebilir ve benzer tat ve görünümünden dolayı kakao tozunun yerine kullanılabilmektedir (Fadel ve diğerleri, 2006; El Batal ve diğerleri 2016). Keçiboynuzu

ununun kimyasal bileşimi, yüksek miktarda çözünmeyen diyet lif içerdiğini göstermektedir. Bu nedenle gıda ürünlerini diyet lif ile zenginleştirmek için keçiboynuzu unu kullanılabilir (Durazzo ve diğerleri, 2014; Petkova ve diğerleri, 2017). Diyet lif açısından zengin beslenmenin, kolesterol düzeyini düşürdüğü ve kolon sağlığı üzerinde olumlu etkiler sağladığı bilinmektedir (Pazır ve Alper, 2016; Pazır ve Alper, 2018). İnsan metabolizmasında D-pinitol, insülin gibi davranarak kandaki glikoz seviyesini düşürmeye ve dengelemeye yardımcı olur. Araştırmalar, keçiboynuzu galaktomannanlarının, fermente süt ürünlerinde probiyotiklerin hayatta kalmasını desteklediğini ve gastrointestinal koşullar altında etkinliklerini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca, araştırmalar keçiboynuzu posası ununun yoğurda eklenmesinin probiyotiklerin hayatta kalmasını iyileştirdiğini ve antioksidan aktiviteyi arttırdığını göstermiştir. Bu nedenle keçiboynuzunun prebiyotik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Arab ve diğerleri, 2022; Ziar ve diğerleri, 2022).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Keçiboynuzu unu (KBU)

Keçiboynuzu unu (KBU), Türkiye'nin Antalya ilinin Alanya ilçesinde bulunan doğal gıda ürünleri üreticisinden ticari olarak satın alınmıştır. Analizlerde kullanılmak üzere 25°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar, cihazların özellikleri (Marka/Model) ve kullanım amaçları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihaz Adı	Marka/Model	Kullanım Amacı
Analitik Terazi	Mettler Toledo, MS105DU (± 0,00001 g)	KBU, KBU-probiyotik bakteri kapsülleri ve kimyasalların tartımında kullanılmıştır.
Çoklu Manyetik Karıştırıcı	Wisd, MS-MP8	Analizlerde gerekli olan çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)	Perkin Elmer, Spectrum 100	KBU, sterilize edilmiş KBU ve KBU-probiyotik bakteri kapsülleri ve pektinin yapı analizlerinde kullanılmıştır.
HPLC-DAD (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diod Serili Dedektör)	Agilent Technologies, 1200 Series	KBU ekstraktlarının fenolik bileşik içeriğinin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (devam)

Cihaz Adı	Marka/Model	Kullanım Amacı
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Are, Velp	Analizlerde gerekli olan çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
İnkübatör	Nüve S500, Memmert INB 400	Probiyotik bakteri kültürlerinin aktive edilmesi, geliştirilmesi ve mikrobiyolojik analizleri için kullanılmıştır.
Liyofilizatör	Labconco, FreeZone 2,5 Plus	KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin liyofilizasyonu için kullanılmıştır.
Otoklav	Nüve, SteamArt, OT 40L	Probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonu ve mikrobiyolojik analizlerinde gerekli olan tüm çözelti ve materyallerin sterilizasyonunda kullanılmıştır.
pH metre	Hanna, HI 221	Tampon çözeltilerin ve *in vitro* gastrointestinal sindirim ortamlarının hazırlanmasında ve KBU'nun asidik hidroliz içeren çözücü ekstraksiyonunda kullanılmıştır.
Saf Su Cihazı	Elga Purelab, Option Q DV25	Analizlerde gerekli olan saf su ve ultra saf su temini için kullanılmıştır.
Santrifüj	Hermle, Z 206 A	KBU ekstraktlarının spektroskopik ve kromatografik analizleri öncesi örnek hazırlama ve probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonu aşamalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (devam)

Cihaz Adı	Marka/Model	Kullanım Amacı
SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)	Carl ZEISS, EVO 40	KBU, sterilize edilmiş KBU ve KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin morfolojik analizlerinde kullanılmıştır.
Sıcaklık Programlı Çalkalayıcı	Mikrotest, MCI 55 D	Probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonunda ve *in vitro* gastrointestinal sindirim analizlerinde kullanılmıştır.
Ultrasonik Destekli Su Banyosu	ISOLAB, 621.06.003	KBU'nun ekstraksiyonunda ve probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonunda kullanılmıştır.
UV-GB Spektrofotometresi	Varian, Cary 50 Conc	KBU ekstraktlarının toplam fenolik madde, toplam flavonoid, kondanse tanen ve antioksidan aktivite değerlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.
Vorteks Karıştırıcı	Wisd, VM-10	KBU ekstraktlarının spektroskopik ve kromatografik analizlerinde, probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonunda ve mikrobiyolojik analizlerinde kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Marka	Katalog Numarası
1-bütanol	Sigma-Aldrich	101990
ABTS	Sigma-Aldrich	A1888
Apigenin	Sigma-Aldrich	A3145
Alüminyum klorür hekzahidrat	Merck	101084
Amonyum demir (II) sülfat hekzahidrat	J.T. Baker	0118
Asetonitril	ISOLAB	901037
Bakır (II) sülfat pentahidrat	Sigma-Aldrich	209198
Baryum klorür	Bostonchem	BBM802863
di-potasyum hidrojen fosfat	Merck	105104
Epigallokateşin gallat	Extrasynthese	0981 S
Epikateşin gallat	Extrasynthese	0978 S
Etanol	Merck	100983
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252
Formik asit	Merck	100264
Gallik asit	Sigma-Aldrich	27645
Hidroklorik asit	Merck	100314
Hiperozid	HWI	HWI00286-1
Kateşin	Extrasynthese	0976S
Kuersetin	Sigma-Aldrich	Q4951
Kuersitrin	HWI	HWI00330
Lacticaseibacillus rhamnosus	Chr. Hansen	3671822
Lacticaseibacillus paracasei	Chr. Hansen	3671291
Metanol	Merck	106007
MRS agar	Biokar	BK089HA

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar (devam)

Kimyasal Adı	Marka	Katalog Numarası
MRS broth	Biokar	BK070HA
Neohesperidin	BLD pharm	BD31760
Pankreatin	Sigma-Aldrich	P3292
Pektin	Sigma-Aldrich	P9135
Pepsin	Sigma-Aldrich	77160
Peptonlu su	Merck	107228
Potasyum di-hidrojen fosfat	ISOLAB	960066
Potasyum peroksidisülfat	Merck	105091
Safra tuzu	Edukim	F0499
Siringik asit	Sigma-Aldrich	63627
Sodyum asetat trihidrat	Merck	106265
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	795429
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich	791768
Sodyum klorür	ISOLAB	969036
Sodyum potasyum tartarat tetrahidrat	Sigma-Aldrich	217255
trans-sinnamik asit	Sigma-Aldrich	970130
Troloks	Sigma-Aldrich	238813

3.1.4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve özellikleri Çizelge 3.3 ’te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	Marka	Katalog Numarası	Özellikleri
AnaeroGen	Thermo Scientific	AN0025A	2,5 L
Otomatik pipet	Eppendorf	Z683809	10–100 µL
Otomatik pipet	Eppendorf	Z683825	100–1000 µL
Otomatik pipet	Eppendorf	Z683833	500–5000 µL

3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltiler

Çalışmada yer alan analizlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Analizlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Toplam fenolik madde analizi		
Folin çözeltisi	:	2N Folin-Ciocalteu reaktifi 3 kat saf su ile seyreltilmiştir.
Lowry A çözeltisi	:	1 M NaOH ve %2 (w/v) Na_2CO_3 içeren çözelti saf su ile hazırlanmıştır.
Lowry B çözeltisi	:	%1 (w/v) $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$ ve %0,5 (w/v) $CuSO_4.5H_2O$ içeren çözelti saf su ile hazırlanmıştır.
Lowry C çözeltisi	:	50:1 (v/v) oranında Lowry A ve Lowry B karıştırılarak hazırlanmıştır.
Gallik asit çözeltisi	:	Ana stok olarak 1000 ppm gallik asit çözeltisi metanol kullanılarak hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite analizi		
$ABTS^*$ radikal çözeltisi	:	7 mM ABTS ve 2,45 mM $K_2S_2O_8$ içeren çözelti saf su ile hazırlanmış ve 24 sa karanlıkta bekletilmiştir. Analizlerde 10 kat saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır.
Troloks çözeltisi	:	Ana stok olarak 1000 ppm troloks çözeltisi metanol kullanılarak hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
Alüminyum klorür yöntemi ile toplam flavonoid analizi		
$AlCl_3$ çözeltisi	:	%10 (w/v) $AlCl_3$ içeren çözelti $AlCl_3.6H_2O$ kullanılarak saf su ile hazırlanmıştır.
$NaC_2H_3O_2$ çözeltisi	:	1 M $NaC_2H_3O_2$ çözeltisi $NaC_2H_3O_2.3H_2O$ kullanılarak saf su ile hazırlanmıştır.
Kuersetin çözeltisi	:	Ana stok olarak 1000 ppm kuersetin çözeltisi metanol kullanılarak hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

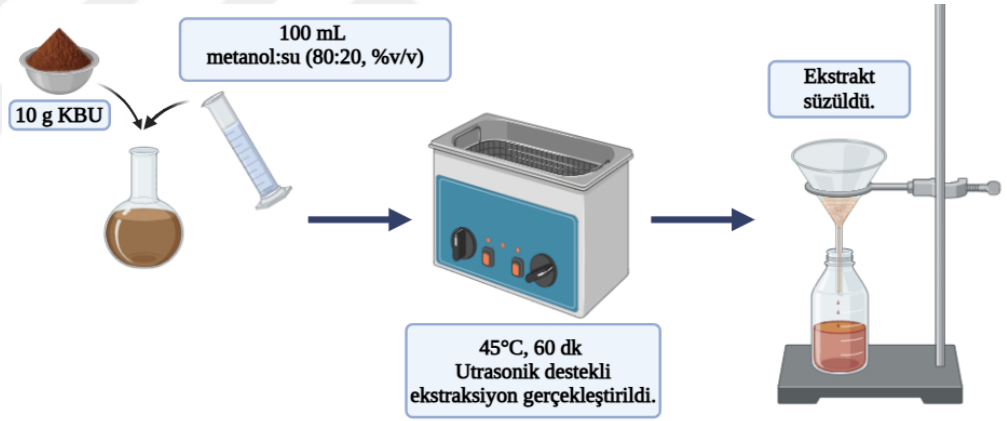
Çizelge 3.4. Analizlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları (devam)

Bütanol-HCl yöntemi ile kondanse tanen analizi		
HCl çözeltisi	:	12,06 M (%36, 1,18 g/mL) HCl kullanılarak saf su ile 2 M olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır.
$FeNH_4(SO_4)_2$ çözeltisi	:	%2 (w/v) $FeNH_4(SO_4)_2.6H_2O$ içeren çözelti 2 M HCl ile hazırlanmıştır.
1-bütanol-HCl çözeltisi	:	95:5 (v/v) oranında 1-bütanol ve derişik HCl karıştırılarak hazırlanmıştır.
Kateşin çözeltisi	:	Ana stok olarak 1000 ppm kateşin çözeltisi metanol kullanılarak hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
Kromatografik analizler için kalibrasyon çözeltileri		
Standart fenolik bileşiklerin metanol çözücüsü kullanılarak 100 ppm ana stok çözeltileri hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.		
***In vitro* gastrointestinal sindirim analizi**		
SGF ortamı	:	1 g NaCl ve 1,6 g pepsin sterilize edilmiş saf su içerisinde çözülerek toplam hacim 500 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Ortam pH'si, 0,2 N HCl kullanılarak 2,0±0,2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan SGF ortamı tek kullanımlık steril PVDF filtreden (0,45 µm) geçirilmiştir.
SIF ortamı	:	3,4 g KH_2PO_4, 38,5 mL 0,2 N NaOH çözeltisi, 0,625 g pankreatin ve 1,5 g safra tuzu sterilize edilmiş saf su içerisinde çözülerek toplam hacim 500 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Ortam pH'si, 0,2 N NaOH ve 0,2 N HCl kullanılarak 7,0±0,2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan SIF ortamı tek kullanımlık steril PVDF filtreden (0,45 µm) geçirilmiştir.

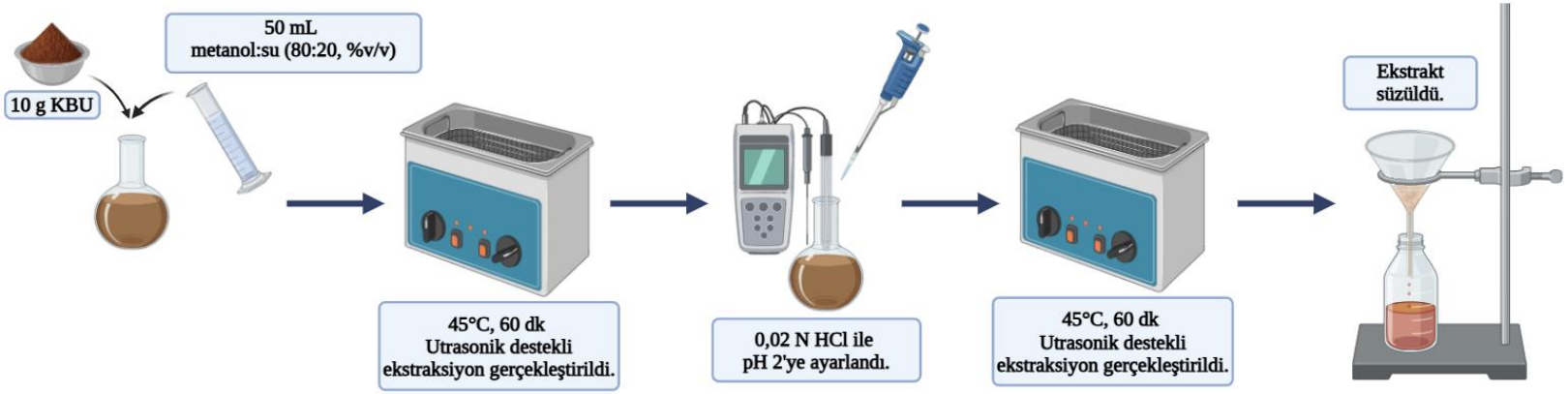
3.2. Yöntem

3.2.1. KBU ekstraksiyonu

Spektroskopik ve kromatografik analizler için KBU'nun çözücü olarak metanol-su (80:20, v/v) karışımları kullanılarak ultrasonik destekli ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri literatüre göre modifiye edilerek Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de verilen analiz şemalarına göre çözücü ekstraksiyonu ve asidik hidroliz içeren çözücü ekstraksiyonu olarak iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir (Şahin ve diğerleri, 2011; Karkar ve diğerleri, 2021). Ekstraktlar, analiz edilinceye kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. KBU'nun çözücü ekstraksiyonunun şematik gösterimi



Şekil 3.2. KBU'nun asidik hidroliz içeren çözücü ekstraksiyonunun şematik gösterimi

3.2.2. KBU ekstraktlarının spektroskopik analizleri

Toplam fenolik madde analizi

KBU ekstraktlarının toplam fenolik madde analizi Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Singleton ve diğerleri, 1999; Sarıburun ve diğerleri, 2010; Şahin ve diğerleri, 2015). Analiz tüplerindeki x mL KBU ekstraktı/standart üzerine 2-x mL saf su, 2,5 mL Lowry C çözeltisi ve 1/3 oranında seyreltilen 0,25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenip karıştırılarak karanlık ortamda 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda KBU ekstraktı/standart absorbansı UV-GB spektrofotometresi ile 750 nm'de ölçülmüştür. 1-60 ppm aralığında hazırlanan gallik asit çözeltilerinin absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş ve en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır. Hesaplanan doğru denklemi yardımıyla KBU ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g KBU olarak belirlenmiştir.

ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite analizi

KBU ekstraktlarının antioksidan aktivite analizi ABTS (2,2- azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) yöntemi ile belirlenmiştir (Re ve diğerleri, 1999; Şahin ve diğerleri, 2015). x mL KBU ekstraktı/standart, 4-x mL etanol ve 1 mL ABTS radikal çözeltisi ($ABTS^{*}$) analiz tüpüne eklenmiştir. Absorbans değeri, UV-GB spektrofotometresi ile 6 dk sonra 734 nm'de kaydedilmiştir ($A_{örnek}$). KBU ekstraktı/standart içermeyen analiz tüplerine 4 mL etanol ve 1 mL ABTS radikal çözeltisi ($ABTS^{*}$) eklenerek 6 dk sonra 734 nm'de absorbansı ölçülmüştür ($A_{kör}$). Ölçümler sonucunda KBU ekstraktı/standart için % inhibisyon değerleri Eşitlik 3.1'de gösterildiği gibi hesaplanmıştır. 0,3-10 ppm aralığında hazırlanan troloks çözeltilerinin absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş ve en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır. Hesaplanan doğru denklemi yardımıyla KBU ekstraktlarının antioksidan aktivite değeri mg troloks eşdeğeri (TE)/g KBU olarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{kör}-A_{örnek}}{A_{kör}} \times 100 \qquad (3.1)$$

Alüminyum klorür yöntemi ile toplam flavonoid analizi

KBU ekstraktlarının toplam flavonoid madde içeriği, alüminyum klorür kolorimetrik yöntemine göre belirlenmiştir (Chang ve diğerleri, 2002; Formagio ve diğerleri, 2014). Analiz tüplerine sırasıyla x mL KBU ekstraktı/standart, 3,3-x mL saf su, 1,5 mL %95'lik etanol, 0,1 mL %10'luk $AlCl_3$ çözeltisi ve 0,1 mL 1 M $NaC_2H_3O_2$ çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Analiz tüpleri 30 dk karanlıkta bekletilerek 415 nm'de UV-GB spektrofotometresi ile absorbans ölçümü alınmıştır ($A_{örnek}$). KBU ekstraktı/standart içermeyen analiz tüplerine 3,3 mL saf su, 1,5 mL %95'lik etanol, 0,1 mL %10'luk $AlCl_3$ çözeltisi ve 0,1 mL 1 M $NaC_2H_3O_2$ çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. 30 dk süre sonunda 415 nm'de absorbansı ölçülmüştür ($A_{kör}$). KBU ekstrakt/standart için absorbans değeri Eşitlik 3.2'de gösterildiği gibi hesaplanmıştır. 0,5-10 ppm aralığında hazırlanan kuersetin çözeltilerinin absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş ve en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır. Hesaplanan doğru denklemi yardımıyla KBU ekstraktlarının toplam flavonoid madde içeriği kuersetin eşdeğeri (QE)/g KBU olarak belirlenmiştir.

$$\text{Absorbans} = A_{örnek} - A_{kör} \tag{3.2}$$

Bütanol-HCl yöntemi ile kondanse tanen analizi

KBU ekstraktlarının kondense tanen analizi, bütanol-HCl yöntemi ile yapılmıştır (Giner-Chavez ve diğerleri, 1997). 6 mL 1-bütanol/HC1 (95:5, v/v) ve 0,2 mL %2'lik $FeNH_4(SO_4)_2$ çözeltisi analiz tüpündeki 0,1 mL KBU ekstraktı/standart içerisine eklenmiştir. 30 s karıştırıldıktan sonra 95°C'deki su banyosunda 50 dk bekletilmiştir. Beklemeden sonra örnekler oda sıcaklığına soğutularak UV-GB spektrofotometresi ile 550 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. 50-100 ppm aralığında hazırlanan kateşin çözeltilerinin absorbans değerleriyle kalibrasyon grafiği çizilmiş ve en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır. Hesaplanan doğru denklemi yardımıyla KBU ekstraktlarının kondanse tanen içeriği mg kateşin eşdeğeri (CE)/g KBU olarak belirlenmiştir.

3.2.3. KBU ekstraktlarının kromatografik analizi

KBU ekstraktlarının fenolik bileşik içeriklerinin kalitatif ve kantitatif analizi için HPLC-DAD cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz, otomatik örnekleyici, degazer, ikili pompa sistemi ve fotodiyot serili dedektör içermektedir. Analizlerde C18 (XBridge®, 3,5 µm, 4,6 x 250 mm) kolon kullanılmış, enjeksiyon hacmi 10 µL, akış hızı ise 0,5 mL/dk olarak ayarlanmıştır. %1'lik sulu formik asit ve asetonitrilden oluşan bir gradient hareketli faz programıyla ekstraktların analizi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. HPLC-DAD gradient hareketli faz programı

Süre (dk)	Hareketli faz bileşimi	
	%1'lik Formik asit (%)	Asetonitril (%)
0	90	10
10	87	13
20	58,5	41,5
25	30	70
35	90	10
36	90	10

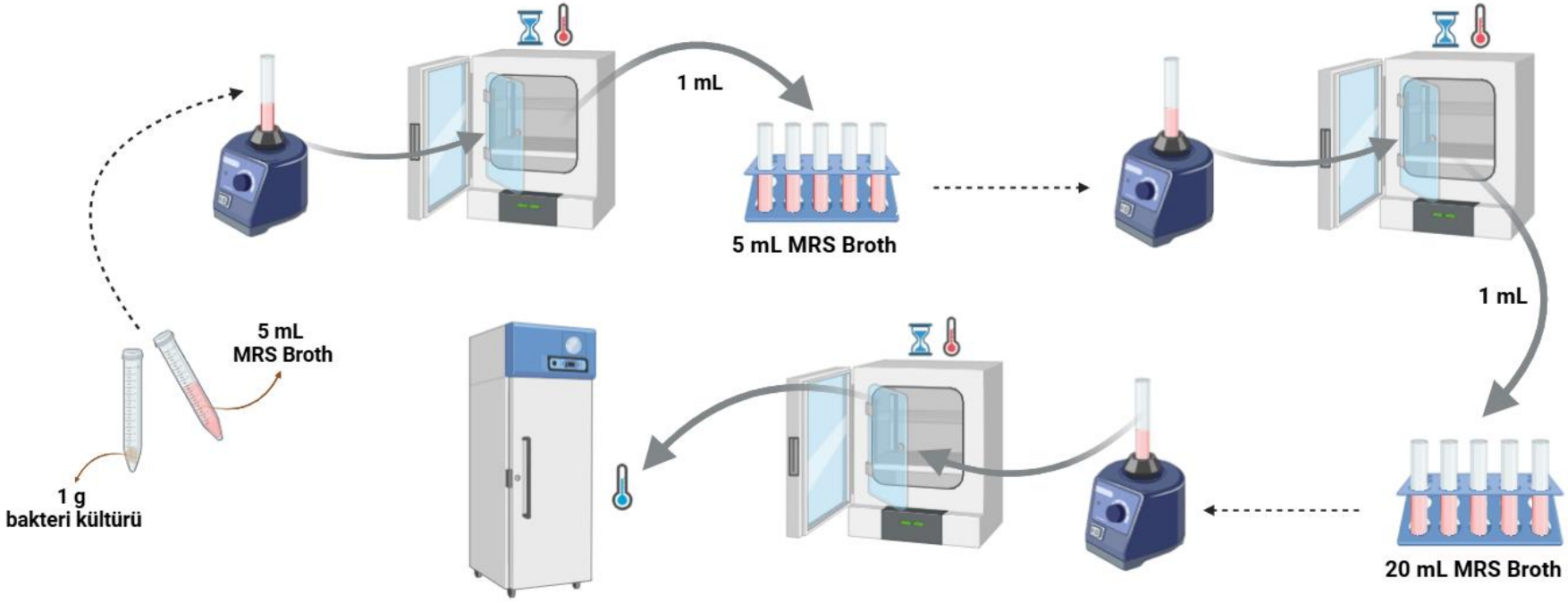
Standart fenolik bileşikler analiz edilerek alıkonma zamanları belirlenmiş ve 2-10 mg/L derişim aralığında kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Analiz edilen KBU ekstraktlarının kromatogramları incelenerek fenolik bileşik içeriği kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir (Şahin ve diğerleri, 2011; Karkar ve diğerleri, 2024a).

3.2.4. KBU sterilizasyonu

Enkapsülasyon işleminden önce kaplama materyali olarak kullanılacak olan KBU sterilize edilmiştir. Sterilizasyon süresi literatürde yapılan çalışmada belirlenen optimum süre olan 1 dk seçilmiş ve 121°C'de sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Karkar ve diğerleri, 2024b).

