



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FARKLI KURUTMA YÖNTEMLERİYLE
ÜRETİLEN *Bifidobacterium bifidum*
KÜLTÜRLERİNDE KLİNOPTİLOLİT
KULLANIMININ ETKİSİ

Ruqaia Jamal Abood JARARAH

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Temmuz-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Ruqaia Jamal Abood JARARAH tarafından hazırlanan “**Farklı Kurutma Yöntemleriyle Üretilen *Bifidobacterium bifidum* Kültürlerinde Klinoptilolit Kullanımının Etkisi**” adlı tez çalışması 24/07/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Gamze ÜÇOK

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hilal ARSLAN BAYRAKÇI

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü tarafından 24AB19004 nolu araştırma projesinin bir bölümü olarak gerçekleştirilmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Ruqaiya Jamal Abood JARARAH

29/07/2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KURUTMA YÖNTEMLERİYLE *Bifidobacterium bifidum* KÜLTÜRLERİNDE KLİNOPTİLOLİT KULLANIMININ ETKİSİ

Ruqaiya Jamal Abood JARARAH

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gamze ÜÇOK

2025, 66 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Gamze ÜÇOK

Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

Dr. Öğr. Üyesi Hilal ARSLAN BAYRAKÇI

Günümüzde, probiyotik mikroorganizmaların kurutma ve depolama süreçleri boyunca canlılıklarını koruyabilmeleri, fonksiyonel gıda ve farmasötik uygulamalar açısından önemli bir zorluk oluşturmaktadır. Bu çalışmada, klinoptilolit (zeolit), yağsız süt tozu ve bunların kombinasyonunun, *Bifidobacterium bifidum* kültürlerinin canlılığı üzerindeki koruyucu etkileri; dondurarak kurutma ve vakum kurutma yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Deneysel gruplarda; %20 süt tozu (a/h), %20 (a/h) zeolit ve %10 (a/h) süt tozu + %10 (a/h) zeolit kombinasyonu kullanılmıştır. Örneklerin başlangıçtaki mikroyapısal özellikleri alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopu (FE-SEM) ile karakterize edilmiş, ardından 4 °C'de 90 gün boyunca depolanarak mikrobiyal canlılık, nem içeriği, su absorpsiyonu, pH ve toplam titredilebilir asitlik (TTA) parametreleri periyodik olarak izlenmiştir. Elde edilen bulgular, hem kurutma yönteminin hem de taşıyıcı bileşiminin probiyotik stabilitesi üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Dondurarak kurutulmuş süt tozu içeren örneklerde (LS), canlılık en yüksek seviyede korunmuş (0,03 log kob/g kayıp), buna karşılık, yalnızca zeolit içeren vakum kurutulmuş örneklerde (VZ) en fazla canlılık kaybı görülmüş ve probiyotik etki için kabul edilen minimum düzeyin (10⁶ kob/g) altına inmiştir. Süt tozu-zeolitin kombinasyonundan oluşan matris (LK) ise sinerjik bir koruyucu etki göstererek 0,47 log kob/g canlılık kaybı ile yüksek koruma sağlamış, pH stabilitesini korumuş ve depolama süresince nem absorpsiyonuna karşı dirençli bir yapı sergilemiştir. FE-SEM görüntüleri, bu bileşik matrisin hücre bütünlüğü ve fiziksel yapısı üzerindeki koruyucu etkisini doğrulamıştır. Çalışma, zeolitin nem düzenleyici ve pH tamponlama özellikleri ile süt tozunun biyokimyasal koruyucu sinerjistik birleşiminin, *B. bifidum*'un canlılığını etkili şekilde koruduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, protein-şeker bazlı ve mineral bazlı koruyucuların entegrasyonunun, ticari olarak kullanılabilir stabil probiyotik tozlarının geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Bifidobacterium bifidum*, dondurarak kurutma, klinoptilolit, kriyoprotektan, vakum kurutma, zeolit

ABSTRACT

MS THESIS

THE EFFECT OF CLINOPTILOLITE USE ON *Bifidobacterium bifidum* CULTURES PRODUCED BY DIFFERENT DRYING METHODS

Ruqaiya Jamal Abood JARARAH

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF PHILOSOPHY
IN FOOD ENGINEERING**

Advisor: Asst. Dr. Gamze ÜÇOK

2025, 66 Pages

Jury

Asst. Prof. Dr. Gamze ÜÇOK

Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

Asst. Prof. Dr. Hilal ARSLAN BAYRAKÇI

Today, maintaining the viability of probiotic microorganisms throughout drying and storage remains a major challenge for both functional food and pharmaceutical applications. This study explored the protective effects of clinoptilolite (zeolite), skim milk powder, and their combination on the viability of *Bifidobacterium bifidum* cultures, using freeze-drying and vacuum-drying methods. The experimental groups included 20% (w/v) milk powder, 20% (w/v) zeolite, and a combination of 10% milk powder + 10% zeolite. The initial microstructural properties of the samples were characterized by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), after which they were stored at 4 °C for 90 days with periodic monitoring of microbial viability, moisture content, water absorption, pH, and total titratable acidity (TTA). The results showed that both the drying method and the choice of carrier significantly influenced probiotic stability. Among the samples, those containing freeze-dried milk powder (LS) retained the highest viability, with a minimal loss of just 0.03 log cfu/g. In contrast, the vacuum-dried samples containing only zeolite (VZ) experienced the greatest loss in viability, dropping below the minimum required viability threshold for probiotics (10⁶ cfu/g). Interestingly, the combination matrix of milk powder and zeolite (LK) demonstrated a synergistic protective effect, showing only 0.47 log cfu/g loss. This blend not only helped maintain pH stability but also provided resistance to moisture absorption during storage. FE-SEM images supported these findings by confirming the protective impact of the composite matrix on cell integrity and physical structure. Overall, the study demonstrated that the synergistic combination of zeolite's moisture-regulating and pH-buffering properties with milk powder's biochemical protective effects effectively preserved the viability of *B. bifidum*. These findings suggest that integrating mineral-based and protein-sugar-based protectants could be a promising approach for developing stable, commercially viable probiotic powders.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, clinoptilolite, cryoprotectant, freeze-drying, vacuum drying, zeolite.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi, deneyim ve destekleriyle bana yol gösteren, değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Gamze ÜÇÖK'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisi, çalışmamın her aşamasında sabırla rehberlik etmiş ve bilimsel yaklaşımıyla bana ilham kaynağı olmuştur.

Eğitim hayatım boyunca bana değerli katkılar sunan Necmettin Erbakan Üniversitesi'nin tüm akademik ve idari personeline teşekkür ederim.

Bu süreçte manevi desteklerini her zaman hissettiğim sevgili kardeşlerime, sabır ve sevgisiyle yanımda olan kıymetli eşime sonsuz teşekkür ederim.

En derin teşekkürlerimi ise, her daim yanımda olan sevgili anneme ve babama sunuyorum. Annemin sabrı, sevgisi ve duası; babamın ise çocukluğumdan bu yana eğitimime olan inancı ve bitmek bilmeyen desteği, bugünlere gelmemde en büyük güç kaynağım olmuştur. Onlara olan minnettarlığımı kelimelerle ifade etmek mümkün değil.

Son olarak, bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Ruqaia Jamal Abood JARARAH
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. <i>Bifidobacterium bifidum</i>	3
2.1.1. <i>Bifidobacterium bifidum</i> 'un sağlık üzerindeki etkileri	3
2.1.2. <i>Bifidobacterium bifidum</i> 'un korunmasında karşılaşılan zorluklar.....	4
2.2. Probiyotikler İçin Kurutma Teknikleri.....	5
2.3. Zeolit ve Genel Özellikleri.....	7
2.3.1. Türkiye'de zeolit zenginliği	8
2.3.2. Zeolit türleri	8
2.3.3. Klinoptilolit ve özellikleri.....	9
2.3.4. Klinoptilolit uygulamaları.....	11
2.4. Yağsız Süt Tozunun Kriyoprotektan Olarak Kullanımı.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal	14
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. Koruyucu ajanların bazı fiziko-kimyasal özellikleri.....	14
3.2.2. Koruyucu ortamların hazırlanması	16
3.2.3. <i>B. bifidum</i> aktivasyonu ve biyokütlenin toplanması.....	17
3.2.4. Liyofilizasyon işlemi	17
3.2.5. Vakum kurutma işlemi.....	17
3.3. Vakumla ve Dondurularak Kurutulmuş Kültürlerde Yapılan Analizler	18
3.3.1. Canlı hücre sayımı	18
3.3.2. Nem içeriği	20
3.3.3. Su sorpsiyon özelliği.....	20
3.3.4. pH.....	20
3.3.5. Titre edilebilir asitlik (TTA)	20