3.2.5. Probiyotik bakterilerin geliştirilmesi ve aktive edilmesi

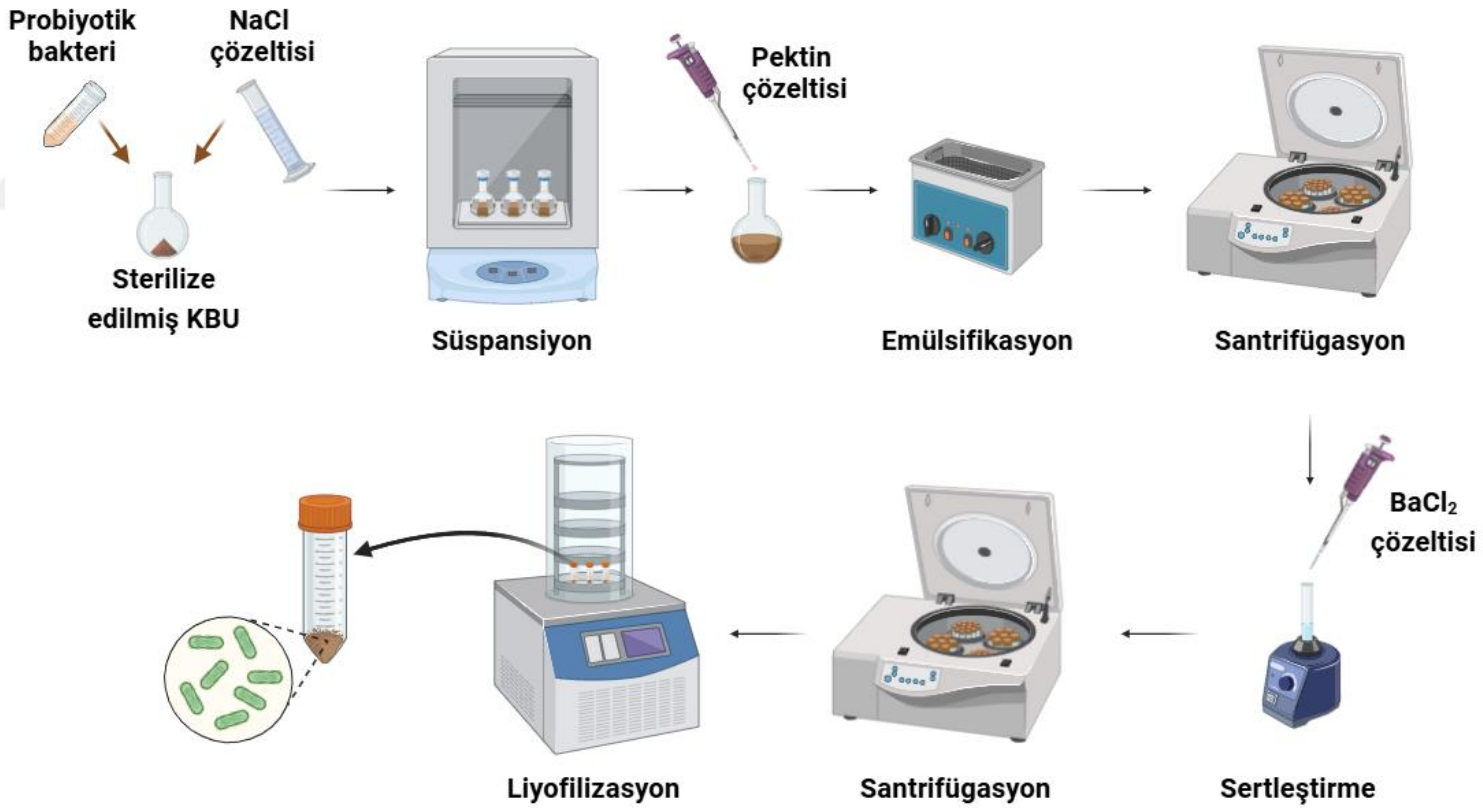
Probiyotik bakteri olarak laktik asit bakterilerinden *Lacticaseibacillus rhamnosus* (LGG) ve *Lacticaseibacillus paracasei* (L. CASEI 431) (Chr. Hansen A/S, Hørsholm, Danimarka) seçilmiştir. Tüm mikrobiyolojik çalışmalar biyolojik güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. De Man Rogosa ve Sharpe (MRS) Broth, MRS Agar, kullanılan tüm malzeme ve çözeltiler 121°C'de 15 dk boyunca sterilize edilmiştir. Şekil 3.3'te verilen analiz şemasına göre bakteriler, MRS Broth sıvı besiyerinde 3 kez inkübasyona bırakılarak aktive edilmiş ve geliştirilmiştir (24 sa, 37°C). Süre sonunda geliştirilen bakteri kültürleri -24°C'de depolanmıştır.



Şekil 3.3. Probiyotik bakterilerin geliştirilmesi ve aktive edilmesi

3.2.6. Probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonu

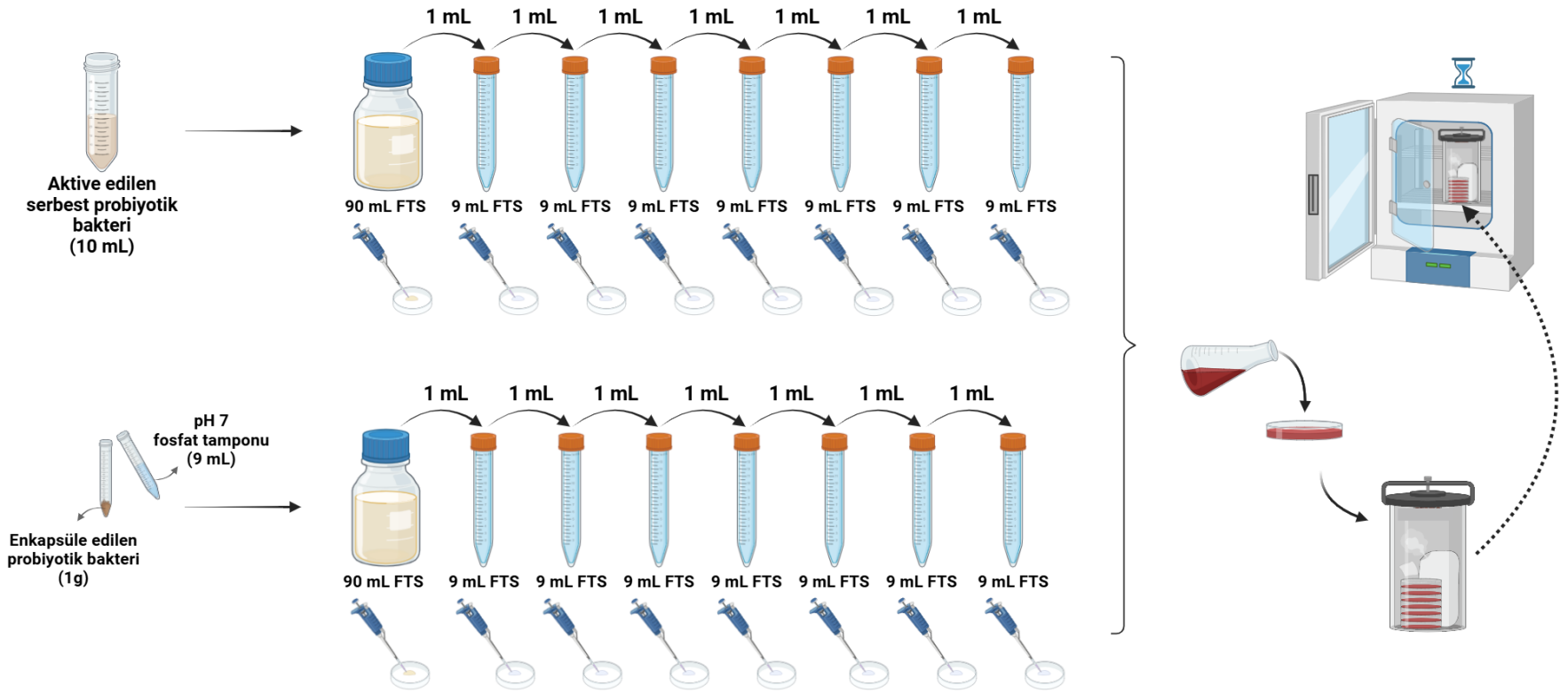
L. rhamnosus (LR) ve *L. paracasei* (LPC) probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsüle edilmesi emülsiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Probiyotik bakteriler enkapsülasyon işleminden 24 sa önce, stok bakteri kültürlerinden 1 mL alınarak 25 mL MRS Broth içerisinde 37°C'de aktive edilmiştir. Aktive edilen probiyotik bakteri kültürleri en az 10^6-10^7 kob/mL canlılığa sahip olacak şekilde (Gismondo ve diğerleri, 1999) (25 mL hacimde) KBU (sterilize edilmiş) üzerine eklenmiştir (Şekil 3.4). 50 mL NaCl çözeltisi (%0,5, w/v) ilave edildikten sonra sıcaklık programlı çalkalayıcıda (100 rpm) karıştırılmıştır. Daha sonra 2,5 mL pektin çözeltisi (%1, w/v) eklenerek ultrasonik banyoda (25°C, 20 dk) bekletilmiştir. Süre sonunda santrifüjleme (3000 rpm, 15 dk) işlemi ile süpernatant ayrılarak kapsüller 10 mL $BaCl_2$ çözeltisi (%0,5, w/v) içinde 30 dk karıştırılmıştır. İkinci kez santrifüjleme (3000 rpm, 15 dk) sonrası süpernatant dekante edilerek kapsüller liyofilize edilmiştir (-86°C, 0,1 mbar).



Şekil 3.4. Probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonu

3.2.7. Probiyotik bakterilerin mikrobiyolojik analizi

Serbest ve enkapsüle edilen LR ve LPC probiyotik bakterilerinin mikrobiyolojik analizi için dökme plaka yöntemi kullanılmıştır (Chandramouli ve diğerleri, 2004). Kapsüllerdeki probiyotik bakteri canlılıklarının belirlenmesi için kapsüllerin açılarak bakterilerin serbest hale getirilmesi gerekmektedir. Bunun için pH 7,0±0,2 fosfat tamponu (0,1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4) hazırlanarak sterilize edilmiştir. Kapsüller tampon içerisinde 30 dk boyunca bekletilerek 5 dk aralıklarla vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Serbest ve enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin fizyolojik tuzlu su (%0,85'lik NaCl çözeltisi, w/v) ile 10^{-1}-10^{-8} arası seri seyreltmeleri hazırlanmıştır. Her seri seyreltmeden 1 mL alınarak steril petri kaplarına mikrobiyolojik ekim gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Ekim sonrası petri kaplarına her birine yaklaşık 13 mL olacak şekilde MRS-Agar sıvı besiyeri eklenip karıştırılmıştır. Besiyerinin donmasının ardından petriler, AnaeroGen paketleriyle birlikte anaerobik kaplara ters bir şekilde yerleştirilmiştir. Kaplar 37°C'de 72 sa boyunca anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. Enkapsüle edilen probiyotik bakteri canlılığı gram başına koloni oluşturan birim (log kob/g) ve serbest probiyotik bakteri canlılığı mililitre başına koloni oluşturan birim (log kob/mL) olarak belirlenmiştir (Tharmaraj ve Shah, 2003; Karkar ve diğerleri, 2024b).



Şekil 3.5. Probiyotik bakterilerin mikrobiyolojik analizi

3.2.8. Enkapsülasyon koşullarının optimizasyonu

LR ve LPC probiyotik bakterilerin KBU ile yüksek verimle enkapsüle edilmesi için enkapsülasyon koşulları optimize edilmiştir. Optimizasyon için kemometrik yöntemlerden Box-Behnken Dizayn (BBD) kullanılmıştır. Buna göre karıştırma sıcaklığı (°C), karıştırma zamanı (dk) ve KBU miktarı (g) önemli faktörler olarak seçilmiştir. BBD için kullanılan faktörler ve kodlanmış seviye değerleri Çizelge 3.6'te verilmiştir.

Çizelge 3.6. BBD için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri

Faktörler	**Kodlanmış seviye değerleri**		
	-1	**0**	**1**
(x_1) Karıştırma sıcaklığı (°C)	25	30	35
(x_2) Karıştırma zamanı (dk)	15	45	75
(x_3) KBU miktarı (g)	1	2	3

BBD'de üç seviyeli, üç faktörlü ve merkez noktasında 5 tekrar içeren dizayn için deney sayısı (N) hesaplanmıştır (Eşitlik 3.3).

$$N = 2k(k\text{-}1) + C_k \tag{3.3}$$

k, faktör sayısını ve C_k, merkez noktaları ifade eder. Bu üç bağımsız faktörü optimize etmek için Çizelge 3.7'de verilen merkez noktasında beş tekrar içeren 17 deney (N=2.3(3-1)+5=17) ile BBD ile birleştirilmiş yanıt yüzey yöntemi (RSM-BBD) uygulanmıştır. Her iki probiyotik bakteri için yapılan 17 deney için enkapsülasyon verimi (Eşitlik 3.4) hesaplanmıştır. Yanıt değerleri için Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease Inc. USA) programı kullanılarak ANOVA analizi yapılmıştır.

$$\%\ \text{Verim} = \frac{\text{Enkapsüle edilen probiyotik bakteri sayısı (log kob/g)}}{\text{Serbest probiyotik bakteri sayısı (log kob/mL)}} \times 100 \tag{3.4}$$

Çizelge 3.7. BBD çizelgesi

Deney	Faktörler		
	x_1	x_2	x_3
	Karıştırma sıcaklığı (°C)	Karıştırma zamanı (dk)	KBU miktarı (g)
1	25	15	2
2	35	15	2
3	25	75	2
4	35	75	2
5	25	45	1
6	35	45	1
7	25	45	3
8	35	45	3
9	30	15	1
10	30	75	1
11	30	15	3
12	30	75	3
13	30	45	2
14	30	45	2
15	30	45	2
16	30	45	2
17	30	45	2

Deneysel verilerde ANOVA analizi gerçekleştirilerek ikinci dereceden denklem ile tahmini değerler hesaplanmıştır (Eşitlik 3.5).

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^{3} b_i x_i + \sum_{i=1}^{3} b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} b_{ij} x_i x_j \qquad (3.5)$$

y, yanıt; b_0, sabit terim; b_i, doğrusal etkileşim sabiti; b_{ii}, parabolik etkileşim sabiti; b_{ij}, parametre etkileşim sabiti, x_i ve x_j bağımsız faktörleri temsil etmektedir.

Her faktör için optimum değerler belirlenmiştir ve belirlenen optimum koşullarda 3 tekrarlı olarak enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilerek enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. Deneysel olarak belirlenen enkapsülasyon verimi model tarafından belirlenen tahmini verim değerleri ile karşılaştırılmıştır. RSM yöntemi kullanılarak faktörlerin ikili etkileşimlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkileri yanıt yüzey grafikleriyle değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasının ilerleyen tüm aşamalarında optimum koşullar altında elde edilen kapsüller kullanılmıştır.

3.2.9. KBU ve KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin fizikokimyasal analizleri

KBU ve KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin toplam şeker (AOAC 968.28 ve TS 1466'dan modifiye edilmiş), toplam yağ (TS EN ISO 659), toplam protein (AOAC 990.03), toplam diyet lif (AOAC 991.43), kuru madde ve nem (TS 1129 İSO 1026), ve titre edilebilir asitlik (TS 1125 ISO 750) analizleri hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. KBU'nun kül analizi (TS EN ISO 2171) Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Yemler ve Hayvan Besleme Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. KBU ve KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin karakterizasyonu

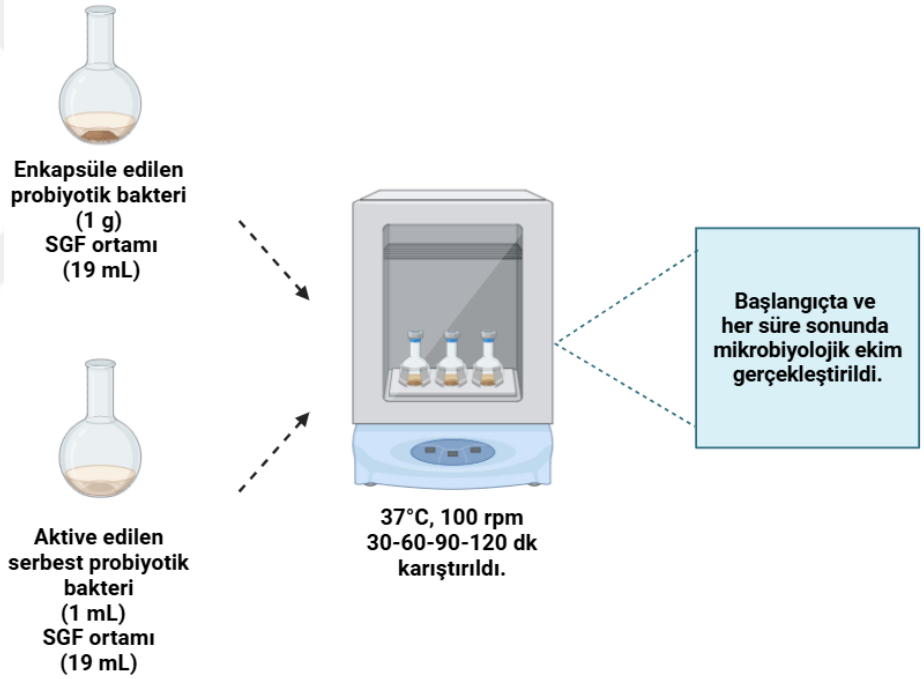
KBU, sterilize edilmiş (121°C, 1 dk) KBU, KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin morfolojik analizleri Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Mikroskopi Laboratuvarı'nda hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Pektin, KBU, sterilize edilmiş KBU, KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin yapısal karakterizasyonu için FTIR analizleri ise Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.11. Probiyotik bakterilerin *in vitro* gastrointestinal sindirimdeki canlılıkları

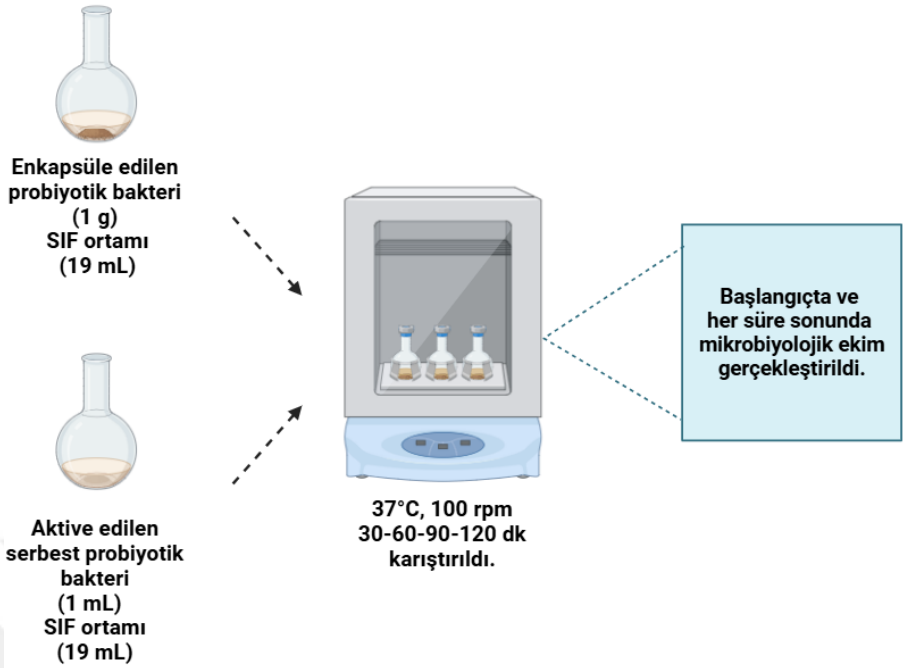
Serbest ve enkapsüle edilen LR ve LPC probiyotik bakterilerinin SGF ve SIF ortamlarındaki canlılıklarının incelenmesi, literatürdeki yöntemler modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Tipigil, 2015; Karkar ve diğerleri, 2024b). SGF ve SIF ortamları

analize başlamadan önce 37°C'de 1 sa boyunca karıştırılmıştır. Analiz sonunda mikrobiyolojik ekim için seyreltme çözeltisi olarak peptonlu su kullanılmıştır. Probiyotik bakterilerin SGF ortamındaki canlılıkları, Şekil 3.6'da SIF ortamındaki canlılıkları ise Şekil 3.7'de gösterilen analiz şemalarına göre incelenmiştir. Ayrıca, ardışık olarak SGF ve SIF ortamındaki canlılıkların değerlendirilmesi ise Şekil 3.8'deki analiz şeması doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. *In vitro* gastrointestinal sindirimin serbest ve enkapsüle edilen probiyotik bakteri canlılığı üzerindeki etkisi, Eşitlik 3.6 kullanılarak belirlenmiştir.

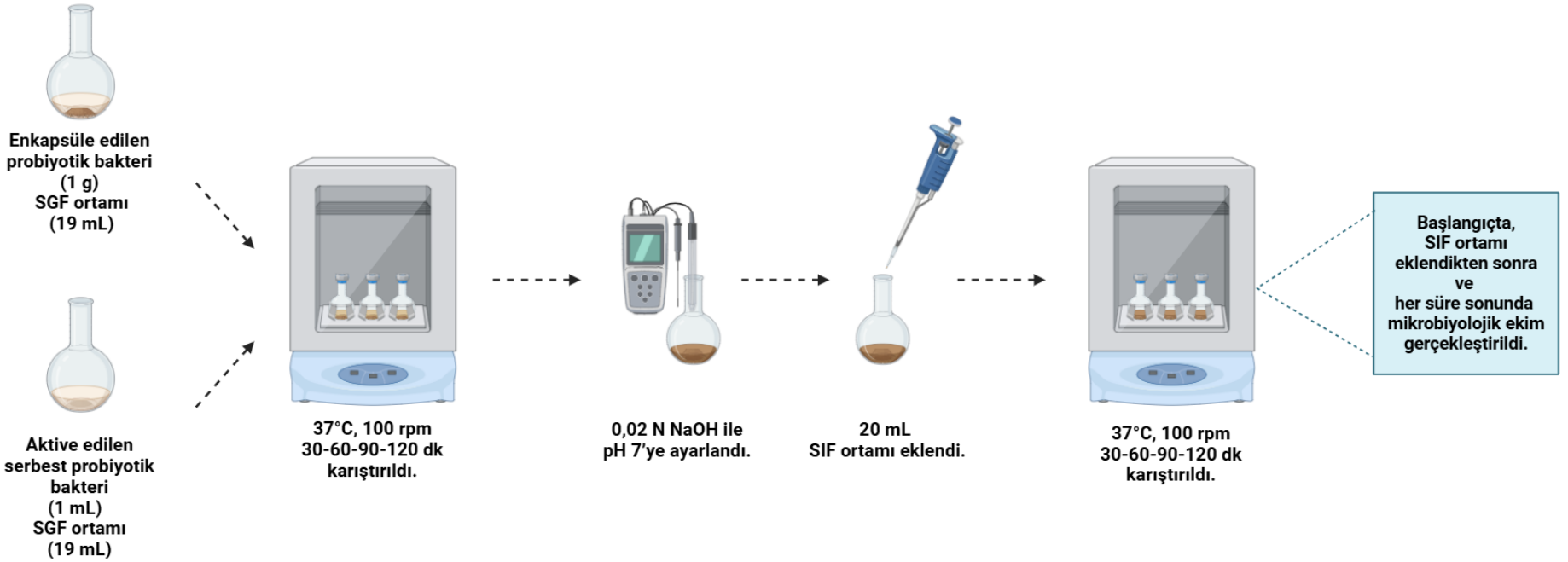
$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{\text{sindirim sonrası probiyotik bakteri sayısı}}{\text{başlangıç probiyotik bakteri sayısı}} \times 100 \qquad (3.6)$$



Şekil 3.6. SGF ortamında sindirimin analiz şeması



Şekil 3.7. SIF ortamında sindirimin analiz şeması



Şekil 3.8. Ardışık olarak SGF ve SIF ortamında sindirimin analiz şeması

3.2.12. Probiyotik bakterilerin depolama koşullarındaki canlılıkları

MRS Broth sıvı besiyeri içerisinde aktive edilen serbest LR ve LPC probiyotik bakterilerinin ve enkapsüle edilen LR ve LPC probiyotik bakterileri +24°C, +4°C ve -24°C olmak üzere 3 farklı sıcaklık koşulunda 28 gün boyunca depolanmıştır. Probiyotik bakterilerin mikrobiyolojik analizleri depolamanın 0., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde gerçekleştirilmiştir. Depolama sürecinin serbest ve enkapsüle edilen probiyotik bakteri canlılığı üzerindeki etkisi, Eşitlik 3.7 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{\text{depolama sonrası probiyotik bakteri sayısı}}{\text{başlangıç probiyotik bakteri sayısı}} \times 100 \qquad (3.7)$$

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Spektroskopik Bulgular

KBU'nun metanol-su kullanılarak elde edilen çözücü ve asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktları için Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde, ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite, alüminyum klorür yöntemi ile toplam flavonoid ve bütanol-HCl yöntemi ile kondanse tanen analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarının mg/g KBU cinsinden hesaplanabilmesi için, her bir yönteme ait standart eşdeğeri kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş ve en küçük kareler yöntemiyle Çizelge 4.1'de verilen doğru denklemleri elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. Spektroskopik yöntemler için kalibrasyon verileri

Yöntem	Konsantrasyon aralığı (mg/L)	Doğru Denklemi	Korelasyon katsayısı (R^2)
Toplam fenolik madde	1-60	y = 0,0314x - 0,0015	0,9978
Antioksidan aktivite	0,3-10	y = 8,8122x - 2,2937	0,9981
Toplam flavonoid	0,5-10	y = 0,1053x - 0,0061	0,9996
Kondense tanen	50-100	y = 0,0033x - 0,0714	0,9942

KBU'nun çözücü ve asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktlarının spektroskopik analizleri sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.2'de verilmiştir. Elde edilen veriler (mg/g KBU) MİNİTAB 17.0 (Minitab Inc., State College, PA) istatistik programı kullanılarak tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir. Ekstraktların her bir yöntem için ayrı olarak $p<0,01$ düzeyinde karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir.

KBU'nun toplam fenolik madde içeriği çözücü ekstraktında 33,99±0,11 mg GAE/g KBU iken asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktında 44,70±0,89 mg GAE/g KBU olarak belirlenmiştir. KBU'nun antioksidan aktivite değeri çözücü ekstraktında 34,14±0,95 mg TE/g KBU olarak bulunurken asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktında 43,84±1,12 mg

TE/g KBU olarak bulunmuştur. KBU'nun toplam flavonoid içeriği çözücü ekstraktında 0,60±0,04 mg QE/g KBU, asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktında 0,73±0,01 mg QE/g KBU olarak tespit edilmiştir. KBU'nun kondanse tanen içeriği ise çözücü ekstraktında 37,07±1,90 mg CE/g KBU olarak elde edilirken asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktında 55,05±2,00 mg CE/g KBU olarak belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde KBU'nun toplam fenolik madde, antioksidan aktivite, toplam flavonoid ve kondanse tanen içeriklerinin asidik hidroliz ile artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. KBU ekstraktlarının spektroskopik analiz sonuçları

Ekstrakt türü	Toplam fenolik madde$^{\gamma}$	Antioksidan aktivite$^{\varphi}$	Toplam flavonoid$^{\Psi}$	Kondanse tanen$^{\phi}$
Ç	33,99±0,11^{b,B}	34,14±0,95^{b,B}	0,60±0,04^{c,A}	37,07±1,90^{a,B}
Ç-AH	44,70±0,89^{b,A}	43,84±1,12^{b,A}	0,73±0,01^{c,A}	55,05±2,00^{a,A}

*ortalama±standart sapma (iki tekrar)
$^{\gamma}$mg GAE/g KBU, $^{\varphi}$mg TE/g KBU, $^{\Psi}$mg QE/g KBU, $^{\phi}$mg CE/g KBU
Ç: çözücü, Ç-AH: çözücü-asidik hidroliz, GAE: gallik asit eşdeğeri, TE: troloks eşdeğeri, QE: kuersetin eşdeğeri, CE: kateşin eşdeğeri
a-c: Küçük harfler her bir ekstrakt türündeki farklı yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı grupları göstermektedir (p<0,01).
A-B: Büyük harfler her bir yöntemdeki farklı ekstrakt türleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı grupları göstermektedir (p<0,01).

Goulas ve Georgiou (2020) tarafından yapılan bir çalışmada keçiboynuzundan fenolik antioksidanların ekstraksiyonu için farklı çözücülerin kullanıldığı ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. *Tylliria* türü için metanol:su:asit (80:19:1, v/v/v) çözücü sisteminde toplam fenolik madde miktarı 288,4±19,4 mg GAE/100 g örnek, toplam flavonoid miktarı 70,5±1,8 mg CE/100 g örnek olarak bulunurken, *Koumbota* türü için toplam fenolik madde miktarı 343,2±33,7 mg GAE/100 g örnek, toplam flavonoid miktarı 38,8±3,0 mg CE/100 g örnek olarak bulunmuştur. Metanol:su (80:20, v/v) çözücü sisteminde ise *Tylliria* türü için toplam fenolik madde miktarı 342,2±9,4 mg GAE/100 g örnek, toplam flavonoid miktarı 49,3±1,4 mg CE/100 g örnek olarak tespit edilirken, *Koumbota* türü için toplam fenolik madde miktarı 228,4±25,8 GAE/100 g örnek, toplam flavonoid miktarı 20,8±1,6 mg CE/100 g örnek olarak tespit edilmiştir.

Capcanari vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışma, farklı tarihlerde hasat edilen Moldavya keçiboynuzu tohum ve kabuk posasının, biyolojik olarak aktif potansiyelini Cezayir, İspanya ve İtalya'da yetişen keçiboynuzu ile karşılaştırmalı olarak ilk kez incelemiştir. Keçiboynuzu tozu (tohum ve kabuk posası) ve metanol, 1:1 oranında karıştırılmış ve karışım saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. 37°C'de 24 sa bekletilen karışımlar santrifüjlenmiş ve filtrelenmiştir. Moldova keçiboynuzu örneklerindeki toplam fenolik bileşik içeriği tohum için 27,75 mg GAE/g, kabuk posa için 30,56 mg GAE/g ve antioksidan aktivitesi tohum için 22,84 mg TE/g, kabuk posa için 25,52 mg TE/g olarak bulunmuştur. İspanya, İtalya ve Cezayir keçiboynuzu tohum örneklerinin ise toplam fenolik bileşik içerikleri sırasıyla 22,72 mg GAE/g, 23,94 mg GAE/g ve 25,15 mg GAE/g olarak, antioksidan aktiviteleri ise sırasıyla 19,87 mg TE/g, 21,42 mg TE/g ve 21,79 mg TE/g olarak bulunmuştur.

Literatürde yer alan Richane vd. (2022) tarafından yapılan başka bir çalışmada, Tunus'un farklı coğrafi bölgelerinden toplanan *Ceratonia siliqua* L. meyve posası örneklerinin biyoaktif fitokimyasal içeriği incelenmiştir. %80'lik sulu metanol ile 30 dk homojenize edilen meyve posası filtre kâğıdı ile süzülmüştür. Süzüntü vakum altında 45°C'de konsantre edilerek, metanol içinde yeniden çözülmüştür. Elde edilen ekstraktın toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve kondanse tanen içeriği belirlenmiştir. Bulgular, toplam fenolik madde ve flavonoid içeriklerinin Kairouan bölgesinde en yüksek seviyede olduğunu (sırasıyla 23,11 mg GAE/g kuru madde ve 10,58 mg CE/g kuru madde), en yüksek kondanse tanen içeriğinin ise Beja bölgesinden elde edildiğini (3,75 mg CE/g kuru madde) göstermiştir.

Başka bir çalışmada (Antoniou ve diğerleri, 2023) toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde keçiboynuzu unu metanol:su:asetat (50:49,5:0,5, v/v/v) çözücü karışımında 24 sa boyunca, karanlıkta ve 4°C'de ekstrakte edilmiştir. Kondanse tanen içeriğinin belirlenmesi ise, keçiboynuzu ununun Vanilin yöntemi kullanılarak metanol:su:asit (50:40:10, v/v/v) çözücü karışımında ekstrakte edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışma, aşısız materyalden elde edilen keçiboynuzu ununun (2018 için 39,99±6,88 g GAE/kg kuru madde, 2019 için 32,92±7,90 g GAE/kg kuru madde) aşılı materyale göre (2018 için 33,39±1,89 g GAE/kg kuru madde, 2019 için 24,36±1,61

g GAE/kg kuru madde) daha fazla fenolik madde içeriği sunduğunu, ancak bu farkların çevresel koşullardaki varyasyon nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermiştir. Tanenler açısından ise, aşılı (2018 için 4,87±0,32 mg CE/g kuru madde, 2019 için 2,46±0,23 mg CE/g kuru madde) ve aşısız (2018 için 4,70±0,91 mg CE/g kuru madde, 2019 için 2,75±0,92 mg CE/g kuru madde) materyal arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, aşılı materyalin fenolik madde ve tanen içerikleri her iki yıl boyunca anlamlı bir korelasyon gösterirken, aşısız materyalde bu korelasyon gözlemlenmemiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğu sonucuna varılmaktadır. Keçiboynuzunun biyolojik olarak aktif bileşikler açısından bölgesel farklılıklar gösterdiğini ve her bölgedeki keçiboynuzunun potansiyelinin ayrı ayrı değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, keçiboynuzunun biyolojik olarak aktif bileşenlerinin verimli bir şekilde ekstrakte edilmesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri ve çözücü parametrelerinin (çözücü tipi, sıvı/katı oranı, sıcaklık, zaman) büyük önemi vardır (Zahorec ve diğerleri, 2023). Bu bulgular hem bölgesel hem de yöntemsel faktörlerin dikkate alınarak optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir.

4.2. Kromatografik Bulgular

KBU ekstraktlarının HPLC-DAD ile kromatografik analizleri gerçekleştirilmiştir. KBU ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin mg/g KBU olarak tespit edilebilmesi için her bir standart bileşiğin en küçük kareler yöntemiyle kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve validasyon parametreleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Fenolik bileşiklerin HPLC-DAD validasyon parametreleri

Fenolik bileşik	Dalga boyu (nm)	Alıkonma zamanı (dk)	Konsantrasyon aralığı (mg/L)	Kalibrasyon denklemi	Korelasyon katsayısı (R^2)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
GA	280	7,312	2-10	y = 37,783x - 32,443	0,9986	0,05	0,16
EPGCG	280	20,425	2-10	y = 15,565x - 13,41	0,9965	0,06	0,19
SA	280	22,659	2-10	y = 72,785x - 5,31	0,9956	0,03	0,09
EPCG	280	23,325	2-10	y = 29,795x - 10,49	0,9928	0,07	0,25
NH	280	24,579	2-10	y = 28,735x - 4,01	0,9974	0,03	0,10
TCA	280	29,385	2-10	y = 391,25x - 318,46	0,9968	0,01	0,03
HYP	360	22,819	2-10	y = 43,215x - 8,61	0,9970	0,03	0,09
QU	360	24,092	2-10	y = 35,13x + 8,34	0,9946	0,06	0,20
APİ	360	29,101	2-10	y = 39,03x + 0,98	0,9907	0,03	0,09

LOD: tespit sınırı, LOQ: tayin sınırı, GA: gallik asit, EPGCG: epigallokateşin gallat, SA: siringik asit, EPCG: epikateşin gallat, NH: neohesperidin, TCA: *trans*-sinnamik asit, HYP: hiperozid, QU: kuersitrin, APİ: apigenin

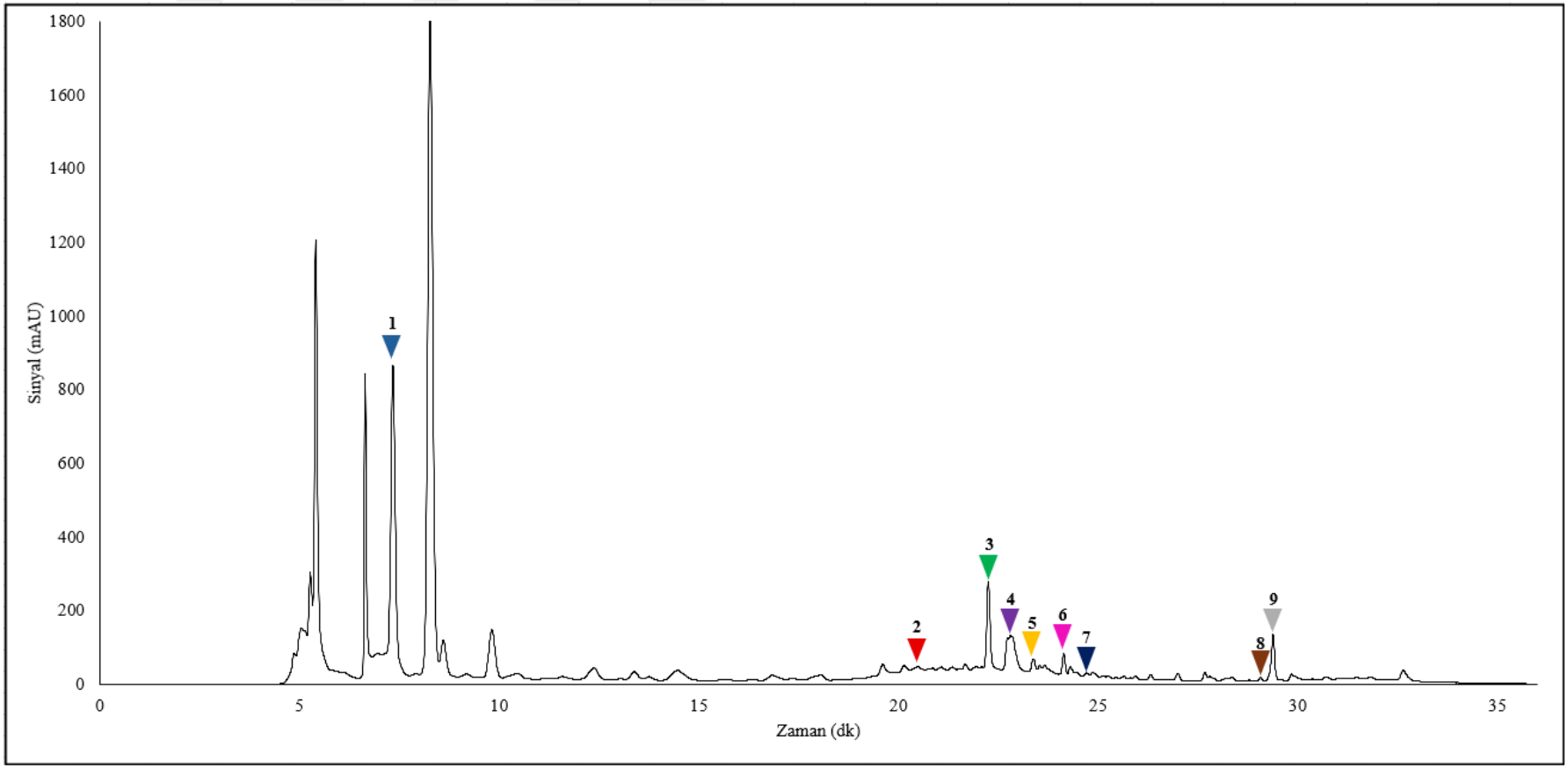
KBU ekstraktlarının kromatografik analizleri sonucunda elde edilen veriler (mg/g KBU) MİNİTAB 17.0 (Minitab Inc., State College, PA) istatistik programı kullanılarak tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir (Çizelge 4.4). Ekstraktların her bir fenolik bileşik için ayrı olarak $p<0,01$ düzeyinde karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir.

KBU'nun çözücü ekstraktının 280 nm'de alınan kromatogramı Şekil 4.1'de, asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktının 280 nm'de alınan kromatogramı Şekil 4.2'de verilmiştir. KBU çözücü ve asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktlarında toplam 9 fenolik bileşik (gallik asit, epigallokateşin gallat, siringik asit, epikateşin gallat, neohesperidin, *trans*-sinnamik asit, hiperozid, kuersitrin ve apigenin) tespit edilmiştir. Gallik asit, her iki ekstrakt türünde de en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşik olarak tespit edilmiştir. Çözücü ekstraktında *trans*-sinnamik asit (0,04±0,01 mg/g KBU), hiperozid (0,27±0,01 mg/g KBU) ve kuersitrin (0,17±0,01 mg/g KBU) asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktına göre daha yüksek miktarda bulunmuştur. Asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktında ise gallik asit (2,54±0,04 mg/g KBU), epigallokateşin gallat (0,88±0,01 mg/g KBU), siringik asit (0,38±0,01 mg/g KBU) ve epikateşin gallat (0,09±0,01 mg/g KBU) çözücü ekstraktına göre daha yüksek miktarda tespit edilmiştir. Apigenin (0,01±0,01 mg/g KBU) ve neohesperidin (0,12±0,01 mg/g KBU) çözücü ve asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktlarında eşit miktarda bulunmuştur.

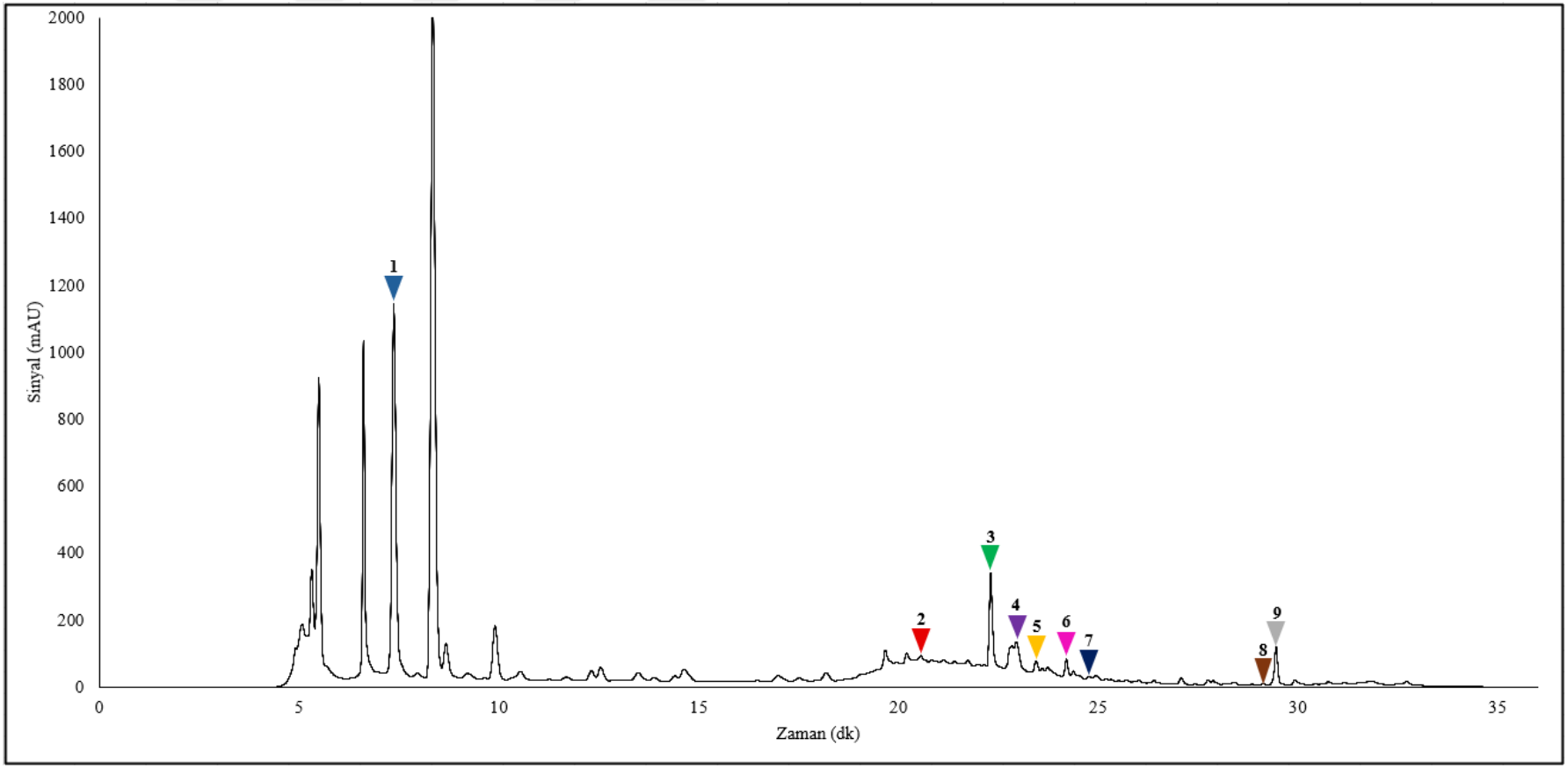
Çizelge 4.4. KBU ekstraktlarının fenolik bileşik içeriği (mg/g KBU)

Fenolik bileşik	Ç	Ç-AH
GA	2,18±0,01^{a,B}	2,54±0,04^{a,A}
EPGCG	0,66±0,02^{b,B}	0,88±0,01^{b,A}
SA	0,34±0,01^{c,B}	0,38±0,01^{c,A}
EPCG	0,07±0,01^{g,B}	0,09±0,01^{g,A}
NH	0,12±0,01^{f,B}	0,12±0,01^{f,A}
TCA	0,04±0,01^{h,A}	0,03±0,01^{h,B}
HYP	0,27±0,01^{d,A}	0,24±0,01^{d,B}
QU	0,17±0,01^{e,A}	0,16±0,01^{e,B}
APİ	0,01±0,01^{ı,A}	0,01±0,01^{h,B}

*ortalama±standart sapma (iki tekrar)
Ç: çözücü, Ç-AH: çözücü-asidik hidroliz, GA: gallik asit, EPGCG: epigallokateşin gallat, SA: siringik asit, EPCG: epikateşin gallat, NH: neohesperidin, TCA: *trans*-sinnamik asit, HYP: hiperozid, QU: kuersitrin, APİ: apigenin
a-ı: Küçük harfler her bir ekstrakt türündeki farklı fenolik bileşikler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı grupları göstermektedir (p<0,01).
A-B: Büyük harfler her bir fenolik bileşiğin farklı ekstrakt türleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı grupları göstermektedir (p<0,01).



Şekil 4.1. KBU'nun çözücü ekstraktının kromatogramı (280 nm) (1: gallik asit, 2: epigallokateşin gallat, 3: siringik asit, 4: hiperozid, 5: epikateşin gallat, 6: kuersitrin, 7: neohesperidin, 8: apigenin, 9: *trans*-sinnamik asit



Şekil 4.2. KBU'nun asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktının kromatogramı (280 nm) (1: gallik asit, 2: epigallokateşin gallat, 3: siringik asit, 4: hiperozid, 5: epikateşin gallat, 6: kuersitrin, 7: neohesperidin, 8: apigenin, 9: *trans*-sinnamik asit

Literatürde yapılan bir çalışmada (Ioannou ve diğerleri, 2023) keçiboynuzu örneklerinin (keçiboynuzu posa, toz ve şurup) fenolik profilleri üzerindeki termal işlemin etkisi HPLC-DAD ile değerlendirilmiştir. Farklı coğrafi kökenlere ait örneklerde gallik asit (0,23±0,01 mg/g ve 0,99±0,03 mg/g aralığında) ve rutin (0,21±0,03 mg/g ve 0,89±0,06 mg/g aralığında) en çok bulunan fenolik bileşikler olarak tespit edilmiştir. Kavrulmuş keçiboynuzu posası ve tozlarında hücresel yapının bozulması ile bağlı fenolik bileşikler serbest kalıp fenolik bileşiklerin miktarı artarken, termal işlem görmüş şuruplarda fenolik bileşiklerin miktarının azaldığı belirlenmiştir. Keçiboynuzu posasındaki kuersitrin konsantrasyonu (0,04±0,00 mg/g), kavurma sırasında (0,34±0,02 mg/g) yaklaşık 10 kat artmıştır. Termal işlem görmüş keçiboynuzu şurubunda ise tespit edilememiştir.

Başka bir çalışmada (Richane ve diğerleri, 2022) Tunus'taki on farklı coğrafi bölgeden toplanan keçiboynuzu meyvesinin posaları ile hazırlanan sulu metanol (80%, v/v) ekstraktları bir RP-HPLC ile analiz edilmiştir. Gallik asidin (501,26±1,23 mg/kg ve 1628,46±0,4 mg/kg aralığında) tüm incelenen ekstraktlarda ana fenolik bileşik olduğu belirtilmiştir. Siringik asit ve apigenin en düşük Bizerte bölgesinde sırasıyla 33,43±0,07 mg/kg ve 194,66±1,02 mg/kg olarak tespit edilirken, en yüksek Kairouan bölgesinde sırasıyla 198,57±1,02 mg/kg ve 696,12±1,23 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Epikateşin-3-O-gallat ise en düşük Kairouan bölgesinde (29,63±0,25 mg/kg), en yüksek Nabeul bölgesinde (79,31±0,21 mg/kg) bulunmuştur. *trans*-sinnamik asit sadece Bizerte ve Beja (sırasıyla 10,37±0,04 mg/kg ve 8,96±0,04 mg/kg) bölgelerinde tespit edilmiştir. Sonuçlar fenolik bileşik konsantrasyonlarının coğrafi kökene göre önemli ölçüde değişiklik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Torun vd. (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada doğal keçiboynuzu kabuğu unu (CPF) ve ticari keçiboynuzu kabuğu unu (CCPF) olmak üzere iki farklı keçiboynuzu ürününde, serbest fenolik asit, metanol-çözünebilen fenolik ester ve metanol-çözünebilen fenolik glikozit fraksiyonlarında bulunan fenolik asitler, HPLC-MS kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir. Çalışmada, gallik asit en fazla bulunan fenolik asit olarak tespit edilmiştir ve CPF 85,2±6,5 µg/g ve 91,3±3,5 µg/g aralığında, CCPF 135±17 µg/g ve 166±6 µg/g aralığında tüm fraksiyonlarda en yüksek konsantrasyona sahip olmuştur. CPF fraksiyonlarına ait siringik asit içerikleri 0,50±0,02 µg/g ve 2,3±0,1 µg/g aralığında

değişirken, CCPF fraksiyonlarındaki siringik asit içerikleri 0,32±0,03 µg/g ve 2,5±0,1 µg/g aralığında değişiklik göstermiştir.

Cervenka vd. (2022) tarafından gerçekleştirilen keçiboynuzu tozunun titreşimli bir öğütücüde 30, 60, 90, 120 ve 180 s boyunca öğütülmesinin etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada öğütme sonrası keçiboynuzu tozunun %90 (v/v) metanol ve formik asit içeren çözelti ile ultrasonik destekli ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. HPLC-DAD ile analiz edilen ekstraktlarda fenolik asitler (vanilik, ferulik, sinnamik asit) ve flavonoidler (luteolin, naringenin, apigenin) tespit edilmiştir. En yüksek fenolik bileşik sinnamik asit (54,28±1,42 µg/g), en düşük fenolik bileşik apigenin (2,27±0,04 µg/g) olarak belirlenmiştir. Öğütme süresi, fenolik bileşiklerin içeriklerini etkilemiş ve maksimum değerler 180 s öğütme süresi ile elde edilmiştir.