3.3.6. Toz kültürlerin alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopu (FE-SEM) ile incelenmesi	21
3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	21
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	22
4.1. Koruyucu Materyallerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	24
4.2. Kurutulmuş Kültürlerde Canlı Hücre Sayımı.....	28
4.3. Kurutulmuş Kültürlerin FE-SEM ile Mikromorfolojik Analizi.....	37
4.4. Kurutma Yöntemi ve Taşıyıcıların Nem İçeriği Üzerindeki Etkisi	42
4.5. Kurutulmuş Kültürlerde Su Absorpsiyon Davranışı	44
4.6. Kurutulmuş Kültürlerde pH Değişimi.....	47
4.7. Kurutulmuş Kültürlerde Titre Edilebilir Asitlik (TTA) Değerleri.....	50
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	54
5.1. Sonuçlar.....	54
5.2. Öneriler	57
6. KAYNAKLAR	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
a_w	: Su aktivitesi
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
cm^3	: Santimetreküp
g	: Gram
M	: Molarite
mL	: Mililitre
μm	: Mikrometre

Kısaltmalar

Al	: Alüminyum
AOAC	: Association of Official Analytical Collaboration
BSM	: Bifidus Selective Medium Agar
Ca	: Kalsiyum
CO	: Karbonmonoksit
CO ₂	: Karbondioksit
FDA	: Tarım ve Gıda Örgütü
FE-SEM	: Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IBD	: İnflamatuvar bağırsak hastalıkları
IBS	: İrritabl bağırsak sendromu
IDF	: Uluslararası Sütçülük Federasyonu
ISO	: International Organization for Standardization
K	: Potasyum
kob	: Koloni oluşturan birim
LA	: Laktik asit
LK	: Liyofilize zeolit ve süt kültürü
LS	: Liyofilize süt kültürü
LZ	: Liyofilize zeolit kültürü
MRS	: de Man, Rogosa and Sharpe
N ₂	: Azot
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
NH ₃	: Amonyak
PBS	: Phosphate buffer saline
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SCFA	: Kısa zincirli yağ asitleri
Si	: Silisyum
SiO ₄	: Silikat
SMP	: Yağsız süt tozu
SO ₂	: Kükürt dioksit
TTA	: Toplam Titre edilebilir Asitlik
VK	: Vakumla kurutulmuş zeolit ve süt kültürü

VS : Vakumla kurutulmuş süt kültürü
VZ : Vakumla kurutulmuş zeolit kültürü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Zeolit taşının görünümü	7
Şekil 2.2. Doğal klinoptilolit-zeolitin üç boyutlu kristal yapısı	10
Şekil 3.1. Dilüsyon hazırlama ve ekim işlemleri	19
Şekil 3.2. Anaerobik inkübasyonda kullanılan kap sistemi	19
Şekil 4.1. Farklı koruyucu ajanlar ve kurutma yöntemleriyle elde edilen <i>B. bifidum</i> toz kültürlerine ait görseller	24
Şekil 4.2. Koruyucu ajanlara ait FE-SEM görüntüleri	27
Şekil 4.3. Kurutma işlemi öncesi ve sonrası <i>B. Bifidum</i> 'un canlılık değerleri (\log_{10} kob/g)	30
Şekil 4.4. Farklı taşıyıcılarla kurutulmuş <i>B. bifidum</i> kültürlerinde depolama süresince canlılık değişimi (\log_{10} kob/g)	34
Şekil 4.5. Liyofilize edilen <i>B. bifidum</i> kültürlerinin FE-SEM görüntüleri	39
Şekil 4.6. Vakumla kurutulan <i>B. bifidum</i> kültürlerinin FE-SEM görüntüleri	40
Şekil 4.7. Depolama süresince <i>B. bifidum</i> kültürlerinin nem içeriği değişimleri	43
Şekil 4.8. Depolama süresince <i>B. bifidum</i> kültürlerinin su absorpsiyon değişimleri	47
Şekil 4.9. Depolama boyunca <i>B. bifidum</i> kültürlerinde pH değişimi	49
Şekil 4.10. Depolama boyunca <i>B. bifidum</i> kültürlerinde TTA değişimi	52