Keçiboynuzu ürünlerinde yapılan fenolik bileşik analizleri hem ekstraksiyon yöntemlerinin hem de coğrafi köken ve işlem koşullarının fenolik bileşik içerikleri üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada gallik asit en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşik olarak öne çıkarken, gallik asidin keçiboynuzu ürünlerinde yaygın ve baskın bir fenolik bileşik olduğu literatürde sıklıkla rapor edilmiştir. Bu bulgular, keçiboynuzunun fenolik bileşik profilinin optimize edilebilir olduğunu ve işleme koşullarının bileşiklerin biyoyararlanımını artırmak için önemli bir araç sunduğunu ortaya koymaktadır.

4.3. Probiyotik bakterilerin KBU ile enkapsülasyonunun optimizasyonu

LR ve LPC probiyotik bakterilerinin KBU ile yüksek verimle enkapsüle edilmesi için enkapsülasyon koşulları optimize edilmiştir. Optimum enkapsülasyon koşullarının belirlenmesi amacıyla deneysel parametreler (bkz. Çizelge 3.7) belirtilen analiz şemasına göre (bkz. Şekil 3.4) uygulanmıştır. Elde edilen kapsüllerin probiyotik bakteri sayımları yapılarak enkapsülasyon verimleri (%) hesaplanmış ve bu verimler ile Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease Inc., ABD) programı kullanılarak ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.5'te verilen ANOVA sonuçlarına dayanarak, LR ve LPC probiyotik bakterileri için ikinci dereceden polinom denklemleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.6). Enkapsülasyon

işlemi sonucu elde edilen deneysel enkapsülasyon verimi (%) ve ANOVA analizi ile belirlenen tahmini enkapsülasyon verimi (%) Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. ANOVA analizi sonuçları

Kaynak	LR (R^2 = 0,9629)					LPC (R^2 = 0,9822)				
	SS	**DF**	**MS**	**F değeri**	***p*-değeri**	**SS**	**DF**	**MS**	**F değeri**	***p*-değeri**
Model	201,21	9	22,36	20,21	0,0003	229,29	9	25,48	43,00	<0,0001
x_1	21,68	1	21,68	19,60	0,0031	1,26	1	1,26	2,13	0,1875
x_2	7,13	1	7,13	6,44	0,0388	60,56	1	60,56	102,9	<0,0001
x_3	2,74	1	2,74	2,48	0,1597	119,74	1	119,74	202,07	<0,0001
x_1x_2	47,27	1	47,27	42,73	0,0003	16,20	1	16,20	27,34	0,0012
x_1x_3	35,52	1	35,52	32,11	0,0008	1,09	1	1,09	1,84	0,2167
x_2x_3	1,69	1	1,69	1,53	0,2563	5,34	1	5,34	9,01	0,0199
x_1^2	23,26	1	23,26	21,03	0,0025	19,87	1	19,87	33,54	0,0007
x_2^2	18,66	1	18,66	16,87	0,0045	0,42	1	0,42	0,71	0,4288
x_3^2	47,46	1	47,46	42,90	0,0003	4,13	1	4,13	6,96	0,0335
Residual	7,74	7	1,11			4,15	7	0,59		
Lack of fit	6,12	3	2,04	5,03	0,0763	0,91	3	0,30	0,38	0,7753
Pure error	1,62	4	0,41			3,23	4	0,81		

x_1: karıştırma sıcaklığı (°C), x_2: karıştırma zamanı (dk), x_3: KBU miktarı (g), SS: karelerin toplamı, DF: serbestlik derecesi, MS: ortalamaların karesi, LR: *L. rhamnosus,* LPC: *L. paracasei*

Çizelge 4.6. LR ve LPC probiyotik bakterilerinin ikinci dereceden polinom denklemleri

Yanıt	**İkinci dereceden polinom denklemi**
Enkapsülasyon verimi (%) (LR)	$y = 73{,}67 - 1{,}65x_1 + 0{,}94x_2 - 0{,}59x_3 + 3{,}44x_1x_2 - 2{,}98x_1x_3 - 2{,}35x_1^2 - 2{,}11x_2^2 + 3{,}36x_3^2$
Enkapsülasyon verimi (%) (LPC)	$y = 73{,}66 + 0{,}40x_1 - 2{,}75x_2 - 3{,}87x_3 - 2{,}01x_1x_2 - 1{,}16x_2x_3 - 2{,}17x_1^2 - 0{,}99x_3^2$

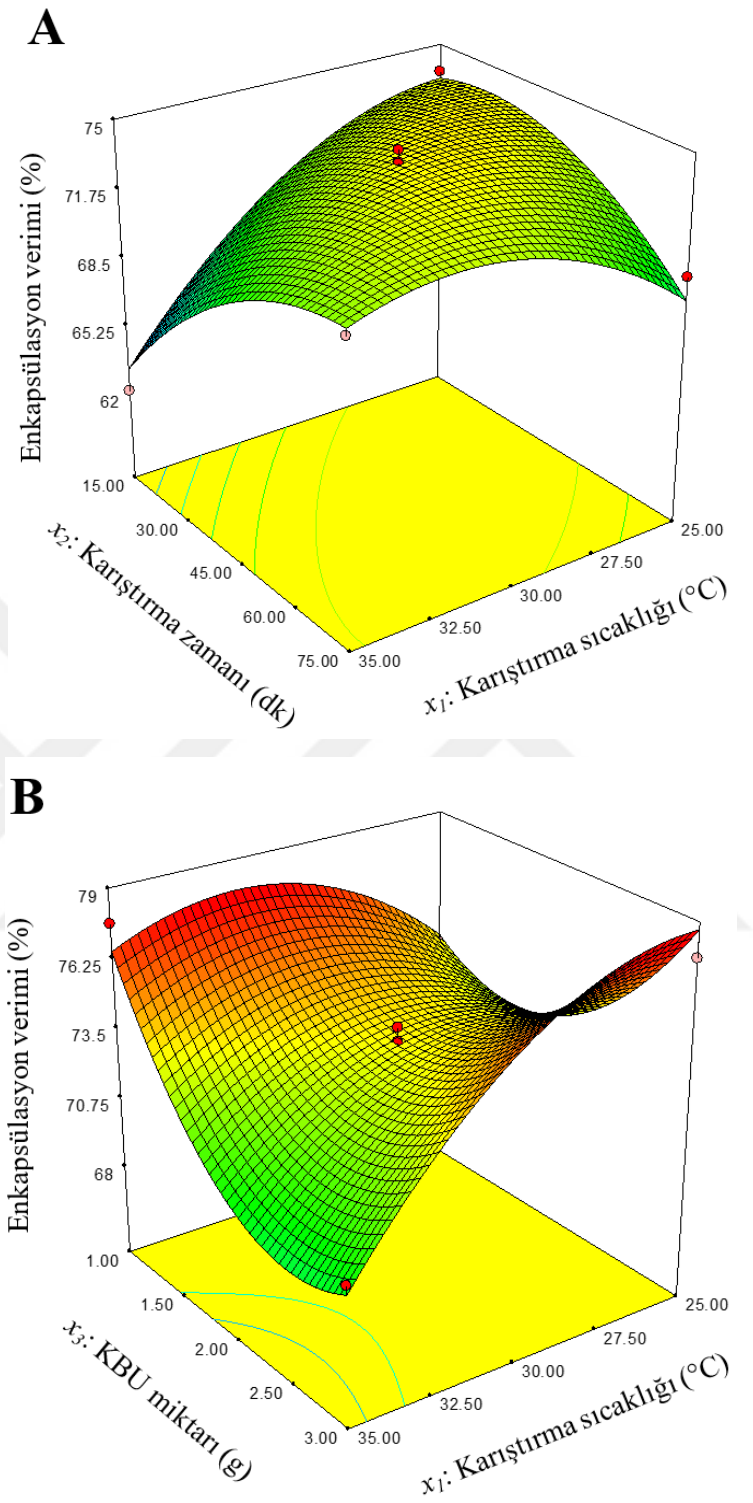
x_1: karıştırma sıcaklığı (°C), x_2: karıştırma zamanı (dk), x_3: KBU miktarı (g), LR: *L. rhamnosus,* LPC: *L. paracasei*

Çizelge 4.7. LR ve LPC probiyotik bakterilerinin tahmini ve deneysel enkapsülasyon verimi

Deney Numarası	Enkapsülasyon verimi (%)			
	LR		LPC	
	Deneysel	Tahmini	Deneysel	Tahmini
1	73,67	73,35	76,22	76,17
2	62,10	63,18	73,09	72,94
3	69,45	68,36	66,49	66,64
4	71,63	71,95	71,41	71,46
5	73,58	73,93	74,86	74,49
6	77,65	76,59	74,51	74,24
7	77,66	78,72	65,44	65,71
8	69,81	69,46	67,18	67,55
9	73,94	73,91	78,03	78,45
10	76,36	77,10	75,04	75,26
11	74,78	74,04	73,24	73,02
12	74,60	74,63	65,63	65,21
13	73,81	73,67	73,68	73,66
14	73,81	73,67	72,53	73,66
15	74,36	73,67	73,68	73,66
16	72,62	73,67	75,03	73,66
17	73,74	73,67	73,38	73,66

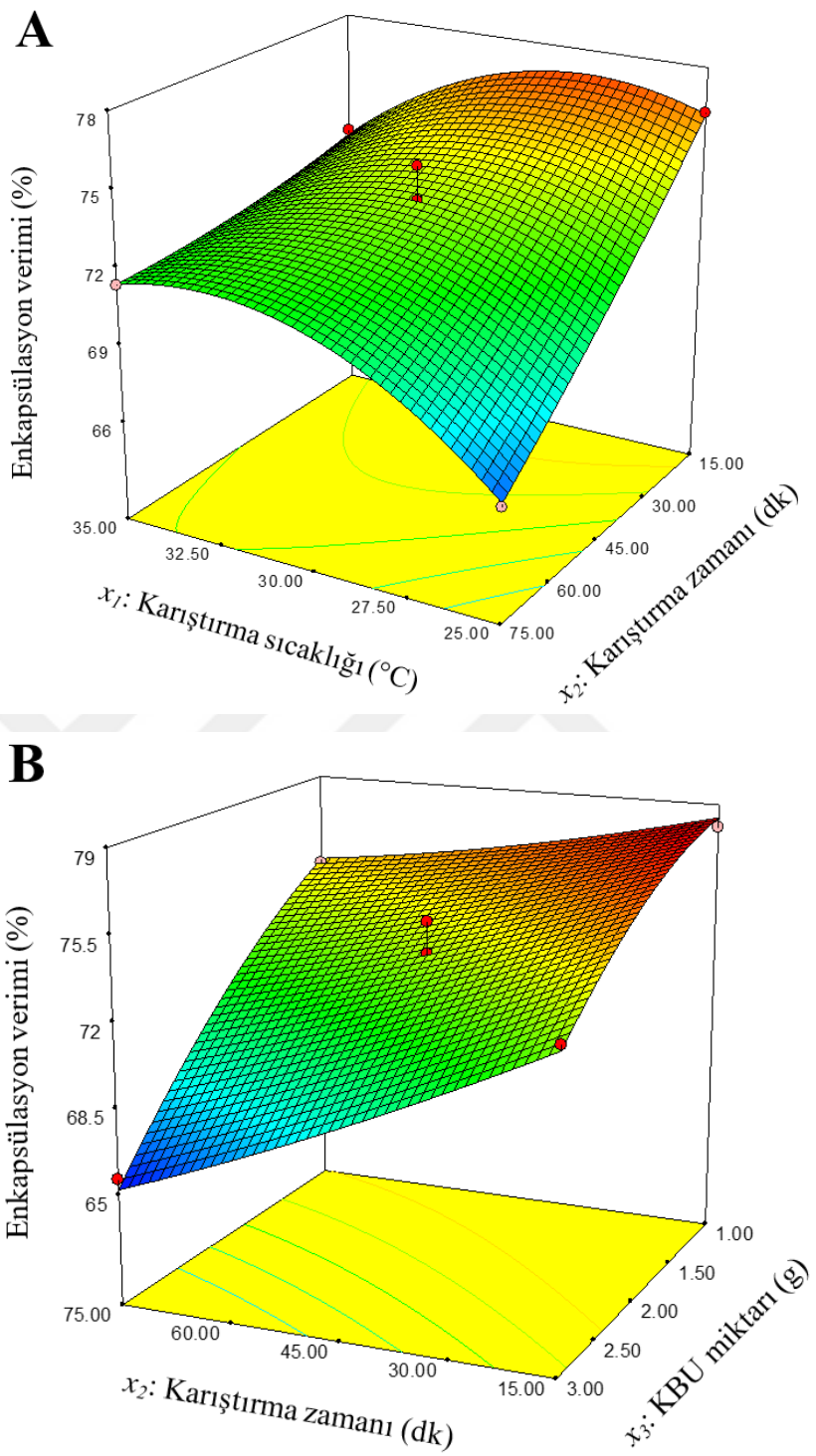
LR: *L. rhamnosus*, LPC: *L. paracasei*

LR probiyotik bakterisinin KBU ile enkapsülasyonunda, enkapsülasyon verimi için önemli faktörler (p<0,05) x_1, x_2, x_3, x_1x_2, x_1x_3, x_1^2, x_2^2, x_3^2'dir. LPC probiyotik bakterisinin KBU ile enkapsülasyonunda, enkapsülasyon verimi için önemli faktörler (p<0,05) x_1, x_2, x_3, x_1x_2, x_2x_3, x_1^2, x_3^2'dir. ANOVA analizi ile elde edilen üç boyutlu yanıt-yüzey grafiklerine LR için Şekil 4.3'te ve LPC için Şekil 4.4'te yer verilmiştir. Belirlenen optimum koşullar ve bu optimum koşullar doğrultusunda elde edilen tahmini ve deneysel enkapsülasyon verimi Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. LR probiyotik bakterisinin KBU ile enkapsülasyonu için üç boyutlu yanıt-yüzey grafikleri. **A)** Karıştırma zamanı ve karıştırma sıcaklığının enkapsülasyon verimine etkisi **B)** KBU miktarı ve karıştırma sıcaklığının enkapsülasyon verimine etkisi

LR probiyotik bakterisinin KBU ile enkapsülasyonu için karıştırma zamanı ve karıştırma sıcaklığının etkisi incelendiğinde, karıştırma zamanı 75 dk'da sabit tutulduğunda karıştırma sıcaklığı 30°C civarına gelene kadar enkapsülasyon verimi artmıştır. Sıcaklık 35°C'ye yaklaştıkça enkapsülasyon verimi azalmaya başlamıştır. Karıştırma sıcaklığı 35°C'de sabit tutulduğunda ise karıştırma zamanı azaldıkça enkapsülasyon verimi azalmıştır. En düşük karıştırma sıcaklığı (25°C) ve en düşük karıştırma zamanında (15 dk) enkapsülasyon verimi en yüksek seviyeye ulaşmıştır. KBU miktarı ve karıştırma sıcaklığının etkisi incelendiğinde, KBU miktarı 3 g'da sabitken karıştırma sıcaklığı arttıkça enkapsülasyon veriminde azalma meydana gelmiştir. Karıştırma sıcaklığı 35°C'de sabit tutulduğunda ise KBU miktarı 3 g'dan 2,5 g civarına gelene kadar enkapsülasyon verimi azalış göstermiş olup KBU miktarı azaldıkça enkapsülasyon verimi artış göstermiştir. En yüksek KBU miktarı (3 g) ve en düşük karıştırma sıcaklığında (25°C) enkapsülasyon verimi en yüksek değerde bulunmuştur.



Şekil 4.4. LPC probiyotik bakterisinin KBU ile enkapsülasyonu için üç boyutlu yanıt-yüzey grafikleri. **A)** Karıştırma zamanı ve karıştırma sıcaklığının enkapsülasyon verimine etkisi **B)** KBU miktarı ve karıştırma zamanının enkapsülasyon verimine etkisi

LPC probiyotik bakterisinin KBU ile enkapsülasyon verimi için karıştırma zamanı ve karıştırma sıcaklığının etkisi incelendiğinde, karıştırma zamanı 15 dk'da sabitken karıştırma sıcaklığı 27,5°C civarına gelene kadar enkapsülasyon verimi artmakta olup karıştırma sıcaklığı maksimum seviyeye yaklaşırken azalış göstermektedir. Karıştırma sıcaklığı 25°C'de sabitken karıştırma zamanı azaldıkça enkapsülasyon verimi artış göstermiştir. En düşük karıştırma zamanı (15 dk) ve en düşük karıştırma sıcaklığında (25°C) en yüksek enkapsülasyon verimi elde edilmiştir. KBU miktarı ve karıştırma zamanının etkisi incelendiğinde, KBU miktarı 3 g'da sabitken karıştırma zamanı arttıkça enkapsülasyon veriminde azalma meydana gelmiştir. Karıştırma zamanı 75 dk'da sabitken KBU miktarı arttıkça enkapsülasyon veriminde azalma meydana gelmiştir. KBU miktarı en düşük miktarda (1 g) iken karıştırma zamanı minimum olduğunda (15 dk) enkapsülasyon verimi maksimum seviyeye ulaşmıştır.

Çizelge 4.8. Optimum koşullar ve optimum koşullarda elde edilen tahmini ve deneysel enkapsülasyon verimi

Yanıt	Optimum koşullar			Maksimum enkapsülasyon verimi	
	Karıştırma sıcaklığı (°C)	Karıştırma zamanı (dk)	KBU miktarı (g)	Tahmini (%)	Deneysel (%)
LR	26,97	33,24	2,93	78,32	79,51±0,36
LPC	26,82	15,15	1,38	78,19	74,98±0,20

LR: *L. rhamnosus*, LPC: *L. paracasei*

KBU ile LR probiyotik bakterilerinin enkapsülasyonunda optimum koşullar; karıştırma sıcaklığı için 26,97°C, karıştırma zamanı için 33,24 dk ve KBU miktarı için 2,93 g olarak belirlenmiştir. LR için tahmini enkapsülasyon verimi %78,32 iken deneysel enkapsülasyon verimi %79,51±0,36 olarak bulunmuştur. KBU ile LPC probiyotik bakterilerinin enkapsülasyonunda optimum koşullar; karıştırma sıcaklığı için 26,82°C, karıştırma zamanı için 15,15 dk ve KBU miktarı için 1,38 g olarak belirlenmiştir. LPC için tahmini enkapsülasyon verimi %78,19 iken deneysel enkapsülasyon verimi %74,98±0,20 olarak bulunmuştur. Her iki probiyotik bakteri için de modelin tahminleri deneysel sonuçlarla genel olarak uyumludur. Bulgular, Box-Behnken Dizayn modelinin KBU ile LR ve LPC probiyotik bakterilerinin emülsiyon yöntemiyle enkapsülasyonunda maksimum enkapsülasyon verimini doğru ve güvenilir bir şekilde tahmin ettiğini göstermektedir.

Karkar (2023) tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotik bakterilerin enkapsülasyonunda kullanılan sıcaklık, süre ve kaplama materyali miktarı gibi faktörlerin etkileri ve karşılıklı etkileşimleri merkezi kompozit dizayn-yanıt yüzey yöntemi ile incelenmiştir. *L. casei* için ekstraksiyon süresi sabit tutulduğunda sıcaklık artışıyla birlikte enkapsülasyon verimliliğinde bir artış gözlenmiştir. Benzer şekilde, sıcaklık sabit tutulduğunda, ekstraksiyon süresi başlangıçta verimliliği azaltmış ancak belirli bir süreden sonra yeniden artırmıştır. En yüksek verimlilik, 36,5°C sıcaklık, 142,47 dk ekstraksiyon süresi ve %0,60 kaplama materyali miktarıyla elde edilmiştir. *L. acidophilus* için ise kaplama materyali miktarı sabit tutulduğunda, ekstraksiyon süresi uzadıkça verimlilik azalmış, ancak kaplama materyali miktarının artırılmasıyla verimlilik tekrar artmıştır. 36,5°C sıcaklık, 145,41 dk ekstraksiyon süresi ve %0,68 kaplama materyali miktarıyla maksimum enkapsülasyon verimliliği elde edilmiştir. Yanıt-yüzey grafikleri, sıcaklık, süre ve kaplama materyali miktarı arasındaki etkileşimleri göstererek optimum enkapsülasyon koşullarının belirlenmesine olanak sağlamıştır.

Başka bir çalışmada (Rojas-Espina ve diğerleri, 2024) kitosan-inülin kaplama materyali kullanılarak ekstrüzyon yöntemi ile oluşturulan *L. plantarum* kapsülleri dondurulup kurutularak canlılığın yüksek oranda korunması amaçlanmıştır. *L. plantarum* kapsülleri, farklı konsantrasyonlarda $CaCl_2$, kitosan ve inülin kullanılarak yanıt yüzey yöntemi ile

birleştirilmiş Box-Behnken dizaynı ile geliştirilmiştir. Optimum koşullar (%1,84 $CaCl_2$, %1,04 kitosan ve %1,4 inulin), mikroenkapsüllerin fiziksel stabilitesini, bakteri canlılığını ve gastrointestinal koşullara dayanıklılığını artırmada önemli bir rol oynamıştır. Bu konsantrasyonlar hem kapsülün mekanik özelliklerini hem de prebiyotik katkının etkisini dengeleyerek yüksek canlılık oranı (%68,33) elde edilmesini sağlamıştır. Elde edilen tahmini ve deneysel veriler, modelin geçerliliğini doğrulamış ve sonuçlar, hücre canlılığı için deneysel değerlerin tahmini değerlerle uyumlu olduğunu göstermiştir.

4.4. KBU ile KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin fizikokimyasal özellikleri

KBU ve KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin belirlenen toplam şeker, toplam yağ, toplam protein, toplam diyet lif, kuru madde, nem, titre edilebilir asitlik ve kül içerikleri Çizelge 4.9'te verilmiştir**.** Elde edilen veriler MİNİTAB 17.0 (Minitab Inc., State College, PA) istatistik programı kullanılarak tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir. KBU ile KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin her bir fizikokimyasal özellik için ayrı olarak $p<0,01$ düzeyinde karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir.

KBU için toplam şeker miktarı %47,70±0,67 olarak tespit edilirken KBU-LR ve KBU-LPC kapsülleri için tespit edilememiştir. Probiyotik bakterilerin karbohidratları enerji kaynağı olarak fermente ettiği bilinmektedir (Doğan, 2011). Enkapsülasyon sürecinde karbohidratlar parçalanarak şeker miktarında azalma meydana gelmiş ve şeker miktarının ölçülemeyecek seviyelere düşmüş olabileceği düşünülmektedir. KBU'nun yağ içeriği oldukça düşük olduğu için toplam yağ miktarı ölçüm sınırlarının altında kalmıştır. Bu durum, probiyotik bakterilerin varlığıyla da değişmemiştir. Protein miktarı KBU için %4,61±0,25 ile düşük seviyede iken KBU-LR ve KBU-LPC kapsülleri için sırasıyla %14,37±0,78 ve %17,56±0,95 olarak artış göstermiştir. Probiyotik bakterilerin kendi biyokütle proteinlerinin (hücre duvarı proteinleri ve enzimler gibi) varlığı (Chapot-Chartier ve Kulakauskas, 2014) enkapsülasyon sonrası protein içeriğinin artışını açıklamaktadır. KBU-LPC kapsülünün protein miktarının KBU-LR kapsülünden yüksek olması, LPC'nin biyokütlesinin daha yoğun olabileceğini ya da KBU ile daha yüksek oranda etkileşime girmiş olabileceğini göstermektedir. Diyet lif içeriği KBU için %35,3±1,35 olarak tespit edilirken KBU-LR ve KBU-LPC kapsülleri için sırasıyla

%74,8±2,86 ve %74,9±2,87 olarak artış göstermiştir. Bu artış, KBU'da karbohidratların bir kısmının diyet lif benzeri yapılar haline dönüşmesiyle açıklanabilir. KBU, %97,66±0,004 ile yüksek bir kuru madde içeriğine sahiptir. KBU-LR ve KBU-LPC kapsülleri için kuru madde içeriği sırasıyla %95,44±0,01 ve %100±0,01 olarak değişim göstermiştir. KBU-LR kapsülünde küçük bir azalma gözlenirken, KBU-LPC kapsülü %100'e ulaşmıştır. Bu durum, probiyotiklerin doğrudan nem içeriğini değiştirebileceğini veya kurutma işleminin probiyotiklerin aktiviteleri ve canlılık oranları gibi etkilere sebebiyet verebileceğini göstermektedir. KBU için asitlik değeri %1,02±0,04 olarak tespit edilmiştir. KBU-LR ve KBU-LPC kapsülleri için asitlik değerleri sırasıyla %0,66±0,03 ve %0,60±0,02'ye düşmüştür. Bu durum, probiyotik bakterilerin fermentasyon sırasında karbohidratları metabolize etmesiyle ilişkilendirilebilir. KBU, %2,61±0,20 ile düşük kül oranına sahiptir. KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin kül miktarı sırasıyla %3,39±0,19 ve %4,13±0,09 olarak artış göstermiştir. Probiyotik bakterilerin metabolik faaliyetleri sonucu kapsüllerdeki minerallerin artmasıyla kül miktarında artış gerçekleştiği söylenebilir (Khan ve diğerleri, 2024). KBU-LPC kapsülündeki daha yüksek kül oranı, LPC'nin daha fazla mineral metabolize ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.9. KBU ile KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin fizikokimyasal özellikleri

Fizikokimyasal Özellik (%)	KBU	KBU-LR	KBU-LPC
Toplam şeker	47,70±0,67	te	te
Toplam yağ	te	te	te
Toplam protein	4,61±0,25^{c}	14,37±0,78^{b}	17,56±0,95^{a}
Diyet lif	35,3±1,35^{b}	74,8±2,86^{a}	74,9±2,87^{a}
Kuru madde	97,66±0,004^{b}	95,44±0,01^{c}	100±0,01^{a}
Nem	2,34±0,004^{b}	4,56±0,01^{a}	te
Asitlik (asetik asit)	1,02±0,04^{a}	0,66±0,03^{b}	0,60±0,02^{b}
Kül	2,61±0,20^{c}	3,39±0,19^{b}	4,13±0,09^{a}

KBU: keçiboynuzu unu, LR: *L. rhamnosus*, LPC: *L. paracasei*, te: tespit edilemedi
a-c: Küçük harfler bir fizikokimyasal özellikteki farklı örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı grupları göstermektedir (p<0,01).