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1. Önemli zeolitlerin bazı fiziksel özellikleri	9
Çizelge 3.1. Taşıyıcı kültür ortamlarının hazırlanışı	16
Çizelge 3.2. Örnek kodları ve içerikleri	18
Çizelge 4.1. Hammadde örneklerinin fizikokimyasal özellikleri	24
Çizelge 4.2. Örneklerin parçacık boyut dağılımı	26
Çizelge 4.3. <i>B.bifidum</i> 'un kriyoprotektif ajanlar varlığında dondurarak kurutma işlemi öncesi ve sonrasındaki canlılık oranları	29
Çizelge 4.4. Kurutulmuş <i>B.bifidum</i> kültürlerinin depolama süresince canlılık değişimleri (\log_{10} kob/g)	33
Çizelge 4.5. Kurutulmuş <i>B.bifidum</i> kültürlerine ait nem değerleri (%).....	42
Çizelge 4.6. Kurutulmuş <i>B.bifidum</i> kültürlerine ait su absorpsiyonu değerleri (%).....	45
Çizelge 4.7. Kurutulmuş <i>B.bifidum</i> kültürlerine ait pH değerleri.....	48
Çizelge 4.8. Kurutulmuş <i>B.bifidum</i> kültürlerine ait toplam titre edilebilir asitlik (TTA) değerleri (%)	51

1. GİRİŞ

Son yıllarda probiyotikler, özellikle insan sağlığındaki önemli rolleri nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmektedir. En bilinen probiyotik bakterilerden biri olan *Bifidobacterium bifidum*, gram pozitif ve anaerob bir mikroorganizma olup, bağırsak sağlığı ve genel iyilik hâli üzerinde temel bir rol oynamaktadır (Sibanda vd., 2024). Özellikle bebeklik döneminde insan gastrointestinal sisteminin ilk kolonizatörlerinden biri olarak, laktik ve asetik asit üretimi yoluyla bağırsak dengesini sağlamaya katkıda bulunmaktadır. Söz konusu bu organik asitler, bağırsak pH'ını düşürerek zararlı patojenlerin çoğalmasını engellemektedir (O'Callaghan ve van Sinderen, 2016; Turrone vd., 2008). Ayrıca *B. bifidum*, karmaşık karbonhidratları parçalayarak sindirimi desteklemekte ve B vitaminleri ve folat gibi temel besin maddelerinin emilimini artırmaktadır. Kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar) üretimi sayesinde kolon sağlığını desteklerken, antiinflamatuvar etkiler de göstermektedir (Fukuda vd., 2011; Rivière vd., 2016). Bununla birlikte, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, irritabl bağırsak sendromu (IBS) ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBD) gibi gastrointestinal rahatsızlıkların hafifletilmesive bağırsak-beyin eksenini yoluyla ruh sağlığına katkıda bulunma potansiyeli nedeniyle de kapsamlı şekilde araştırılmıştır (Gavzy vd., 2023; Lim ve Shin, 2020).

B. bifidum, sağlık üzerindeki etkilerinin ötesinde, gıda endüstrisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle süt ve süt dışı ürünlerin fermantasyonunda tercih edilmektedir. Şekerleri laktik aside fermente etme yeteneği, fermente ürünlerin lezzetini, dokusunu ve raf ömrünü artırırken aynı zamanda probiyotik özellikler kazandırmaktadır (He vd., 2023). Ancak, *B. bifidum*'un endüstriyel işlemler ve depolama süresince canlılığını korumak önemli bir teknolojik zorluk olarak değerlendirilmektedir.. Probiyotik kültürlerin raf ömrünü ve stabilitesini artırmak amacıyla dondurarak kurutma (liyofilizasyon) ve vakumla kurutma gibi yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu işlemler, bakteri hücrelerini ısıya, ozmotik değişimlere ve oksidatif strese maruz bırakarak canlılıklarını azaltabilmektedir (Meng vd., 2008; Shokri vd., 2015).

Bu nedenle, kurutma işlemi sırasında meydana gelen zararları azaltmak amacıyla taşıyıcı veya katkı maddesi olarak bilinen koruyucu maddeler sıklıkla eklenmektedir. En yaygın kullanılan taşıyıcılardan biri yağsız süt tozudur. Bu bileşen, bakterileri soğuk ve kuruma kaynaklı stres koşullarına karşı koruyarak, hücrelerin yapısını muhafaza eden nazik bir ortam sağlamaktadır (Santivarangkna vd., 2008). Son yıllarda ise doğal bir zeolit minerali olan klinoptilolit, probiyotiklerin stabilizasyonunda potansiyel bir ajan olarak

dikkat çekmektedir. Benzersiz kristal yapısı ve yüksek adsorpsiyon kapasitesi sayesinde klinoptilolit, probiyotikleri oksidatif ve termal strese karşı koruyan stabil bir mikroçevre oluşturma potansiyeline sahiptir. Mikrobiyal stabilizasyonun yanı sıra, klinoptilolit, enzimlerin korunması, tarım, gıda muhafazası ve çevresel uygulamalar gibi çeşitli alanlarda da kullanılmaktadır. Nem dengesini düzenleme, toksinleri nötralize etme ve biyolojik ya da kimyasal sistemlerin ömrünü uzatma yeteneği, onu birçok sektörde çok yönlü bir malzeme hâline getirmiştir (Eroglu, 2014; Mastinu vd., 2019).

Bu çalışma, klinoptilolit içeren ortamlarda farklı kurutma yöntemlerine tabi tutulan *B. bifidum* kültürlerinin canlılık ve stabilite özelliklerini incelemeyi amaçlamaktadır. Yağsız süt tozu, klinoptilolit veya her ikisini içeren örneklerin mikrobiyal canlılık düzeyleri ve fizikokimyasal özellikleri analiz edilerek, probiyotiklerin korunmasına yönelik yeni yaklaşımların anlaşılması hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium bifidum, *Bifidobacterium* cinsi içerisinde en çok araştırılan ve en faydalı olarak kabul edilen bakteri türlerinden biridir. *Bifidobacterium* cinsi ilk kez 1899 yılında Fransız pediatrist Henri Tissier tarafından anne sütüyle beslenen bebeklerin dışkılarından izole edilerek tanımlanmıştır. Tissier, bu organizmanın sağlıklı bebeklerde yaygın olduğunu gözlemlemiş ve ishalin önlenmesinde faydalı bir rol oynayabileceğini öne sürmüştür. Başlangıçta *B. bifidum* ve benzeri türler "*Lactobacillus bifidus*" olarak adlandırılmış, ancak daha sonra farklı bir cins olarak sınıflandırılmıştır (Lee ve O'Sullivan, 2010). 1924 yılında Danimarkalı mikrobiyolog Orla-Jensen, laktik asit bakterileri için bir sınıflandırma sistemi önermiş ve *Bifidobacteria*'yı ayrı bir grup olarak tanımlamıştır (Mattarelli ve Biavati, 2018).

B. bifidum, gram-pozitif, anaerob, hareketsiz ve mikroskop altında hafif kıvrımlı ya da dallanmış çomak şeklinde gözlemlenen, "Y" harfine benzeyen bir bakteridir. Zorunlu anaerob bir mikroorganizma olup yalnızca oksijensiz ortamlarda büyüebilmektedir. Optimal büyüme sıcaklığı 37 °C olup, bu da insan bağırsak sıcaklığıyla uyumludur (Chen vd., 2021). Spor oluşturmaması nedeniyle çevresel streslere karşı dirençsiz olsa da metabolik aktiviteleri, bağırsak mikrosistemine son derece iyi uyum sağlamaktadır. İnsanlar ve diğer memelilerin gastrointestinal sisteminde doğal olarak bulunmaktadır. Özellikle anne sütüyle beslenen bebeklerin bağırsaklarında bol miktarda bulunan *B. bifidum*, bağırsak sağlığının korunmasında ve çeşitli sağlık yararlarıyla ilişkili olarak önemli bir rol oynamaktadır (Stuivenberg vd., 2022).