Konak vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada keçiboynuzu ununun kimyasal bileşimi belirlenmiştir. Kuru madde %95,44±1,26, ham protein %7,28±0,13, yağ %0,50±0,01, kül %3,11±0,01 ve toplam diyet lif %47,14±1,71 olarak bulunmuştur.

Başka bir çalışmada (Ayad ve diğerleri, 2023) olgunlaşmış keçiboynuzu meyveleri, Cezayir'in kuzeydoğusundaki Jijel bölgesinden (Djimla ve El-Milia) toplanmış, toz hale getirilmiş ve fizikokimyasal özellikleri analiz edilmiştir. Djimla bölgesinde işlem görmemiş keçiboynuzu posası tozlarında toplam titre edilebilir asitlik (asetik asit) %1,16±0,01, nem %13,13±0,003, kuru madde %86,88±0,005, kül %2,72±0,002, protein %4,65±0,09 ve toplam şeker %26,8±1,34 olarak tespit edilmiştir. El-Milia bölgesinde işlem görmemiş keçiboynuzu posası tozlarında toplam titre edilebilir asitlik (asetik asit) %0,85±0,007, nem %13,11±0,005, kuru madde %86,89±0,003, kül %3,04±0,001, ham protein %4,79±0,04 ve toplam şeker %27,7±3,86 olarak tespit edilmiştir.

Kılıç vd. (2022) tarafından yapılan başka bir çalışmada baklagil tohumlarından izole edilen serbest ve enkapsüle edilmiş laktik asit bakterileriyle üretilen yoğurtların fizikokimyasal özellikleri karşılaştırılmıştır. Kapsüllenmiş bakterilerle üretilen

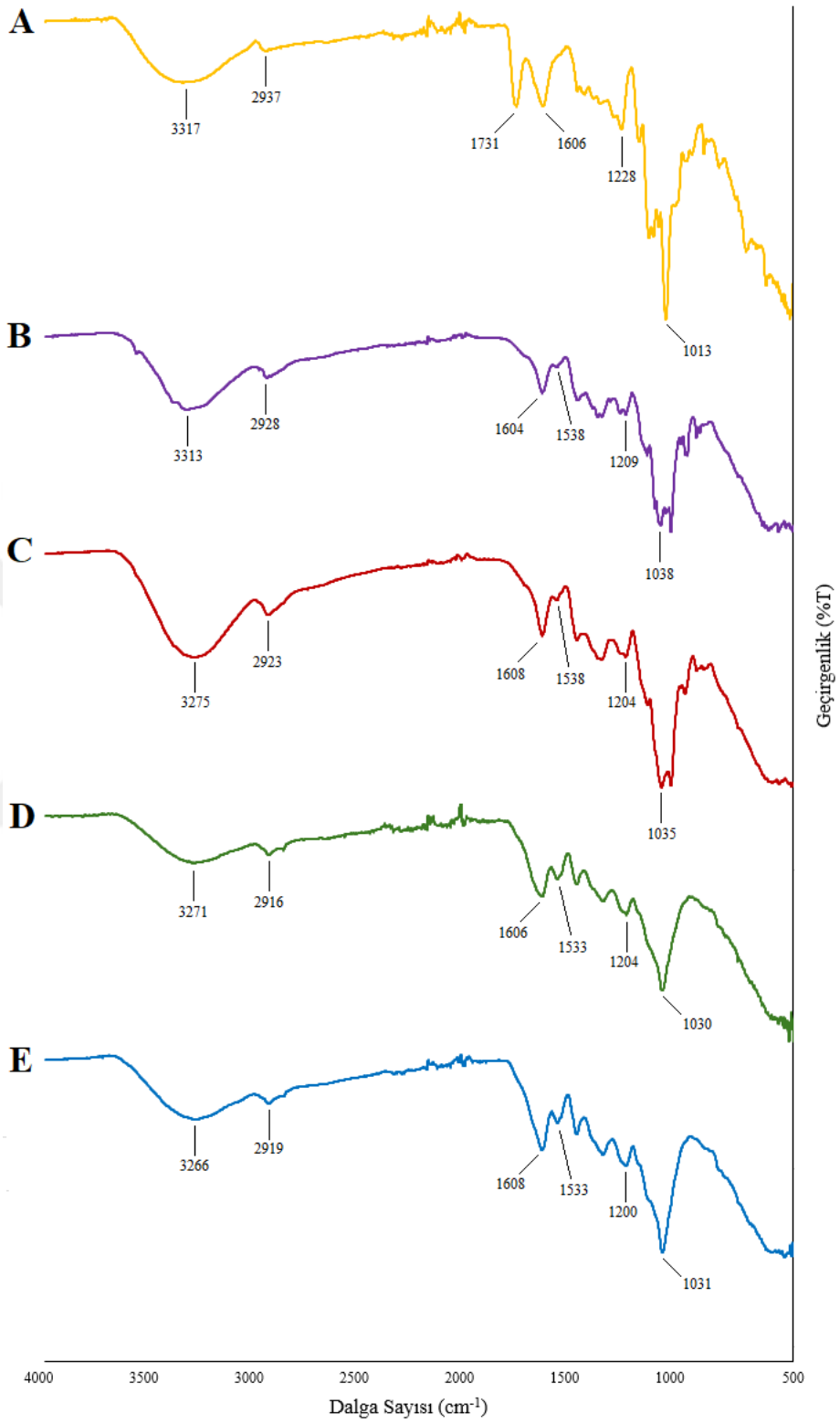
yoğurtlarda 1, 7 ve 14. günde daha yüksek bakteri canlılığına (sırasıyla 11,21±0,04 kob/g, 11,04±0,15 kob/g ve 10,92±0,03 kob/g) ek olarak daha yüksek pH değeri (sırasıyla 4,81±0,01, 4,87±0,03 ve 4,93±0,02) ve kuru madde içeriği (sırasıyla %17,82±0,71, %17,99±0,59 ve %17,81±0,19) tespit edilmiştir. Kapsüllenmiş bakterilerle üretilen yoğurtlarda 1. gün için daha yüksek titre edilebilir asitlik (laktik asit cinsinden) (%0,65±0,07), 7. ve 14. gün için daha düşük titre edilebilir asitlik (sırasıyla %0,62±0,06 ve %0,60±0,05) tespit edilmiştir.

4.5. KBU ile KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin karakterizasyonu

KBU, sterilize edilmiş (121°C, 1 dk) KBU, KBU-LR ve KBU-LPC kapsülleri ve pektinin yapısal karakterizasyonu için gerçekleştirilen FTIR analizine ait spektrumlar Şekil 4.5'te verilmiştir.

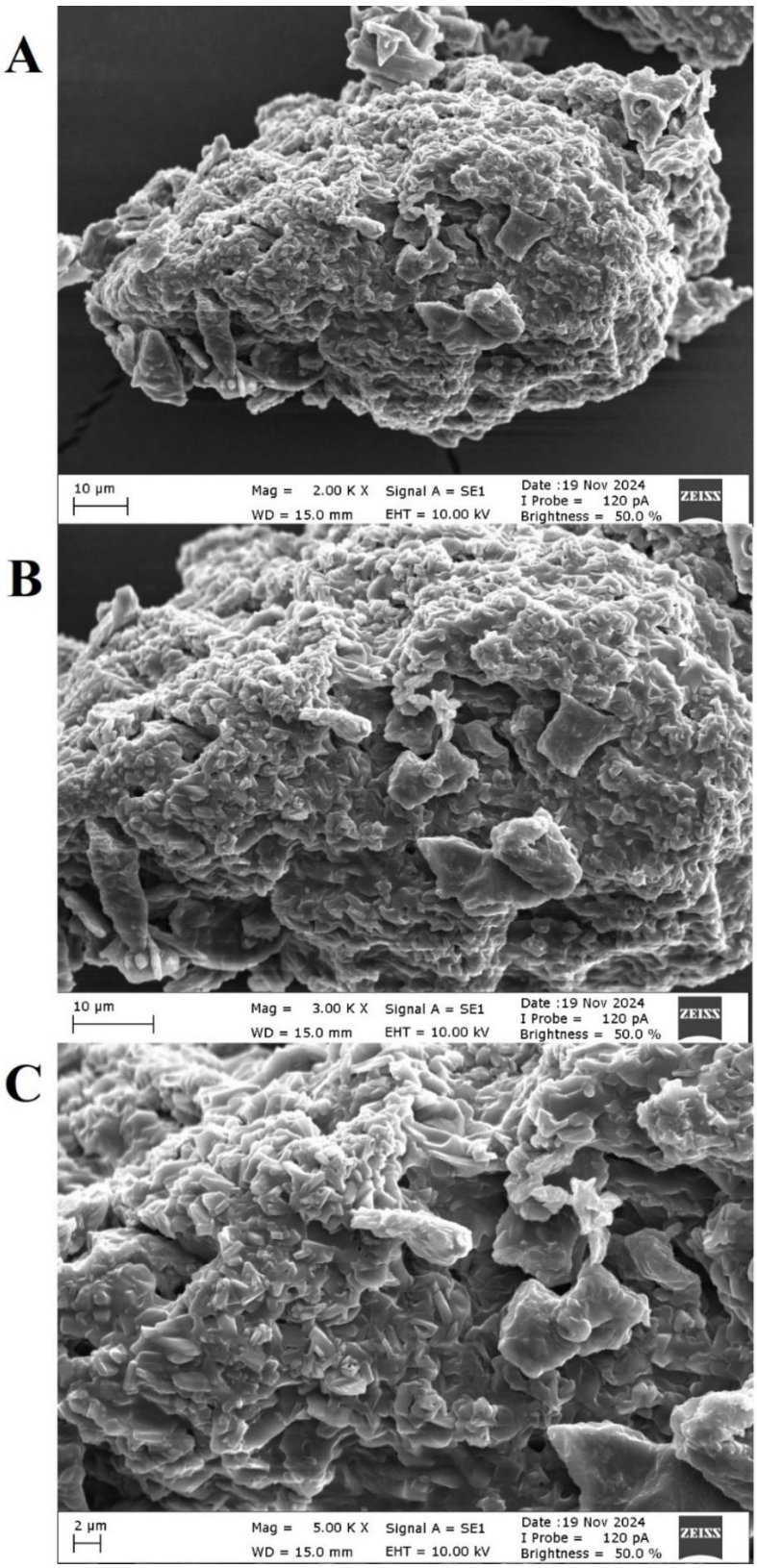
FTIR spektrumları incelendiğinde 3400-3200 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki absorpsiyon O-H gruplarının gerilme titreşimini göstermektedir (Song ve diğerleri, 2020). 3000-2800 cm^{-1} aralığındaki spektrum bandı ise metil grubunun C-H gerilme titreşimine karşılık gelmektedir (Mahmud ve diğerleri, 2022). Bu spektrum bantlarına ait pikler enkapsülasyon sonrası yapıda büyük bir değişim meydana geldiğini göstermektedir. 1731 cm^{-1}, pektinin yapısında bulunan metil ester gruplarındaki C=O grubunu temsil eder. 1700-1500 cm^{-1} aralığındaki pikler ise amid I ve amid II tipi grupları temsil etmektedir (Acordi Menezes ve diğerleri, 2018; Demir ve diğerleri, 2021; Karrar ve diğerleri, 2021). 1533-1731 cm^{-1} aralığındaki pikler amidler veya protein yapılarındaki C=O ve N-H titreşimleriyle uyumludur. 800-1200 cm^{-1} aralığında geniş bir spektrum bandı, karbohidrat parmak izi bölgesini işaret etmektedir. Polisakkaritlere ait C-O ve C-C gerilme titreşimleri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Enkapsülasyon işlemi sonucunda özellikle protein (1500-1600 cm^{-1} aralığı) ve karbohidrat (1000-1200 cm^{-1} aralığı) bölgelerinde belirgin değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu, probiyotik bakterilerin yapıya bağlanmasını ve KBU ile etkileşime geçtiğini desteklemektedir. Sterilizasyon işlemi ise KBU'nun yapısında kimyasal bir değişikliğe yol açmamış, spektrumda minimal farklılıklar meydana gelmiştir. Ancak probiyotik bakterilerin eklenmesi, spektrumda daha

belirgin yapısal değişikliklere neden olmuştur. Bu değişiklikler probiyotik bakterilerin başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini göstermektedir.

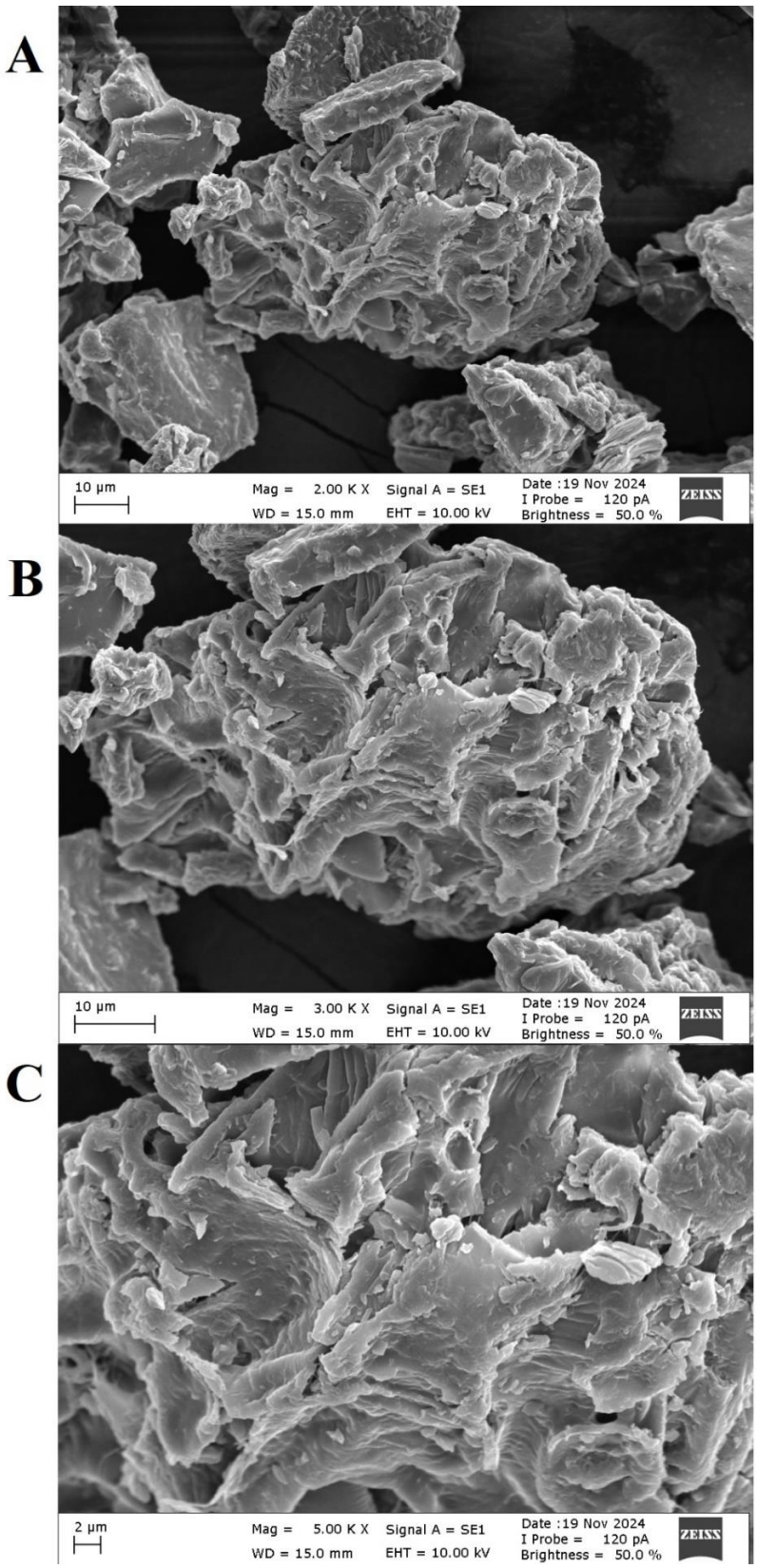


Şekil 4.5. FTIR spektrumları. **A)** Pektin **B)** Sterilize edilmiş KBU **C)** KBU **D)** KBU-LPC kapsülü **E)** KBU-LR kapsülü

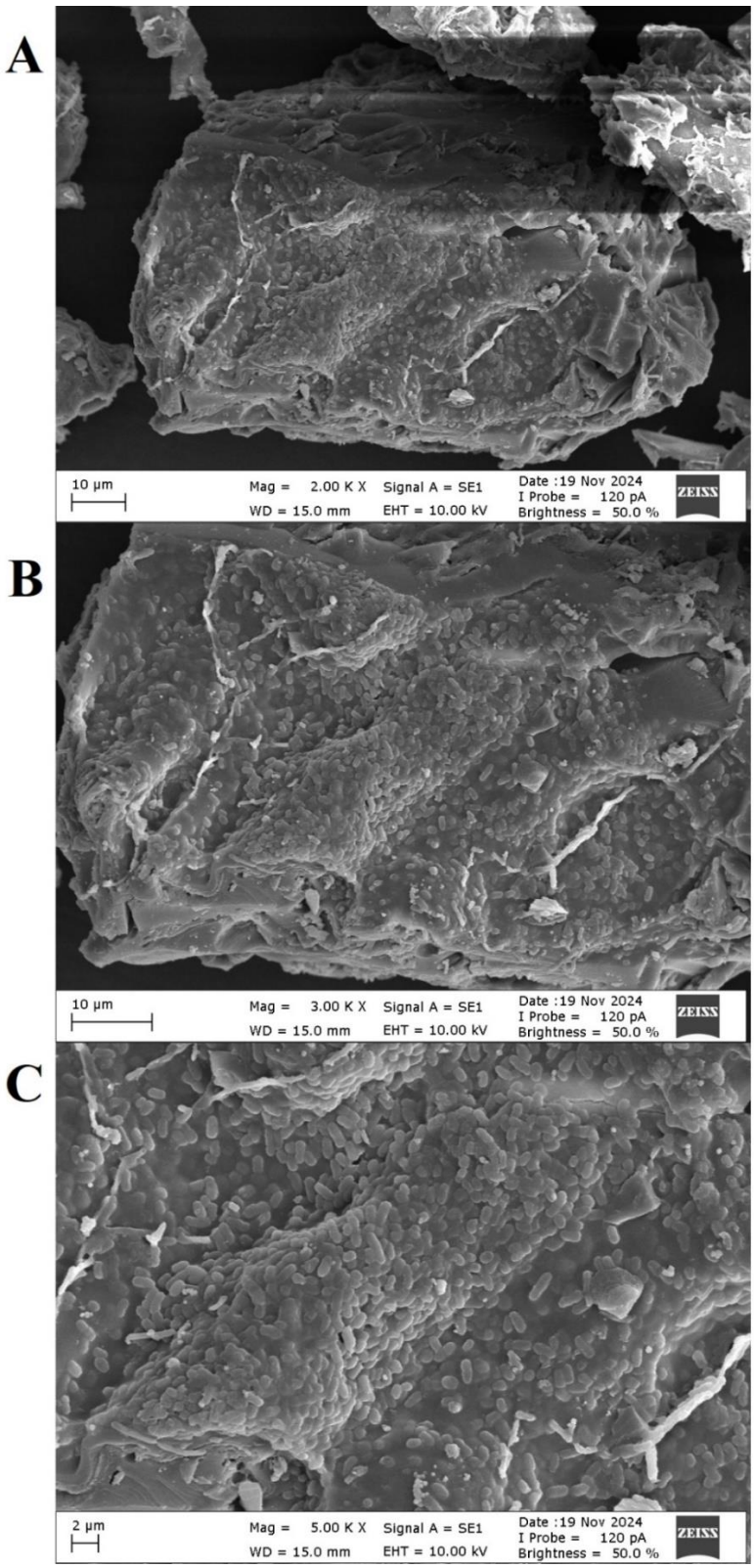
KBU, sterilize edilmiş (121°C, 1 dk) KBU, KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin SEM görüntüleri alınarak morfolojileri incelenmiştir. Şekil 4.6'da verilen KBU yüzeyinde yapının içeriğinden kaynaklı öbekleşmelerden dolayı düzensiz bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Sterilizasyon işleminin ardından yüksek sıcaklık ve basınç nedeniyle yapı içeriğindeki moleküller arası etkileşimlerin zayıflamasından dolayı öbekleşmelerin açılarak KBU yüzeyinde düzleşmelerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da sırasıyla KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin farklı büyütme oranlarında SEM görüntüleri verilmiştir. Her iki kapsül görüntüsünde de probiyotik bakterilerin oluşturduğu kabartılar görülmekte ve bakterilerin KBU yüzeyine gömüldüğü anlaşılmaktadır. Dondurularak kurutulmuş kapsüllerin kırışık, düzensiz ve çökük yüzey morfolojisi sergilediği bilinmektedir (Ivanovska ve diğerleri, 2012). Liyofilizasyon sonrasında gözlemlenen gözenekli yüzeyler, dondurma sırasında kalan buz kristalleri veya hava kabarcıkları nedeniyle oluşmuştur. Enkapsülasyon işlemi, probiyotik bakterilerin başarılı bir şekilde KBU yüzeyine tutunmasını sağlayarak KBU'nun morfolojik yapısını değiştirmiştir.



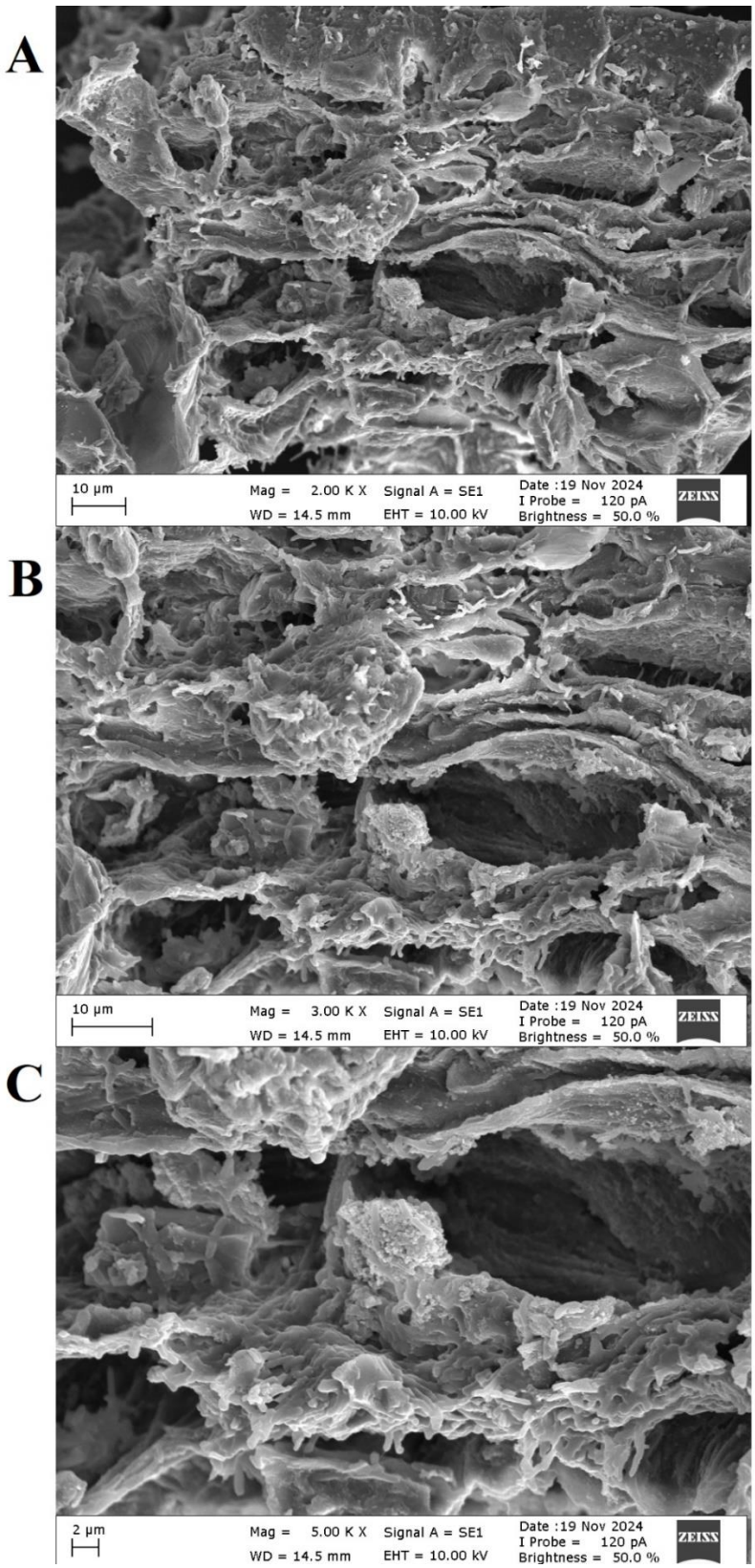
Şekil 4.6. KBU SEM görüntüleri. **A)** 2000X büyütme **B)** 3000X büyütme **C)** 5000X büyütme



Şekil 4.7. Sterilize edilmiş KBU SEM görüntüleri. **A)** 2000X büyütme **B)** 3000X büyütme **C)** 5000X büyütme



Şekil 4.8. KBU-LR kapsülü SEM görüntüleri. **A)** 2000X büyütme **B)** 3000X büyütme **C)** 5000X büyütme



Şekil 4.9. KBU-LPC kapsülü SEM görüntüleri. **A)** 2000X büyütme **B)** 3000X büyütme **C)** 5000X büyütme

4.6. *In vitro* gastrointestinal sindirimde LR ve LPC probiyotik bakterilerinin canlılıkları

In vitro gastrointestinal sindirim koşullarında serbest ve enkapsüle edilen LR ve LPC probiyotik bakterilerinin canlılıkları incelenmiştir. Çalışmada, SGF (bkz. Şekil 3.6), SIF (bkz. Şekil 3.7) ve ardışık olarak SGF ve SIF (bkz. Şekil 3.8) ortamlarında probiyotiklerin canlılıklarını değerlendirmek için modifiye edilmiş yöntemler kullanılmıştır. Serbest ve enkapsüle edilen LR ve LPC probiyotik bakterilerinin *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrası belirlenen canlı hücre sayısı (log kob/mL-g) Çizelge 4.10'da, canlılığı (%) ise Çizelge 4.11'de verilmiştir. Ayrıca *in vitro* gastrointestinal sindirimin bakteri canlılıklarına etkisi Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da grafiksel olarak görselleştirilmiştir.

Serbest LR ve LPC probiyotik bakterilerinin canlılıkları, mide sindirimi süresince hızla azalmış ve LR için 60 dk, LPC için ise 30 dk mide sindiriminin ardından tespit edilemez düzeye gelmiştir. Probiyotik bakteri kapsülleri mide ortamının asidik koşullarına ve enzim etkisine karşı daha dayanıklı olmuştur. LR kapsüllerinin canlılığı, 120 dk mide sindirimi sonunda %56,74 ile korunurken LPC kapsülleri için ise bu canlılık %96,93 olarak belirlenmiştir. Bağırsak sindiriminde, serbest LR ve LPC probiyotik bakterileri yüksek bir canlılık göstermiştir. Serbest LR ve LPC için canlılık oranları sırasıyla %106,13 ve %85,35 seviyelerinde bulunmuştur. Probiyotik bakteri kapsüllerinde ise canlılık oranları LR kapsülleri için %111,48, LPC kapsülleri için ise %108,36 olarak tespit edilmiştir. Bağırsak sıvısını taklit eden nötr veya hafif alkali pH değerine sahip SIF ortamı, özellikle *Lactobacillus* ve *Lacticaseibacillus* türleri gibi çoğu probiyotik bakteriler için uygun bir ortam sağlayarak, bakterilerin canlılığını ve gelişme şansını artırmaktadır (Stasiak-Rózanska ve diğerleri, 2021). Serbest LR ve LPC probiyotik bakterilerinin simüle mide ve bağırsak ortamlarındaki ardışık sindirimi, bakteri canlılıklarını büyük ölçüde azaltmış ve tespit edilemez düzeylere geriletmiştir. Probiyotik bakteri kapsüllerinde ise mide ortamından bağırsak ortamına geçiş sonrası canlılık oranları önemli ölçüde korunmuştur. Ardışık sindirim sonrası canlılık LR kapsülleri için %47,63, LPC kapsülleri için ise %90,52 olarak tespit edilmiştir. LPC kapsülleri, LR kapsüllerine kıyasla sindirim sürecinde daha yüksek canlılık oranları göstermiştir. Bu

durum, bakteri türleri arasındaki dayanıklılık farklılıkları ile açıklanabilir (Reale ve diğerleri, 2015). Enkapsülasyon işlemi, gastrointestinal sindirim boyunca probiyotik bakterilerin canlılığı için iyi bir koruma sağlamıştır. Kaplama materyali olarak kullanılan KBU, probiyotiklerin mide asidinden korunmasına ve bağırsak ortamına canlı bir şekilde ulaşmasına olanak tanımıştır. Bu bulgular, probiyotik bakterilerin gastrointestinal sindirime dayanıklılığını artırmak için enkapsülasyon teknolojisinin önemli bir araç olduğunu göstermektedir. Ayrıca, prebiyotik materyallerle yapılan duvar matris kombinasyonlarının sinbiyotik kapsüller oluşturması, probiyotiklerin etkinliğini artırarak fonksiyonel gıda sektöründe başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (Ta ve diğerleri, 2021; Soto ve diğerleri, 2023).

Çizelge 4.10. LR ve LPC probiyotik bakterilerinin *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrası belirlenen canlı hücre sayısı

ORTAM	Sindirim süresi (dk)	Serbest$^{\gamma}$ LR	Enkapsüle$^{\phi}$ LR	Serbest$^{\gamma}$ LPC	Enkapsüle$^{\phi}$ LPC
	Başlangıç	7,01±0,01	5,49±0,01	8,67±0,01	5,38±0,01
SGF	0	4,71±0,01	4,30±0,14	5,94±0,19	4,54±0,06
	30	1,50±0,14	3,33±0,07	te	4,90±0,11
	60	te	3,45±0,05	te	5,18±0,10
	90	te	3,23±0,11	te	5,22±0,01
	120	te	3,12±0,12	te	5,22±0,02
SIF	0	7,11±0,03	5,21±0,13	6,99±0,17	5,07±0,13
	30	7,34±0,08	5,84±0,01	7,20±0,15	5,52±0,13
	60	7,24±0,01	5,90±0,05	6,94±0,06	5,77±0,01
	90	7,44±0,08	6,09±0,14	7,24±0,15	5,68±0,01
	120	7,44±0,10	6,15±0,04	7,40±0,13	5,83±0,08
SGF + SIF	0	4,71±0,01	4,30±0,14	5,94±0,19	4,54±0,06
	30	1,50±0,14	3,33±0,18	te	4,90±0,11
	60	te	3,45±0,05	te	5,18±0,10
	90	te	3,23±0,11	te	5,22±0,01
	120	te	3,12±0,16	te	5,22±0,02
	120	te	2,49±0,16	te	5,06±0,16
	150	te	2,64±0,08	te	4,98±0,09
	180	te	2,85±0,08	te	4,81±0,12
	210	te	2,84±0,23	te	4,88±0,14
	240	te	2,62±0,02	te	4,87±0,13

*ortalama±standart sapma (iki tekrar), $^{\phi}$log kob/g, $^{\gamma}$log kob/mL

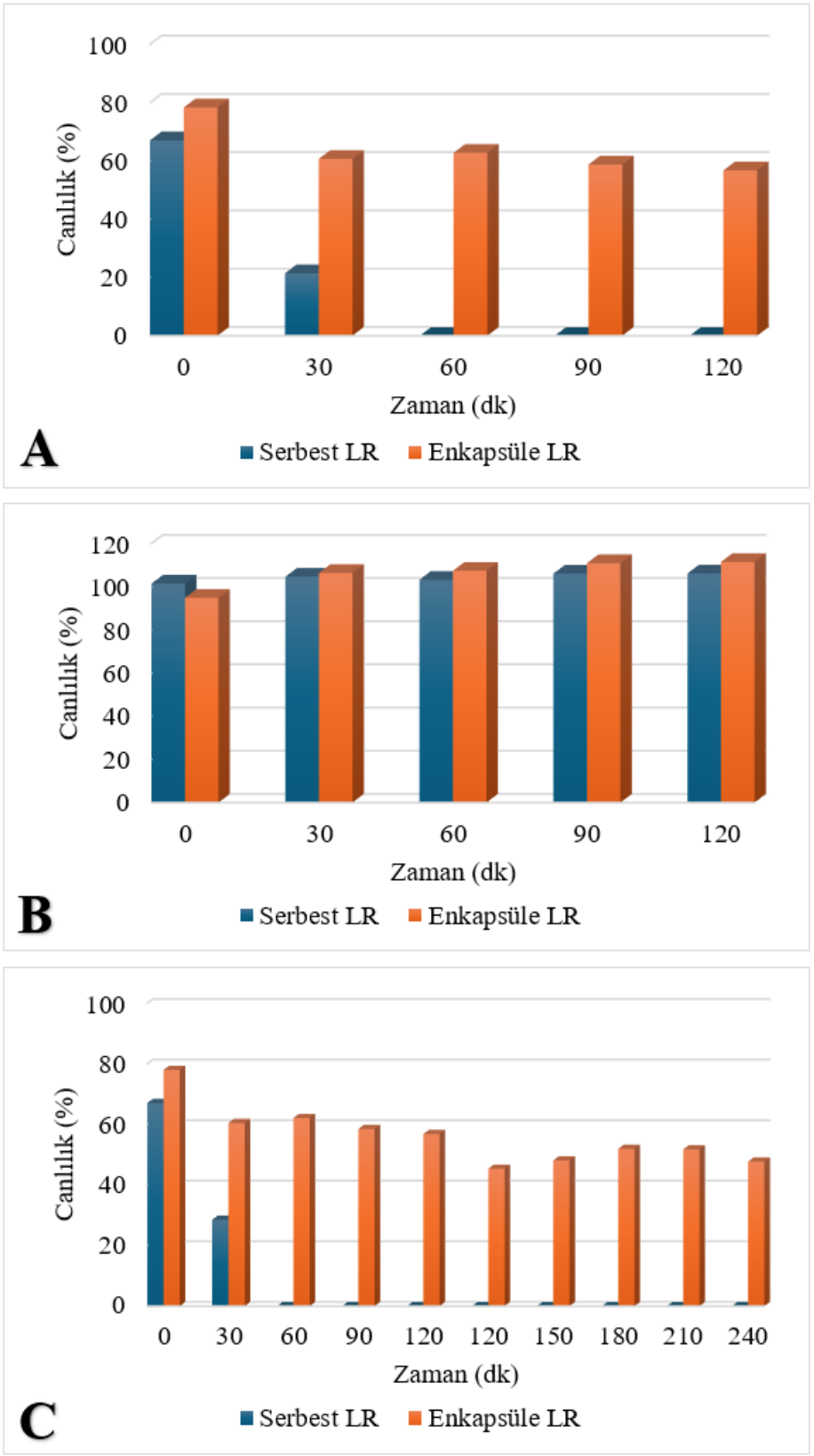
LR: *L. rhamnosus*, LPC: *L. paracasei*, SGF: simüle mide sıvısı, SIF: simüle bağırsak sıvısı, te: tespit edilemedi

Çizelge 4.11. LR ve LPC probiyotik bakterilerinin *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrası belirlenen canlılığı (%)

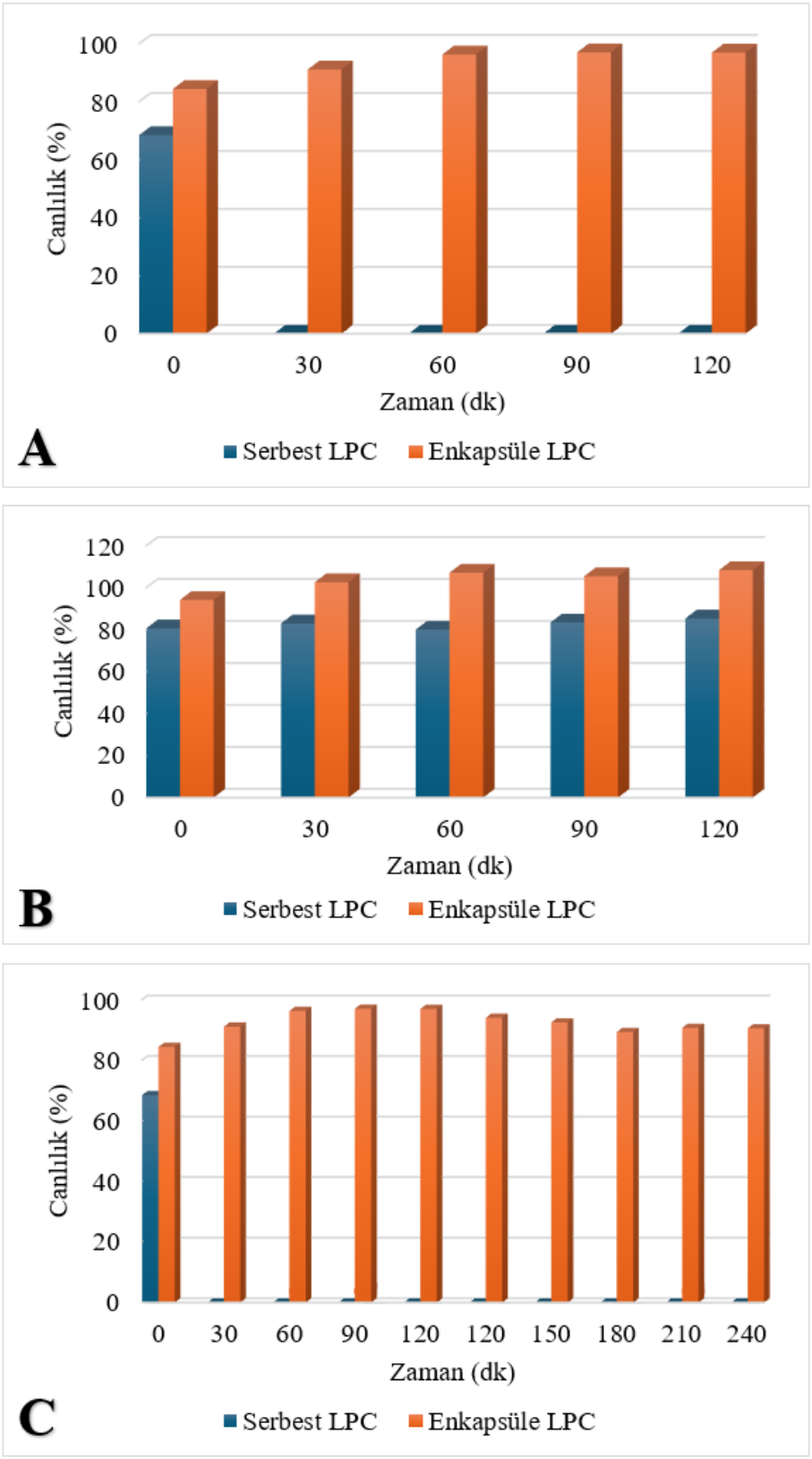
ORTAM	Sindirim süresi (dk)	Serbest LR	Enkapsüle LR	Serbest LPC	Enkapsüle LPC
SGF	0	67,05±0,20	78,32±2,58	68,45±2,20	84,39±1,05
	30	21,40±2,02	60,66±3,35	te	91,08±2,10
	60	te	62,75±0,90	te	96,28±1,84
	90	te	58,74±1,93	te	97,03±0,26
	120	te	56,74±2,19	te	96,93±0,39
SIF	0	101,43±0,40	94,81±2,45	80,62±1,96	94,14±2,50
	30	104,64±1,11	106,38±0,26	82,99±1,71	102,60±2,37
	60	103,21±0,10	107,38±0,90	80,05±1,35	107,16±2,50
	90	106,06±1,11	110,93±2,58	83,45±2,09	105,48±0,13
	120	106,13±1,41	111,48±0,77	85,35±1,47	108,36±1,58
SGF + SIF	0	67,05±0,20	78,32±2,58	68,45±2,20	84,39±1,05
	30	21,40±2,02	60,66±3,35	te	91,08±2,10
	60	te	62,75±0,90	te	96,28±1,84
	90	te	58,74±1,93	te	97,03±0,26
	120	te	56,74±2,19	te	96,93±0,39
	120	te	45,36±2,83	te	94,05±5,95
	150	te	48,09±1,55	te	92,47±1,71
	180	te	51,82±1,42	te	89,31±2,23
	210	te	51,64±4,25	te	90,71±2,63
	240	te	47,63±0,39	te	90,52±2,37

*ortalama±standart sapma (iki tekrar)

LR: *L. rhamnosus*, LPC: *L. paracasei*, SGF: simüle mide sıvısı, SIF: simüle bağırsak sıvısı, te: tespit edilemedi



Şekil 4.10. *In vitro* gastrointestinal sindirimin LR canlılığına etkisi. **A)** SGF ortamı **B)** SIF ortamı **C)** Ardışık olarak SGF ve SIF ortamı



Şekil 4.11. *In vitro* gastrointestinal sindirimin LPC canlılığına etkisi. **A)** SGF ortamı **B)** SIF ortamı **C)** Ardışık olarak SGF ve SIF ortamı

Literatürde yer alan bir çalışmada (Zubair ve diğerleri, 2023) taro nişastası ve sodyum aljinat, *L. rhamnosus*'un ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonu için kaplama materyali olarak kullanılmıştır. Serbest ve enkapsüle edilmiş probiyotik bakterilerin simüle edilmiş gastrointestinal koşullarda ve gıda modelinde (cheddar peyniri) canlılıkları değerlendirilmiştir. Probiyotik bakteri canlılığındaki azalma; serbest bakteri için 7,84 log kob/mL, taro nişastası ile enkapsüle edilen bakteri için 1,78 log kob/mL ve aljinat ile enkapsüle edilen bakteri için 2,81 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. SGF ve SIF ortamlarında 120 dk sonunda en yüksek canlılık değeri taro nişastası ile enkapsüle edilen bakteriler için kaydedilmiştir (sırasıyla 8,21±0,02 log kob/mL ve 7,61±0,01 log kob/mL). Aljinatın daha büyük gözenek yapısı nedeniyle daha düşük bir hayatta kalma oranı sağladığı bildirilmiştir. Cheddar peynirinde, enkapsüle edilmiş probiyotiklerin kullanılmasıyla yüksek probiyotik bakteri canlılığı elde edilmiştir. Kapsüllenmiş probiyotiklerin gıda ürünlerinde etkin bir şekilde kullanılabileceği ve etkinliklerinin korunabileceği ifade edilmiştir.

Xiao vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, süt protein izolatı ve süt protein izolatı-ksantan gam ikilisi ile katman-katman kapsüle edilmiş *L. bulgaricus* ve *L. paracasei*'nin simüle edilmiş gastrointestinal koşullarda (SGF, safra çözeltisi ve SIF) canlılıkları değerlendirilmiştir. SGF ortamında serbest probiyotik bakterilerin canlılığı 5,02 log kob/mL birimlik azalırken, süt protein izolatı ile enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin canlılıkları 2,11 log kob/g birim, süt protein izolatı-ksantan gam ile enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin canlılıkları ise 1,34 log kob/g birim azalmıştır. Kapsüllerin SGF ortamına karşı dirençlerinin serbest bakterilerinkinden oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde safra çözeltisinde de serbest bakterilerin canlılıkları 5,94 log kob/mL birimlik azalırken, süt protein izolatı ile enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin canlılıkları 3,47 log kob/g birim, süt protein izolatı-ksantan gam ile enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin canlılıkları 2,27 log kob/g birim azalmıştır. SGF ve safra ile karşılaştırıldığında SIF'nin probiyotiklere verdiği zarar çok daha azdır. Hem serbest bakterilerin hem de kapsüllerin canlılığı SIF ortamından sonra 7 log kob/mL-g değerinin üzerinde tespit edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada (de Matos-Jr ve diğerleri, 2019) serbest halde bulunan ve jelatin-arap gamı kompleksiyle kaplanmış katı lipit mikropartiküllere immobilize edilen iki probiyotik suşunun simüle edilmiş gastrointestinal sıvılara karşı toleransını değerlendirilmiştir. Serbest *L. paracasei* BGP1 ve *L. rhamnosus* 64 suşlarının simüle edilmiş gastrointestinal sıvılara duyarlılığı SGF'de önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Serbest *L. rhamnosus* 64 bakteri canlılığı 1,31 log kob/mL azalırken, serbest *L. paracasei* BGP1 bakteri canlılığı 3,37 log kob/mL azalmıştır. Ancak, SIF'nin etkisi her iki suş için de düşük olmuştur. 180 dk süreyle SIF'ye maruz kalan *L. rhamnosus* 64 ve *L. paracasei* BGP1 bakterilerinin canlılığı sırasıyla 1,64 ve 1,71 log kob/mL azalmıştır. SGF'de enkapsüle edilmiş *L. paracasei* BGP1 bakteri canlılığı 0,66 log kob/g, enkapsüle edilmiş *L. rhamnosus* 64 bakteri canlılığı 1,13 log kob/g azalma göstermiştir. SIF'de ise enkapsüle edilmiş *L. paracasei* BGP1 bakteri canlılığı 0,75 log kob/g azalırken, enkapsüle edilmiş *L. rhamnosus* 64 bakteri canlılığı 0,63 log kob/g azalmıştır. Çalışma sonucunda gastrointestinal sindirim sürecinde enkapsülasyon işlemlerinin probiyotik bakteri canlılığını koruma konusunda etkili olduğu bildirilmiştir.

4.7. Depolama koşullarında LR ve LPC probiyotik bakterilerinin canlılıkları

Serbest ve enkapsüle edilen LR ve LPC probiyotik bakterilerinin depolama koşullarındaki canlılıkları değerlendirilmiştir. Örnekler, üç farklı sıcaklıkta (+24°C, +4°C ve -24°C), 28 gün boyunca depolanmış ve mikrobiyolojik analizler, depolamanın 0., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde gerçekleştirilmiştir. Serbest ve enkapsüle edilen LR ve LPC probiyotik bakterilerine ait canlı hücre sayısı (log kob/mL-g) Çizelge 4.12'de, canlılığı (%) ise Çizelge 4.13'te verilmiştir. Elde edilen veriler MİNİTAB 17.0 (Minitab Inc., State College, PA) istatistik programı kullanılarak üç yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir. Sıcaklık, depolama süresi ve bakteri türünün canlı hücre sayısı ve canlılık üzerindeki etkileri, $p<0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Depolama süresi ve farklı sıcaklıkların serbest ve enkapsüle edilen LR canlılığına etkisi Şekil 4.11'de LPC etkisi Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

+24°C'de serbest LR ve LPC probiyotik bakterilerinde depolama süresi boyunca canlılık azalmış, 28. günde sırasıyla %80,40±0,24 ve %80,67±0,32'ye ulaşmıştır. Enkapsüle edilen probiyotik bakterilerde, sıcaklığın etkisi daha belirgin olmuş ve canlılık daha hızlı düşmüştür. 28. gün sonunda KBU-LR kapsüllerinin bakteri canlılığı %37,83'e düşerken, KBU-LPC kapsüllerinde canlılık tespit edilememiştir. +24°C'de depolanan enkapsüle probiyotik bakteriler, istatistiksel olarak serbest probiyotik bakterilerden anlamlı şekilde ayrılmakta ve daha düşük canlılık değerleri göstermektedir (p<0,01). Bu durumun, doğal bir kaplama materyali olarak kullanılan KBU'nun oda sıcaklığında yapısının bozulması sonucu kapsüllerin bakteriler üzerindeki koruyucu etkisinin azalmasından kaynaklanabileceği kanısına varılmıştır (Higl ve diğerleri, 2007; Heidebach ve diğerleri, 2010). +4°C'de serbest LR ve LPC probiyotik bakterilerin canlılığı, 28 günlük depolamanın sonuna kadar %95'in üzerinde seyretmiştir. LR ve LPC probiyotik bakteri kapsüllerinin depolamanın 28. günündeki canlılıkları ise sırasıyla %96,88±2,56 ve %95,05±1,56 olarak tespit edilmiştir. +4°C, serbest ve enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin uzun süre korunmasında ideal bir ortam olmuştur (p<0,01). -24°C'de serbest LR ve LPC probiyotik bakterilerin canlılığında belirli bir azalma meydana gelmiş ve 28. gün sonunda canlılık LR için 86,99±1,62 iken, LPC için %90,30±0,73 olarak belirlenmiştir. Probiyotik bakteri kapsülleri ise -24°C'de en iyi performansı sergilemiş, her iki probiyotik bakteride de canlılık depolama süresince oldukça yüksek bulunmuştur (28. günde LR kapsülleri için %106,50±0,12 ve LPC kapsülleri için %98,74±1,22). -24°C'de enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin canlılık değerleri diğer sıcaklıklarda depolanan bakterilere kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (p<0,01). Probiyotik bakterilerin +4°C ve -24°C sıcaklık koşullarında depolanmasında enkapsülasyon işleminin probiyotik bakterilerin stabilitesini korumada daha etkili olduğu görülmüştür. LR'nin depolama koşullarında LPC'ye karşı daha dayanıklı bir tür olduğu ve -24°C'de depolamanın KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin stabilitesini artırarak canlı hücre sayısında artış sağladığı görülmektedir.