2.1.1. *Bifidobacterium bifidum*'un sağlık üzerindeki etkileri

B. bifidum, özellikle sindirim sağlığı, bağışıklık sistemi fonksiyonları ve patojen inhibisyonu yoluyla genel sağlık üzerinde çok sayıda olumlu etki sunmaktadır. Bu bakteri, bağırsak duvar bütünlüğünü destekleyerek ve mukus üretimini teşvik ederek bağırsak sağlığının korunmasında önemli rol oynamaktadır. Kompleks karbonhidratları fermente etme yeteneği sayesinde mikrobiyota dengesini korumakta, bu özellik probiyotik aktivitesinin temelini oluşturmaktadır (Bocchio vd., 2024; Latif vd., 2023).

Bifidobacterium cinsine özgü olan "bifid shunt" adlı metabolik yolak aracılığıyla bu bakteri, karbonhidratları kısa zincirli yağ asitlerine (SCFA) dönüştürerek asetik asit ve laktik asit üretmektedir. Bu asitler, bağırsak pH'ını düşürerek *Escherichia coli* ve *Clostridium difficile* gibi zararlı patojenlerin çoğalmasını engellemektedir (Lim ve Shin, 2020). Ayrıca, *B. bifidum* fermantasyon sırasında hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal bileşikler de sentezlemektedir (Mahdi vd., 2018). Bu fermantasyon ürünleri kolon hücreleri için enerji kaynağı işlevi görürken bağışıklık sistemini de modüle eder ve insan konakçıyla simbiyotik bir ilişki kurmaktadır.

Sindirim sistemine olan katkılarının yanı sıra *B. bifidum*, bağışıklık sisteminin düzenlenmesine de önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimini artırırken pro-inflamatuvar yanıtları baskılamakta ve bu yolla inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBD) ve otoimmün bozuklukların yönetiminde fayda sağlamaktadır (Raskov vd., 2016). Düzenleyici T hücrelerini aktive ederek otoimmün tepkileri engellemekte ve alerjik durumların şiddetini azaltabilmektedir (Gavzy vd., 2023).

Özellikle anne sütüyle beslenen bebeklerde, gastrointestinal enfeksiyonların ve alerjilerin önlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Cukrowska vd., 2020). Ayrıca, laktoz intoleransı olan bireylerde laktozun sindirimine yardımcı olan laktaz benzeri enzimler üretmekte; böylece şişkinlik ve ishal gibi belirtilerin azaltılmasını sağlamaktadır (Mysore Saiprasad vd., 2023). Bağırsak-beyin eksenini üzerine yapılan güncel araştırmalar, *B. bifidum*'un mikrobiyota ve nöroaktif bileşik üretimi yoluyla ruh sağlığı üzerinde de olumlu etkiler oluşturabileceğini, anksiyete ve depresyon semptomlarını azaltabileceğini göstermektedir (Rajanala vd., 2021).

2.1.2. *Bifidobacterium bifidum*'un korunmasında karşılaşılan zorluklar

Kritik bir probiyotik suş olan *B. bifidum*'un korunması, çevresel faktörlere karşı yüksek duyarlılığı ve canlılığını sürdürme gereksinimi nedeniyle çeşitli zorluklar barındırmaktadır. Bu zorluklar, bakterinin terapötik ve endüstriyel uygulamalardaki etkinliğini doğrudan etkilemektedir. *B. bifidum* zorunlu anaerop bir bakteri olduğundan oksijenle temas, hücre zarının bütünlüğünü bozarak canlılık oranını azaltabilmektedir. Bu nedenle üretimden depolamaya kadar tamamen anaerop koşulların sağlanması gerekmektedir ki bu da özel ekipman ve ambalajlama sistemlerini zorunlu kılmaktadır (Ruiz vd., 2011).

Depolama ve taşıma sırasında meydana gelen sıcaklık dalgalanmaları, bakterinin canlılığı üzerinde olumsuz etkiler yaratabilmektedir. Soğuk zincir tavsiye edilse de, taşımadaki ani sıcaklık artışları ya da yanlış depolama koşulları kültürün canlılığını azaltabilmektedir. Optimal soğuk depolamada dahi uzun süreli maruziyet, hücresel canlılığın zamanla azalmasına yol açabilmektedir (Sibanda vd., 2024). Depolama ortamındaki yüksek nem, metabolik aktiviteyi tetikleyebilmekte veya mikrobiyal kontaminasyona zemin hazırlayabilmektedir. Düşük su aktivitesinin sağlanması bu açıdan kritiktir, ancak bu işlemin hücre bütünlüğünü bozmadan gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Shokri vd., 2015; Sibanda vd., 2024).

B. bifidum, büyüme ve hayatta kalma süreçleri için oligosakkaritler gibi prebiyotiklere ihtiyaç duymaktadır. Bu besin öğelerinin, koruma matrisine dahil edilmesi gerekir, ancak bu durum, stabiliteyi olumsuz etkileyebilecek kimyasal etkileşimlere neden olabilmektedir (Schlienger de Alba ve Espinosa Andrews, 2024). Ayrıca, asidik koşullara yüksek hassasiyet gösterdiğinden, hücre içi pH dengesinin korunması büyük önem taşımaktadır (Sibanda vd., 2024).

Bakteri kültürlerinin saflığının korunması, özellikle üretim, işleme ve depolama sırasında kontaminasyonun önlenmesi açısından hayati öneme sahiptir (U.S. Food and Drug Administration, 2021). Koruma süreci boyunca reaktif oksijen türleri (ROS) birikerek DNA, protein ve lipitlere zarar verebilmektedir. Oksidatif strese karşı koruma sağlamak amacıyla antioksidanların veya koruyucu ajanların formülasyona dahil edilmesi gerekmektedir (Ruiz vd., 2011). Uzun raf ömrü boyunca yüksek canlılık oranlarının korunması zordur; çünkü metabolik aktiviteler enerji rezervlerinin tükenmesine yol açabilmektedir. Bu nedenle stabilizatörler ve yenilikçi koruma teknolojileri büyük önem taşımaktadır (Sibanda vd., 2024).

2.2. Probiyotikler İçin Kurutma Teknikleri

Kurutma yöntemi seçimi, *B. Bifidum*'un hayatta kalma oranını önemli ölçüde etkilemektedir. Düşük sıcaklıklarda nemin uzaklaştırılmasıyla uzun süreli koruma sağlayan dondurarak kurutma (liyofilizasyon), yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Carvalho vd., 2004; Meng vd., 2008). Ancak, bu yöntem yüksek maliyetli ve enerji açısından yoğun bir süreç olup, bu durum büyük ölçekli üretim için uygulanabilirliğini kısıtlayabilmektedir (Meng vd., 2008; Santivarangkna vd., 2007a). Vakumla kurutma ise daha nazik bir alternatif sunmakta, ancak dondurarak kurutma ile aynı düzeyde stabilite

sağlamayabilmektedir (Santivarangkna vd., 2007a). Her yöntemin kendine özgü sınırlılıkları bulunmakta olup, etkinlik, maliyet ve ölçeklenebilirlik arasında denge sağlamak için optimizasyon stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Hazırlık ve koruma süreçlerindeki stres faktörleri, *B. bifidum*'un etkin bir şekilde depolanmasını daha da zorlaştırmaktadır. Formülasyondaki çözünmüş maddelerin konsantrasyonlarındaki değişimlerden kaynaklanan ozmotik stres, hücresel homeostazı bozabilmekte; karıştırma veya ekstrüzyon sırasında oluşan mekanik kesme stresi ise hücre zarlarına zarar vererek hayatta kalma oranlarını azaltabilmektedir (Champagne vd., 2011). Yağsız süt tozu, gliserol veya trehaloz gibi kriyo-koruyucuların kullanımı, bu stresleri hafifletmede kritik öneme sahiptir (Meng vd., 2008). Ancak, koruyucu ajanların formülasyonu her bir suşun özelliklerine göre özel olarak uyarlanmalıdır; zira yanlış kombinasyonlar yetersiz koruma sağlayabileceği gibi, bakterilerin probiyotik özelliklerini değiştirebilmektedir (Champagne vd., 2011).

Uzun vadeli stabilitenin korunması bir diğer kritik zorluk olarak öne çıkmaktadır. *B. bifidum* zamanla, özellikle ışık, oksijen ve değişken sıcaklık ya da nem gibi olumsuz depolama koşulları altında canlılığını kaybetmektedir (Saarela vd., 2006; Tripathi ve Giri, 2014). Polisakkaritler veya proteinler kullanılarak gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon gibi teknolojiler, bu tür çevresel stres faktörlerine karşı ek bir bariyer sağlayarak raf ömrünü uzatabilmektedir (Anal ve Singh, 2007). Ancak, bu teknikler üretim maliyetlerini artırmakta ve özel ekipman gerektirmektedir; bu durum da yaygın kullanım açısından erişilebilirliği sınırlayabilmektedir (Anal ve Singh, 2007).