Çizelge 4.12. LR ve LPC probiyotik bakterilerinin depolama sonrası belirlenen canlı hücre sayısı

SICAKLIK	Depolama zamanı (gün)	Serbest$^{\gamma}$ LR	Enkapsüle$^{\phi}$ LR	Serbest$^{\gamma}$ LPC	Enkapsüle$^{\phi}$ LPC
+24 °C	0	8,73±0,04^{a}	6,08±0,24^{j,k,l,m}	8,78±0,01^{a}	6,37±0,04^{ı,j}
	7	7,58±0,08^{e,f}	5,41±0,14^{n,o}	7,65±0,08^{e,f}	5,17±0,18^{o}
	14	6,53±0,01^{h,ı}	4,07±0,11^{p}	6,92±0,08^{g}	3,57±0,12^{q}
	21	6,92±0,11^{g}	3,00±0,14^{r}	6,76±0,08^{g,h}	2,60±0,01^{s}
	28	7,02±0,02^{g}	2,30±0,01^{s}	7,08±0,03^{g}	te
+4 °C	0	8,73±0,04^{a}	6,08±0,24^{j,k,l,m}	8,78±0,01^{a}	6,37±0,04^{ı,j}
	7	8,51±0,01^{a,b,c}	6,20±0,18^{ı,j,k,l}	8,62±0,06^{a,b}	6,33±0,18^{ı,j}
	14	8,54±0,06^{a,b,c}	5,90±0,16^{k,l,m}	8,57±0,03^{a,b,c}	5,86±0,23^{l,m}
	21	8,34±0,04^{b,c}	6,27±0,18^{ı,j,k}	8,58±0,08^{a,b,c}	5,81±0,16^{m}
	28	8,78±0,03^{a}	5,89±0,58^{k,l,m}	8,73±0,01^{a}	6,05±0,10^{j,k,l,m}
-24 °C	0	8,73±0,04^{a}	6,08±0,24^{j,k,l,m}	8,78±0,01^{a}	6,37±0,04^{ı,j}
	7	8,20±0,11^{c,d}	6,08±0,07^{j,k,l,m}	7,87±0,04^{d,e,f}	6,24±0,06^{ı,j,k,l}
	14	7,88±0,04^{d,e,f}	6,51±0,02^{h,ı}	7,86±0,09^{d,e,f}	5,24±0,08^{o}
	21	7,52±0,14^{f}	6,37±0,01^{ı,j}	7,55±0,19^{e,f}	5,74±0,11^{m,n}
	28	7,59±0,14^{e,f}	6,48±0,01^{h,ı}	7,93±0,06^{d,e}	6,29±0,08^{ı,j}

*ortalama±standart sapma (iki tekrar), $^{\gamma}$ log kob/mL, $^{\phi}$ log kob/g
LR: *L. rhamnosus*, LPC: *L. paracasei*, te: tespit edilemedi
a-s: Küçük harfler, sıcaklık, depolama zamanı ve probiyotik bakteri türünün canlı hücre sayısı üzerindeki istatistiksel olarak anlamlı farklı gruplarını göstermektedir (p<0,01).

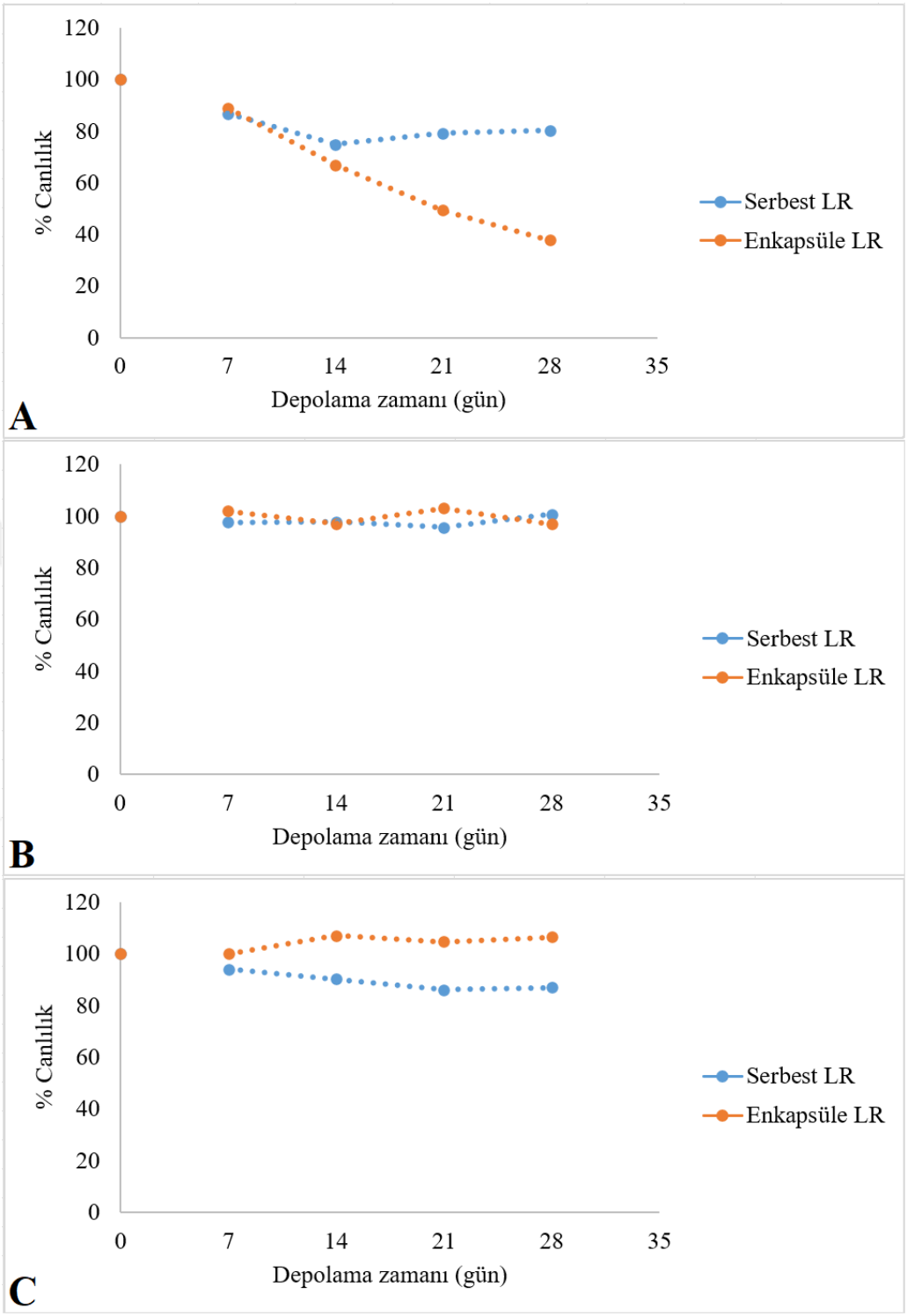
Çizelge 4.13. LR ve LPC probiyotik bakterilerinin depolama sonrası belirlenen canlılığı (%)

SICAKLIK	Depolama zamanı (gün)	Serbest LR	Enkapsüle LR	Serbest LPC	Enkapsüle LPC
+24 °C	7	86,88±0,97^{n,o}	88,98±2,33^{l,m,n,o}	87,16 ±0,97^{m,n,o}	81,23±2,89^{q}
	14	74,84±0,16^{s}	66,86±1,74^{t}	78,85±0,97^{q,r,s}	56,01±1,89^{u}
	21	79,26±1,22^{q,r}	49,34±2,33^{v}	76,97±0,89^{r,s}	40,85±0,22^{w}
	28	80,40±0,24^{q,r}	37,83±0,01^{w}	80,67±0,32^{q,r}	te
+4 °C	7	97,54±0,01^{e,f,g,h}	101,89±2,91^{b,c,d}	98,16±0,73^{d,e,f,g}	99,45±2,89^{c,d,e,d}
	14	97,82±0,73^{d,e,f,g,h}	96,96±2,67^{e,f,g,h}	97,65±0,32^{e,f,g,h}	92,07±3,55^{ı,j,k,l}
	21	95,59±0,49^{f,g,h,ı}	103,04±2,91^{a,b,c}	97,76±0,97^{d,e,f,g,h}	91,28±2,44^{j,k,l,m}
	28	100,63±0,32^{b,c,d,e}	96,88±2,56^{e,f,g,h}	99,47±0,16^{c,d,e,f}	95,05±1,56^{g,h,ı,j}
-24 °C	7	93,98±1,30^{h,ı,j,k}	100,00±1,16^{c,d,e}	89,67±0,48^{l,m,n,o}	98,04±0,89^{d,e,f,g,h}
	14	90,26±0,41^{k,l,m,n}	106,99±0,35^{a}	89,50±1,05^{l,m,n,o}	82,33±1,33^{p,q}
	21	86,19±1,62^{n,o,p}	104,69±0,12^{a,b}	85,97±2,18^{o,p}	90,10±1,67^{k,l,m,n,o}
	28	86,99±1,62^{n,o}	106,50±0,12^{a}	90,30±0,73^{k,l,m,n}	98,74±1,22^{d,e,f,g}

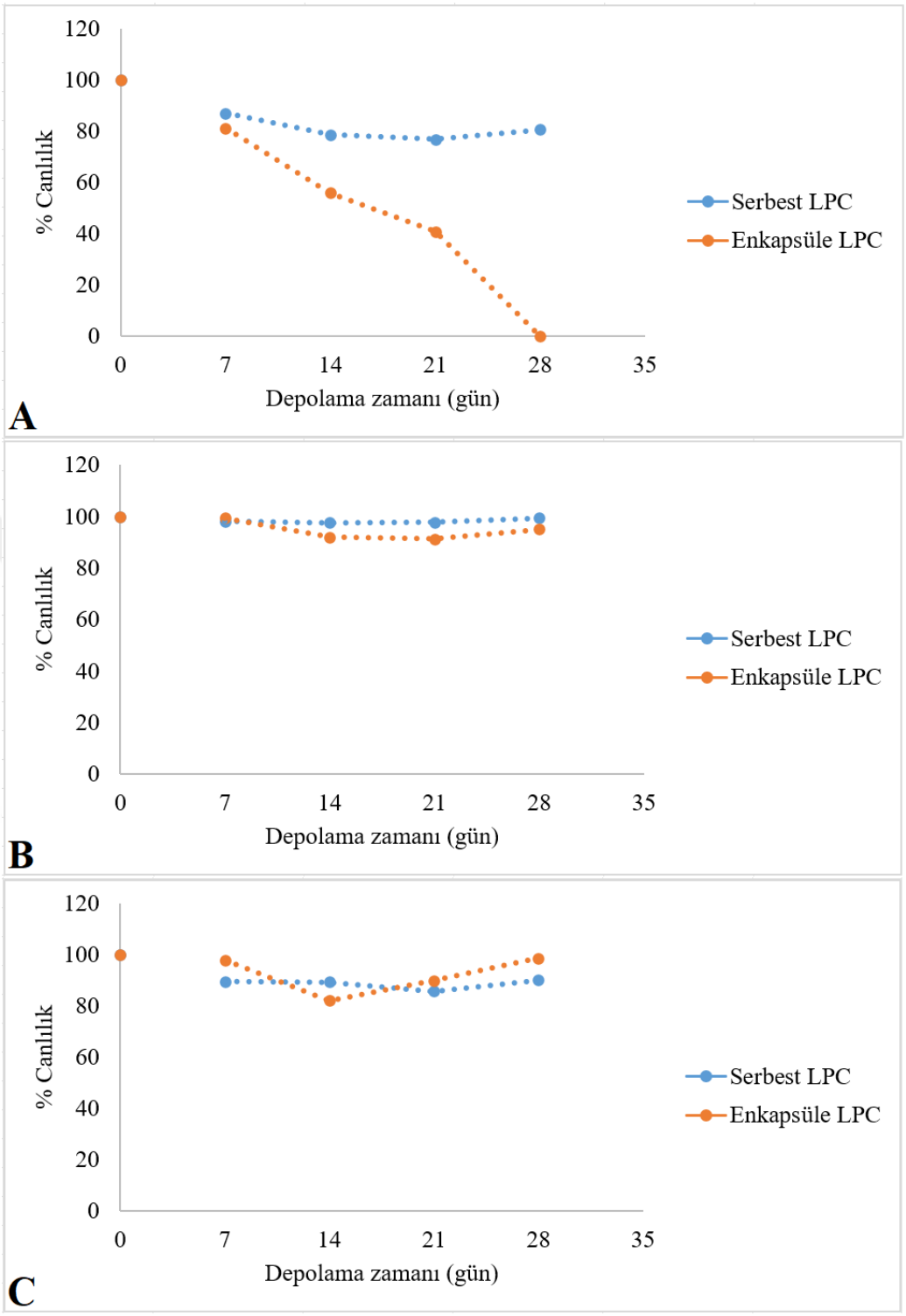
*ortalama±standart sapma (iki tekrar)

LR: *L. rhamnosus*, LPC: *L. paracasei*, te: tespit edilemedi

a-w: Küçük harfler, sıcaklık, depolama süresi ve bakteri türünün canlılık üzerindeki istatistiksel olarak anlamlı farklı gruplarını göstermektedir (p<0,01).



Şekil 4.12. Depolama süresinin ve farklı sıcaklıkların LR canlılığına etkisi. **A)** +24°C **B)** +4°C **C)** -24°C



Şekil 4.13. Depolama süresinin ve farklı sıcaklıkların LPC canlılığına etkisi. **A)** +24°C **B)** +4°C **C)** -24°C

Literatürde yer alan bir çalışmada (Nuaman ve diğerleri, 2024) *L. rhamnosus* GG probiyotik bakterisi sodyum aljinat (SA), arabinoksilan ekstraktı (AX) ve SA-AX ile enkapsüle edilerek bakterinin depolama koşullarındaki canlılığı araştırılmıştır. *L. rhamnosus* kapsüllerinin (1. gün sonunda 8,9 log kob/g) 28 gün boyunca 5°C sıcaklıkta depolanması sonucunda canlılıklarında yaklaşık 2 log kob/g'lık bir azalma olduğu görülmüştür. AX'in eklenmesiyle, kovalent çapraz bağlar oluşumunun polimer ağının yapısını güçlendirerek faydalı bir etki yarattığı bildirilmiştir. Bu durum, depolama sonunda AX-SA ile kapsüllenmiş *L. rhamnosus* canlılığının en yüksek (28. gün sonunda 6,6 log kob/g) olmasına neden olmuştur.

Fredua-Agyeman (2024) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. acidophilus* LA-5® bakterisinin, ringer çözeltisi, gliserol, yağsız süt ve trehaloz gibi koruyucular kullanılarak dondurularak kurutulması gerçekleştirilmiş ve ardından 4°C ve 25°C'deki depolama koşullarında 3 gün, 7 gün, 10 gün, 14 gün, 28 gün, 2 ay, 3 ay ve 6 ay boyunca canlılığı incelenmiştir. 4°C'de depolama koşulunda, ringer çözeltisi kullanıldığında dondurularak kurutmanın hemen ardından tamamen canlılık kaybı gözlemlenirken, gliserol kullanıldığında 7 gün sonra tamamen canlılık kaybı gözlemlenmiştir. Yağsız süt veya trehalozda dondurularak kurutulmuş hücrelerde, genellikle 2 ay boyunca canlılık korunmuştur. 6 aylık depolama süresi boyunca yağsız sütle dondurularak kurutulmuş örneklerde canlılık daha yüksek bulunmuştur. 25°C'de depolama koşulunda ise yağsız süt veya trehalozla dondurularak kurutulmuş hücreler, depolamanın ilk 14 günü canlılıklarını korumuştur. Trehaloz, diğer koruyucularla karşılaştırıldığında 6 aylık depolama süresi sonunda hücreleri korumada daha iyi performans göstermiştir. Ringer çözeltisi kullanıldığında dondurularak kurutmanın hemen ardından tamamen canlılık kaybı gözlemlenirken, gliserol kullanıldığında 3 gün sonra tamamen canlılık kaybı gözlemlenmiştir. Sonuçların, dondurularak kurutulmuş probiyotik bakterilerin 4°C'de depolanmasının hücrelerin uzun süre yüksek canlılıkla kalmasını sağlayabileceğini gösterdiği bildirilmiştir.

Başka bir çalışma kapsamında *B. lactis* Bb-12 içeren kapsüller, jelatin ve arap gamı kullanılarak kompleks koaservasyon yöntemiyle üretilmiş, ardından dondurarak kurutma işlemi uygulanmıştır. Hem ıslak hem de kuru kapsüller, 25°C (oda sıcaklığı), 7°C (soğutma) ve -18°C (dondurma) sıcaklıklarında depolanmıştır. Oda sıcaklığında depolamada hem ıslak hem de kuru kapsüller 90 gün boyunca canlılıklarını koruyarak sırasıyla 6,60 ve 9,45 log kob/g seviyelerinde tespit edilmiştir. Dondurarak kurutma işlemi, probiyotiklerin içerisindeki artık suyu uzaklaştırarak uzun süreli stabilite ve korunma sağlamıştır. Soğutma sıcaklığında, her iki kapsül formu da 120 gün boyunca canlılıklarını 6 log kob/g'nin üzerinde korumuş; ancak, ıslak kapsüller başlangıçta 14,47 log kob/g olan canlılık düzeyinin 8,83 log kob/g'ye düşmesine rağmen, daha yüksek bir canlılık göstermiştir. Bu durum, kurutma işleminin probiyotik hücrelerde hasara yol açarak depolama süresince hayatta kalma oranını etkileyebileceğini göstermektedir. Dondurma sıcaklığında depolama, diğer depolama sıcaklıklarına göre en yüksek canlılığı sağlamıştır. Her iki kapsül formu da 120 gün sonunda 6 log kob/g'nin üzerinde canlılık göstermiştir. Dondurma sıcaklığının, probiyotiklere daha fazla stabilite sağlayarak daha uzun bir raf ömrü sunduğu bildirilmiştir (da Silva ve diğerleri, 2018).

5. SONUÇ

Bu çalışmada, nutrasötik ve farmasötik endüstrilerinde kullanılan besin değeri oldukça yüksek olan keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) ununun antioksidan özelliği, fenolik bileşik içeriği ve fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Ayrıca probiyotik bakterileri enkapsüle etmek için kaplama materyali olarak kullanılmış ve probiyotik bakterilerin *in vitro* gastrointestinal sindirimde ve depolama süreçlerinde canlılıklarını koruma potansiyeli değerlendirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında KBU'nun ultrasonik destekli ekstraksiyonu ile fenolik bileşik içeriği spektroskopik ve kromatografik analizlerle belirlenmiştir. Spektroskopik analizlerde asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktlarının toplam fenolik madde, toplam flavonoid, kondanse tanen ve antioksidan aktivite içeriklerinin çözücü ekstraktlarına kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla 44,70±0,89 mg GAE/g KBU, 0,73±0,01 mg QE/g KBU, 55,05±2,00 mg CE/g KBU ve 43,84±1,12 mg TE /g KBU). Kromatografik analiz sonucunda gallik asit, epigallokateşin gallat, siringik asit, epikateşin gallat, neohesperidin, *trans*-sinnamik asit, hiperozid, kuersitrin ve apigenin olmak üzere 9 fenolik bileşik tespit edilmiştir. Gallik asidin çözücü ve asidik hidroliz içeren çözücü ekstraktlarında en yüksek bulunan fenolik bileşik olduğu belirlenmiştir (sırasıyla 2,18±0,01 mg/g KBU ve 2,54±0,04 mg/g KBU). Çalışmanın ikinci aşamasında LR ve LPC probiyotik bakterilerinin maksimum enkapsülasyon verimi ile emülsiyon yöntemi kullanılarak enkapsüle edilebilmesi için karıştırma sıcaklığı (°C), karıştırma süresi (dk) ve KBU miktarı (g) önemli faktörler olarak seçilmiş ve Box-Behnken dizaynı kullanılarak kemometrik optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. LR ve LPC probiyotik bakterilerinin KBU ile enkapsülasyonu için optimum enkapsülasyon koşulları sırasıyla karıştırma sıcaklığı için 26,97°C ve 26,82°C, karıştırma zamanı için 33,24 dk ve 15,15 dk, KBU miktarı için ise 2,93 g ve 1,38 g olarak belirlenmiştir. LR için tahmini enkapsülasyon verimi %78,32 iken deneysel enkapsülasyon verimi %79,51±0,36 olarak bulunmuştur. LPC için ise tahmini enkapsülasyon verimi %78,19 iken deneysel enkapsülasyon verimi %74,98±0,20 olarak bulunmuştur. KBU, KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin fizikokimyasal analizleri (toplam şeker, toplam yağ, toplam protein, toplam diyet lif, kuru madde, nem, titre edilebilir asitlik ve kül) gerçekleştirilmiştir. KBU'nun

yüksek fenolik bileşik ve diyet lif içeriği (%35,3±1,35) ile fonksiyonel bir kaplama materyali olarak seçilmesinin uygun olduğu doğrulanmıştır. KBU-LR ve KBU-LPC kapsüllerinin fizikokimyasal özellikleri KBU'ya göre önemli ölçüde değişmiştir. KBU, sterilize KBU ve KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumları incelendiğinde, enkapsülasyon sonrası özellikle protein ve karbohidrat bölgelerinde belirgin değişiklikler meydana gelmiş olup, bu durum probiyotik bakterilerin KBU ile etkileşime girdiğini göstermektedir. SEM görüntüleri ise, enkapsülasyon sonrası probiyotik bakterilerin KBU yüzeyine gömülü olduğunu ve bu süreçte önemli morfolojik değişikliklerin meydana geldiğini göstermektedir. Çalışmanın üçüncü aşamasında, serbest ve enkapsüle edilen LR ve LPC probiyotik bakterilerinin, *in vitro* gastrointestinal sindirim koşullarında ve depolama sürecindeki canlılıkları incelenmiştir. Enkapsüle edilen LR ve LPC probiyotik bakterileri, serbest LR ve LPC probiyotik bakterilerine kıyasla *in vitro* gastrointestinal sindirim koşullarına karşı daha dayanıklı olmuştur. LPC, LR'ye kıyasla mide ve bağırsak ortamlarında daha yüksek canlılık oranları göstermiştir. -24°C ve +4°C'de depolama sonrası KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin stabilitesi önemli ölçüde korunurken, +24°C'de KBU-probiyotik bakteri kapsülleri daha düşük direnç göstermiştir. LR'nin depolama koşullarına LPC'ye göre daha dayanıklı olduğu ve -24°C'de depolamanın KBU-probiyotik bakteri kapsüllerinin stabilitesini artırarak canlı hücre sayısında artış sağladığı sonucuna ulaşılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, potansiyel prebiyotik özellikteki KBU'nun probiyotik bakterilerin enkapsülasyonunda önemli bir etkiye sahip olduğunu ve bu yolla probiyotik ürünlerin endüstriyel uygulamaları için uygun bir yaklaşım sunabileceğini ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda, KBU'nun fonksiyonel gıda ürünlerinde kullanımı arttırılarak hem insan sağlığına hem de gıda endüstrisine katkı sağlanabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Acordi Menezes, L. A., Matias de Almeida, C. A., Mattarugo, N. M. D. S., Ferri, E. A. V., Bittencourt, P. R. S., Colla, E., & Drunkler, D. A. (2018, Temmuz). Soy extract and maltodextrin as microencapsulating agents for *Lactobacillus acidophilus*: A model approach. *Journal of Microencapsulation, 35*(7-8), 705-719. https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1579264

Ahmed, H., Nawel, O., Sahnouni, F., & Djilali, B. (2009, Şubat). Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Revue de Microbiologie Industrielle, Sanitaire et Environnementale*, 37-55.

Alba Caballero–Pérez, L., Tejedor–Arias, R., & Josefina Salas–Osorio, E. (2023, Ekim). Survival of a mixed culture of microencapsulated probiotic strains against the gastrointestinal barrier *in vitro*. *Revista Cientifica de la Facultade de Veterinaria, 33*(2). https://doi.org/10.52973/rcfcv-e33296

Antoniou, C., Kyriacou, M. C., Kyratzis, A. C., & Rouphael, Y. (2023, Haziran). Linking colorimetric variation with non-volatile and volatile components of carob flour. *Foods, 12*(3), 2556. https://doi.org/10.3390/foods12132556

AOAC International. (2000). *AOAC 968.28: Total sugars in molasses as invert sugar, Lane-Eynon constant volume volumetric method.* In *Official Methods of Analysis of AOAC International.*

AOAC International. (2003). *AOAC 991.43: Total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods and food products, enzymatic-gravimetric method.* In W. Horwitz (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International (17th ed.).*

AOAC International. (2005). *AOAC 990.03: Crude protein in animal feed, combustion method.* In *Official Methods of Analysis of AOAC International (18th ed.).*

Arab, R., Hano, C., Oomah, D., Yous, F., Ayouaz, S., Madani, K., & Boulekbache-Makhlouf, L. (2022, Aralık). Impact of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp flour supplementation on probiotic viability, milk fermentation and antioxidant capacity during yogurt storage. *The North African Journal of Food and Nutrition Research, 6*(14), 154-164. https://doi.org/10.51745/najfnr.6.14.154-164

Ayad, R., Ayad, R., Boudjerda, S., Bessibes, S., & Idoui, T. (2023, Eylül). The effects of boiling and freezing processing methods on the quality characteristics, bioactive compound content, and antioxidant capacity of Jijel region carob pods, *Ceratonia siliqua* L. *Moroccan Journal of Chemistry, 11*(04), 11-4. https://doi.org/10.48317/IMIST.PRSM/morjchem-v11i04.41265

Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., da Silva, R. C., & Ibrahim, S. A. (2020, Ekim). Lactic acid bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy, 1*(3), 202-232. https://doi.org/10.3390/dairy1030015

Bakır, B. O. (2012, Ağustos). Prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotiklere genel bakış. *Beslenme ve Diyet Dergisi, 40*(2), 178-182.

Bilginer, H., & Çetin, B. (2019, Eylül). Probiyotikler ve belirlenmelerinde kullanılan *in vitro* testler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 50*(3), 312-325. https://doi.org/10.17097/ataunizfd.549552

Brassesco, M. E., Brandão, T. R. S., Silva, C. L. M., & Pintado, M. (2021, Haziran). Carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): A new perspective for functional food. *Trends*

in Food Science & Technology, 114, 310–322. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.037

Capcanari, T., Chirsanova, A., Radu, O., Covaliov, E., Popovici, V., & Siminiuc, R. (2022, Aralık). Functional profile of carob (*Ceratonia siliqua L.*) beans and pod pulp originated from the Republic of Moldova. *Czech Journal of Food Sciences, 40*(6), 465–473. https://doi.org/10.17221/139/2022-CJFS

Capurso, L. (2019, Mart). Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *53*(Suppl 1), 1-41. https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001170

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004, Ocak). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, *56*(1), 27-35. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.002

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002, Eylül). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of food and drug analysis*, *10*(3), 178-182. https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748

Chapot-Chartier, M. P., & Kulakauskas, S. (2014, Ağustos). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, *13*(Suppl 1), 9. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9

Chawda, P. J., Shi, J., Xue, S., & Quek, S. Y. (2017, Aralık). Co-encapsulation of bioactives for food applications. *Food Quality and Safety, 1*(4), 302-309. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx028

Choińska-Pulit, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W., & Skaradzińska, A. (2015, Ekim). Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science & Technology, 45*(2), 212-221. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.001

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & del Carmen Villarán, M. (2010, Ağustos). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology, 142*(1-2), 185-189. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022

Chávarri, M., Marañón, I., & Villarán, M. C. (2012, Ekim). Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. *Probiotics*, IntechOpen. https://doi.org/10.5772/50046

Collins, M. D., Phillips, B. A., & Zanoni, P. (1989, Nisan). Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 39*(2), 105-108. https://doi.org/10.1099/00207713-39-2-105

Červenka, L., Frühbauerová, M., Palarčík, J., Muriqi, S., & Velichová, H. (2022, Kasım). The effect of vibratory grinding time on moisture sorption, particle size distribution, and phenolic bioaccessibility of carob powder. *Molecules, 27*(22), 7689. https://doi.org/10.3390/molecules27227689

da Silva, S. Â. D., Batista, L. D. S. P., Diniz, D. S., Nascimento, S. S. D. C., Morais, N. S., de Assis, C. F., Passos, T. S., & de Sousa Júnior, F. C. (2023, Aralık). Microencapsulation of probiotics by oil-in-water emulsification technique improves cell viability under different storage conditions. *Foods, 12*(2), 252. https://doi.org/10.3390/foods12020252

da Silva, T. M., Lopes, E. J., Codevilla, C. F., Cichoski, A. J., Flores, E. M. M., Motta, M. H., de Bona da Silva, C., & de Menezes, C. R. F. (2018, Aralık). Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium Bb-12* produced by complex coacervation followed by freeze drying. *LWT, 90*, 412-417. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.057

Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019, Mart). Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, *8*(3), 92. https://doi.org/10.3390/foods8030092

de Castro-Cislaghi, F. P., Carina Dos Reis, E. S., Fritzen-Freire, C. B., Lorenz, J. G., & Sant'Anna, E. S. (2012, Kasım). *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, *113*(2), 186-193. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.006

de Matos-Jr, F. E., da Silva, M. P., Kasemodel, M. G. C., Santos, T. T., Burns, P., Reinheimer, J., Vinderola, G., & Favaro-Trindade, C. S. (2019, Şubat). Evaluation of the viability and the preservation of the functionality of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* BGP1 and *Lactobacillus rhamnosus* 64 in lipid particles coated by polymer electrostatic interaction. *Journal of Functional Foods, 54*, 98-108. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.006

Delfanian, M., Sahari, M. A., Barzegar, M., & Ahmadi Gavlighi, H. (2021, Kasım). Structure–antioxidant activity relationships of gallic acid and phloroglucinol. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*, 5036-5046. https://doi.org/10.1007/s11694-021-01045-y

Demir, D., Ceylan, S., Göktürk, D., & Bölgen, N. (2021, Nisan). Extraction of pectin from albedo of lemon peels for preparation of tissue engineering scaffolds. *Polymer Bulletin, 78*, 2211-2226. https://doi.org/10.1007/s00289-020-03208-1

Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005, Temmuz). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, *23*(7), 1361-1394. https://doi.org/10.1081/DRT-200063478

Doğan, M. (2011). Probiyotik bakterilerin etki mekanizması. *Anadolu Bil Meslek Yüksekokulu Dergisi*, *21*, 98-104.

Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G., & Carcea, M. (2014, Ocak). Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carob flours. *Food Chemistry, 153*, 109–113. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.045

Eghbal, N., Liao, W., Dumas, E., Azabou, S., Dantigny, P., & Gharsallaoui, A. (2022, Nisan). Microencapsulation of natural food antimicrobials: Methods and applications. *Applied Sciences*, *12*(8), 3837. https://doi.org/10.3390/app12083837

El Batal, H., Hasib, A., Ouatmane, A., Dehbi, F., Jaouad, A., & Boulli, A. (2016, Kasım). Sugar composition and yield of syrup production from the pulp of Moroccan carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Arabian Journal of Chemistry, 9*, 955–959. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.10.012

Fadel, H. H., Abdel Mageed, M. A., Abdel Samad, A. K. M., & Lotfy, S. N. (2006, Mayıs). Cocoa substitute: Evaluation of sensory qualities and flavour stability. *European Food Research and Technology*, *223*, 125-131. https://doi.org/10.1007/s00217-005-0162-3

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010, Ekim). Encapsulation of polyphenols: A review. *Trends in Food Science & Technology, 21*(10), 510-523. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003

Ferreira, V. C., Barroso, T. L. C. T., Castro, L. E. N., Da Rosa, R. G., & de Siqueira Oliveira, L. (2023, Ağustos). An overview of prebiotics and their applications in the food industry. *European Food Research and Technology, 249*(11), 2957-2976. https://doi.org/10.1007/s00217-023-04341-7

Formagio, A. S. N., Volobuff, C. R. F., Santiago, M., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. D. C., & Pereira, Z. V. (2014, Kasım). Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. *Antioxidants*, *3*(4), 745-757. https://doi.org/10.3390/antiox3040745

Fredua-Agyeman, M. (2024, Mart). Surviving process and transit: Controlled freeze drying, storage, and enteric coated capsules for targeted delivery of probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Heliyon, 10*(7), e28407. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28407

Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012, Şubat). Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, *4*(1), 149-163. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics4010149

Geniş, B., & Tuncer, Y. (2019, Aralık). Probiyotik kültürlerin mikroenkapsülasyonunda kullanılan farklı kaplama materyalleri ve yöntemler. *GIDA, 44*(6), 1222-1236. https://doi.org/10.15237/gida.GD19087

Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999, Mayıs). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 50*(3), 213-224. https://doi.org/10.1080/096374899101256

Giner-Chavez, B. I., Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lascano, C., Reed, J. D., & Pell, A. N. (1997, Temmuz). A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 74*(3), 359-368. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199707)74:3<359::AID-JSFA811>3.0.CO;2-C

Gismondo, M. R., Drago, L., & Lombardi, A. (1999, Ağustos). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter*, *17*(10), 79. https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00050-3

Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., & Salminen, S. (1992, Ocak). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences, 37*(1), 121-128.

Goulas, V., & Georgiou, E. (2020, Aralık). Utilization of carob fruit as sources of phenolic compounds with antioxidant potential: Extraction optimization and application in food models. *Foods, 9*(1), 20. https://doi.org/10.3390/foods9010020

Gökbulut, İ., & Öztürk, F. S. (2018, Haziran). Gıda mikroenkapsülasyonunda aljinat kullanımı. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi, 8*(1/2), 16-27.

Gökmen, S., Palamutoglu, R., & Sarıçoban, C. (2012, Ocak). Applications of encapsulation in food industry. *Electronic Journal of Food Technologies, 7(1),* 36-50.

Grom, L. C., Coutinho, N. M., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Silva, R., Rocha, R. S., Freitas, M. Q., Duarte, M. C. K. H., Pimentel, T. C., Esmerino E. A., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2020, Mayıs). Probiotic dairy foods and postprandial glycemia: A mini-review. *Trends in Food Science & Technology, 101*, 165-171. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.012

Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2010, Ocak). Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering, 98*(3), 309-316. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.003

Higl, B., Kurtmann, L., Carlsen, C. U., Ratjen, J., Först, P., Skibsted, L. H., Kulozik, U., & Risbo, J. (2007, Ağustos). Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnology Progress, 23*(4), 794-800. https://doi.org/10.1021/bp070089d

Hssaini, L., Meziani, R., Razouk, R., & Irchad, A. (2024, Aralık). Carob (Ceratonia siliqua L.) cultivation, processing, and industrial applications: A review: Carob. *African and Mediterranean Agricultural Journal-Al Awamia, 145,* 87-107. https://doi.org/10.34874/IMIST.PRSM/afrimed-i145.48029

Huq, T., Khan, A., Khan, R. A., Riedl, B., & Lacroix, M. (2013, Haziran). Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53*(9), 909-916. https://doi.org/10.1080/10408398.2011.573152

Ioannou, G. D., Savva, I. K., Christou, A., Stavrou, I. J., & Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2023, Şubat). Phenolic profile, antioxidant activity, and chemometric classification of carob pulp and products. *Molecules, 28*(5), 2269. https://doi.org/10.3390/molecules28052269

Ivanovska, T. P., Petruševska-Tozi, L., Kostoska, M. D., Geškovski, N., Grozdanov, A., Stain, C., Stafilov, T., & Mladenovska, K. (2012, Haziran). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* in chitosan-Ca-alginate microparticles using spray-drying method. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 31*(1), 115-123. https://doi.org/10.20450/mjcce.2012.64

Jofré, A., Aymerich, T., & Garriga, M. (2015, Ocak). Impact of different cryoprotectants on the survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei/paracasei* during long-term storage. *Beneficial Microbes, 6*(3), 381-386. https://doi.org/10.3920/BM2014.0038

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

Karkar, B. (2023). *Bazı probiyotik bakterilerin iğde (Elaeagnus angustifolia L.) üzerine enkapsülasyonunun analitik yöntemlerle araştırılması* (Tez No. 789819) [Doktora Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi]. Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezi.

Karkar, B., Patır, İ., & Şahin, S. (2024a, Mayıs). Development of galangin-loaded nano-sized polyelectrolyte liposome: optimization and characterization. *Polymer Bulletin, 81*(4), 2847-2867. https://doi.org/10.1007/s00289-023-04826-1

Karkar, B., Şahin, S., & Güneş, M. E. (2021, Aralık). Evaluation of antioxidant properties and determination of phenolic and carotenoid profiles of chestnut bee pollen collected from Turkey. *Journal of Apicultural Research, 60*(5), 765-774. https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1844462

Karkar, B., Şahin, S., Yılmaz-Ersan, L., Akça, B., Güneş, M. E., & Özakın, C. (2024b, Temmuz). Encapsulation of *Lacticaseibacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* using *Elaeagnus angustifolia* L. flour as encapsulating material by emulsion method. *Food Science & Nutrition, 12*(9), 6810-6825. https://doi.org/10.1002/fsn3.4328

Karrar, E., Mahdi, A. A., Sheth, S., Ahmed, I. A. M., Manzoor, M. F., Wei, W., & Wang, X. (2021, Şubat). Effect of maltodextrin combination with gum arabic and whey protein isolate on the microencapsulation of gurum seed oil using a spray-drying

method. *International Journal of Biological Macromolecules*, *171*, 208-216. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.045

Kavitake, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., & Shetty, P. H. (2018, Şubat). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods–A review. *Food Bioscience, 21*, 34-44. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.003

Khan, M. R., Khan, S., Islam, J., Mahmud, S., Biki, S. P., & Ahmed, M. (2024, Kasım). Influence of microencapsulated *Streptococcus thermophilus* ST-HSTU-FPP and *Limosilactobacillus fermentum* LS-HSTU-FPP strains on biochemical features of yogurt following in-vitro simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *18*(2), 1229-1236. https://doi.org/10.1007/s11694-023-02224-9

Kılıç, E. E., Halil Kılıç, İ., & Koç, B. (2022, Ocak). Yoghurt production potential of lactic acid bacteria isolated from leguminous seeds and effects of encapsulated lactic acid bacteria on bacterial viability and physicochemical and sensory properties of yoghurt. *Journal of Chemistry*, *2022*(1), 2683126. https://doi.org/10.1155/2022/2683126

Koç, M., Sakin, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2010, Ocak). Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16*(1), 77-86.

Kolaç, T., Gürbüz, P., & Yetiş, G. (2017). Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, *5*(1), 26-42.

Konak, Ü. İ., Keskin, H., Yavuz Abanoz, Y., Aslan, M., & Arslan Tontul, S. (2023, Ağustos). Quality characteristics of functional snack foods prepared from hazelnut shell and teff flour. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *17*(6), 5721-5729. https://doi.org/10.1007/s11694-023-02079-0

Köse, B., Aydın, A., Özdemir, M., & Yeşil, E. (2019, Eylül). Sağlık çalışanlarının probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotikler hakkındaki bilgi düzeyinin ve tüketim durumlarının belirlenmesi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, *18*(2), 67-72. https://doi.org/10.17941/agd.619171

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003, Aralık). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, *13*(1), 3-13. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3

Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M. S., & Nakayama, T. (2002, Şubat). Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(2), 373-377. https://doi.org/10.1021/jf010938r

Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., & Korma, S. A. (2023, Ağustos). Probiotics: Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1216674. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674

Leboš Pavunc, A., Penava, L., Čuljak, N., Banić, M., Novak, J., Butorac, K., Ceilinger, M., Miličević, J., Čukelj, D., Šušković, J., & Kos, B. (2023, Aralık). Evaluation of the probiotic properties of *Lacticaseibacillus casei* 431® isolated from Food for Special Medical Purposes[§]. *Food Technology and Biotechnology*, *61*(4), 418-429. https://doi.org/10.17113/ftb.61.04.23.8045

Leser, T., & Baker, A. (2024, Nisan). Molecular Mechanisms of *Lacticaseibacillus rhamnosus*, LGG® Probiotic Function. *Microorganisms*, *12*(4), 794. https://doi.org/10.3390/microorganisms12040794

Luo, Y., De Souza, C., Ramachandran, M., Wang, S., Yi, H., Ma, Z., Zhang, L., & Lin, K. (2022, Aralık). Precise oral delivery systems for probiotics: A review. *Journal of Controlled Release*, *352*, 371-384. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.10.030

Mahmud, S., Khan, S., Khan, M. R., Islam, J., Sarker, U. K., Hasan, G. A., & Ahmed, M. (2022, Eylül). Viability and stability of microencapsulated probiotic bacteria by freeze-drying under *in vitro* gastrointestinal conditions. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(11), e17123. https://doi.org/10.1111/jfpp.17123

Malmo, C., La Storia, A., & Mauriello, G. (2013, Mart). Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cells coated in alginate beads with chitosan by spray drying to use as a probiotic cell in a chocolate soufflé. *Food and Bioprocess Technology*, *6*, 795-805. https://doi.org10.1007/s11947-011-0755-8

Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017, Eylül). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, *9*(9), 1021. https://doi.org/10.3390/nu9091021

Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015, Şubat). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 27*, 15-25. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010

Mayordomo-Maya, S., & Hermosilla-Pla, J. (2024, Haziran). Heritage evaluation of the carob tree MTAS in the territory of Valencia: Analysis and social perception of the ecosystem services and values from cultivating it. *Land, 13*(7), 922. https://doi.org/10.3390/land13070922

Nuaman, M., Afzaal, M., Saeed, F., Ahmed, A., Asghar, A., Kamilah, H., Hussain, S., & Ndagire, C. (2024, Temmuz). Survivability of probiotic under simulated gastrointestinal conditions as affected by synbiotic (alginate-arabinoxylan) encapsulation. *International Journal of Food Properties, 27*(1), 1021-1032. https://doi.org/10.1080/10942912.2024.2380376

Orla-Jensen, S. (1919). The Lactic Acid Bacteria; Andr Fred Host and Sons imp, *3*(2).

Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Haber, B. (2003, Aralık). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, *41*(12), 1727–1738. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00200-X

Öztürk, M., & Yılmaz, H. Ö. (2024, Nisan). Diyet Polifenollerinin Bağırsak Mikrobiyotası Üzerindeki Etkisi. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, *52*(1), 87-98. https://doi.org/10.33076/2024.BDD.1827

Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015, Temmuz). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*, 7577-7587. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1

Pazır, F., & Alper, Y. (2016, Eylül). Keçiboynuzu meyvesi (*Ceratonia siliqua* L.) ve sağlık. *Akademik Gıda, 14*(3), 302-306.

Pazır, F., & Alper, Y. (2018, Mayıs). Carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) and its products. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, *28*(1), 108-112.

Petkova, N. T., Petrova, I., Ivanov, I., & Mihov, R. (2017, Kasım). Nutritional and antioxidant potential of carob (*Ceratonia siliqua*) flour and evaluation of functional

properties of its polysaccharide fraction. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 9*(10), 2189-2195.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999, Mayıs). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine, 26*(9-10), 1231-1237. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Reale, A., Di Renzo, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziuso, M., Parente, E., Sorrentino, E., & Coppola, R. (2015, Mart). Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT-Food Science and Technology*, *60*(2), 721-728. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.022

Richane, A., Rim, B. M., Wided, M., Riadh, K., Khaoula, A., Nizar, M., & Hanen, B. I. (2022, Ekim). Variability of phenolic compounds and antioxidant activities of ten *Ceratonia siliqua L.* provenances. *Biochemical Systematics and Ecology, 104*, 104486. https://doi.org/10.1016/j.bse.2022.104486

Rojas-Espina, D., Urriola-Urriola, N., Cañas-Sarazúa, R., & Briones-Labarca, V. (2024, Haziran). Optimizing the viability of microencapsulated *Lactiplantibacillus plantarum* using response surface methodology for dietary probiotic delivery. *Future Foods, 9*, 100329. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100329

Roshanzamir, M., Jafari, M., Molaee Aghaee, E., Ghasemkhani, I., & Hanifpor, M. (2017). The survival of probiotic bacteria and sensory properties of yogurt affected by microencapsulation with resistant starch. *Journal of Food Safety & Hygiene, 3*(3-4), 59-64.

Saifullah, M., Shishir, M. R. I., Ferdowsi, R., Rahman, M. R. T., & Vuong, Q. V. (2019, Şubat). Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends in Food Science & Technology, 86*, 230-251. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.030

Salçın, N., & Ercoşkun, H. (2021, Ağustos). Diyet lifi ve sağlık açısından önemi. *Akademik Gıda, 19*(2), 234-243. https://doi.org/10.24323/akademik-gida.977432

Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaşer, V. (2010, Mayıs). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of Food Science, 75*(4), 328-335. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01571.x

Serna-Cock, L., & Vallejo-Castillo, V. (2013, Ekim). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research, 7*(40), 4743-4753. https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5718

Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, *33*(6), 501-547. https://doi.org/10.1080/10408399309527645

Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018, Ağustos). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology, 78*, 34-60. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018

Singarayar, M. S., Chandrasekaran, A., Balasundaram, D., Veerasamy, V., Neethirajan, V., & Thilagar, S. (2024, Aralık). Prebiotics: Comprehensive analysis of sources, structural characteristics and mechanistic roles in disease regulation. *Microbial Pathogenesis, 197*, 107071. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107071

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu

reagent. In *Methods in Enzymology, 299*, 152-178. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Song, Y., Cong, Y., Wang, B., & Zhang, N. (2020, Nisan). Applications of Fourier transform infrared spectroscopy to pharmaceutical preparations. *Expert Opinion on Drug Delivery, 17*(4), 551-571. https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1737671

Soto, J. G. M., Laredo, R. F. G., Torres, L. M., Quiñones, O. M. R., Infante, J. A. G., & Ochoa-Martínez, L. A. (2023, Nisan). Recent developments on wall materials for the microencapsulation of probiotics: A review. *Tecnociencia Chihuahua*, *17*(1), e1140. https://doi.org/10.54167/tch.v17i1.1140

Stasiak-Różańska, L., Berthold-Pluta, A., Pluta, A. S., Dasiewicz, K., & Garbowska, M. (2021, Ocak). Effect of simulated gastrointestinal tract conditions on survivability of probiotic bacteria present in commercial preparations. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 18*(3), 1108. https://doi.org/10.3390/ijerph18031108

Stavrou, I. J., Christou, A., & Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2018, Aralık). Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact. *Food Chemistry, 269*, 355-374. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.152

Şahin, S., Demir, C., & Malyer, H. (2011, Temmuz). Determination of phenolic compounds in *Prunella* L. by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55*(5), 1227-1230. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.016

Şahin, S., Oran, S., Şahintürk, P., Demir, C., & Öztürk, Ş. (2015, Haziran). R amalina Lichens and Their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Journal of Food Biochemistry*, *39*(4), 471-477. https://doi.org/10.1111/jfbc.12142

Ta, L. P., Bujna, E., Antal, O., Ladányi, M., Juhász, R., Szécsi, A., Kun, S., Sudheer, S., Gupta, V. K., & Nguyen, Q. D. (2021, Temmuz). Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. *International Journal of Biological Macromolecules, 183*, 1136-1144. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.170

Tharmaraj, N., & Shah, N. P. (2003, Temmuz). Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. *Journal of Dairy Science*, *86*(7), 2288-2296. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73821-1

Tipigil, E. (2015). *İki farklı yöntem kullanılarak probiyotik bakteri mikroenkapsülasyonu ve ayranda depolama periyodu boyunca hücre stabilitesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması* (Tez No. 409967) [Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi]. Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezi.

Torun, H., Ayaz, F. A., Colak, N., Grúz, J., & Strnad, M. (2013, Haziran). Phenolic acid content and free radical-scavenging activity of two differently processed carob tree (*Ceratonia siliqua L.*) pod. *Food and Nutrition Sciences, 4*(5), 547–553. https://doi.org/ 10.4236/fns.2013.45070

Türk Standartları Enstitüsü. (1998). *TS 1129 ISO 1026: Meyve ve sebze ürünleri-Duyusal analiz için soğuk su ekstraktı hazırlanması.*

Türk Standartları Enstitüsü. (2002). *TS 1125 ISO 750: Meyve ve sebze ürünleri-Titrasyon asitliğinin belirlenmesi.*

Türk Standartları Enstitüsü. (2008). *TS 1466: Domates salçası ve püresi.*

Türk Standartları Enstitüsü. (2010). *TS EN ISO 659: Yağlı tohumlar-Yağ içeriğinin belirlenmesi (Referans yöntem).*

Türk Standartları Enstitüsü. (2023). *TS EN ISO 2171: Tahıllar, baklagiller ve yan ürünleri-Yakılarak kül muhtevasının tayini*.

Uran, H., Aloğlu, H. Ş., & Çetin, B. (2017, Ağustos). Microencapsulation of probiotic bacteria. *Mediterranean Agricultural Sciences*, *30*(2), 107-112.

Uymaz, B. (2010, Ocak). Probiyotikler ve Kullanım Alanları. *Pamukkale UniversityJournal of Engineering Sciences*, *16*(1).

Xiao, Y., Han, C., Yang, H., Liu, M., Meng, X., & Liu, B. (2020, Nisan). Layer (whey protein isolate)-by-layer (xanthan gum) microencapsulation enhances survivability of *L. bulgaricus* and *L. paracasei* under simulated gastrointestinal juice and thermal conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, *148*, 238-247. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.113

Yangilar, F. (2013, Haziran). The application of dietary fibre in food industry: structural features, effects on health and definition, obtaining and analysis of dietary fibre: a review. *Journal of Food and Nutrition Research*, *1*(3), 13-23. https://doi.org/10.12691/jfnr-1-3-1

Zhao, Q., Mutukumira, A., Lee, S. J., Maddox, I., & Shu, Q. (2012, Ocak). Functional properties of free and encapsulated *Lactobacillus reuteri* DPC16 during and after passage through a simulated gastrointestinal tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*, 61-70. https://doi.org/10.1007/s11274-011-0792-5

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O'Toole, P., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M.G., & Lebeer, S. (2020, Nisan). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782-2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107

Zhu, B. J., Zayed, M. Z., Zhu, H. X., Zhao, J., & Li, S. P. (2019, Eylül). Functional polysaccharides of carob fruit: a review. *Chinese Medicine*, *14*(1), 40. https://doi.org/10.1186/s13020-019-0261-x

Ziar, H., Yahla, I., Sadoud, M., Keddar, K., Dilmi-Bouras, A., Riazi, A., & Gérard, P. (2022, Ağustos). Association of carob galactomannans with probiotic bacteria in synbiotic fermented milk and colon targeted-release carrier. *International Food Research Journal*, *29*(4), 879-891. https://doi.org/10.47836/ifrj.29.4.15

Zubair, W., Afzaal, M., Saeed, F., Ahmed, A., Ateeq, H., Akram, N., Shah, Y. A., Asghar, A., Manoharadas, S., Nawaz, A., & Teferi Asres, D. (2023, Kasım). Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* under stressed conditions as affected by taro starch (*Colocasia esculenta*) encapsulation. *International Journal of Food Properties*, *26*(2), 3465-3476. https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2286892