Asit ve safra toleransı, *B. bifidum* gibi probiyotikler için temel bir özellik olarak öne çıkmaktadır; zira bu mikroorganizmaların sağlık yararları sağlayabilmeleri için gastrointestinal sistemden geçerken hayatta kalmaları gerekmektedir (Tripathi ve Giri, 2014). Koruma sürecinde maruz kalınan çeşitli stres faktörleri, bu toleransı zayıflatabilmekte ve probiyotiklerin etkinliğini azaltabilmektedir. Bu nedenle, koruma yöntemlerinin söz konusu bu özellikleri koruyacak veya iyileştirecek şekilde tasarlanması, suş seçimi ve optimizasyonunun karmaşık ancak zorunlu bir yönünü oluşturmaktadır (Champagne vd., 2011).

Son olarak, suşlar arasındaki farklılıklar koruma çalışmalarını daha da karmaşık hale getirmektedir. Farklı *B. bifidum* suşları, çevresel ve işleme bağlı stres faktörlerine karşı değişen direnç seviyeleri sergilemektedir; dolayısıyla bir suş için etkili olan koruma yöntemi, başka bir suş için yeterli olmayabilmektedir (Meng vd., 2008; Saarela vd.,

2006). Bu nedenle de, spesifik suşlara yönelik koruma tekniklerinin özelleştirilmesi, sürece ek bir karmaşıklık katmaktadır.

2.3. Zeolit ve Genel Özellikleri

Zeolitler, volkanik kayaların, kül tabakalarının ve alkali bir yeraltı suyunun reaksiyonuyla elde edilen mikroporöz (mikro gözenekli) kristal alüminosilikatlardır (Şekil 2.1). Yaklaşık 218 farklı zeolit yapısı tanınmaktadır (Eroglu vd., 2017).



Şekil 2.1. Zeolit taşının görünümü

Farklı araştırma grupları tarafından kırktan fazla zeolit türü rapor edilmiştir. Bunlar arasında analsim (ya da analsit), klinoptilolit, erionit, şabazit, mordenit ve filipsit daha çok bilinmektedir. Ayrıca 150'den fazla zeolit sentezlenmiştir. Yaygın bazı sentetik zeolitler A, X, Y ve ZMS5'tir (Tzia ve Zorpas, 2012). Zeolitler, kristalin yapıları ve iyonları emebilme, adsorbe edebilme ve değiştirebilme yetenekleriyle bilinen gözenekli bir mineral kompleksidir (Mastinu vd., 2019). 'Sihirli kaya' olarak da bilinen zeolitler, tarım bilimi, hayvan beslenmesi, bitki koruma ve uzay görevleri dâhil olmak üzere çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Eroglu vd., 2017). Gözenekli, kristal yapıda, birbirine bağlı kanallardan ve homojen boyutlardaki boşluklardan oluşan bir ağa sahiptirler. Bu yapıları zeolitlere, muamele edildikleri diğer molekülleri boyutlarına ve şekillerine göre seçici olarak yakalama ve serbest bırakma özelliği kazandırmaktadır. Bu yetenekleri ile zeolitler, birçok endüstri ve teknoloji alanında geniş bir kullanıma sahip olmakta ve bu alanlarda önemli bir pozisyona taşınmaktadır (Jarosz vd., 2022; Tzia ve Zorpas, 2012).

Doğal zeolitler, FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından insan tüketimi için uygun bulunmuştur ve Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından toksik olmadığı kabul edilmektedir. Ayrıca, Codex Alimentarius Komisyonu,

gıda ürünlerinde zeolit kullanımı ile haşere kontrolünü desteklemekte ve OrganikGıda Üretimi ve Bitki Koruma alanında onaylanmış bir madde olarak listelemektedir (Eroglu, 2014).

2.3.1. Türkiye’de zeolit zenginliği

Türkiye, zeolit rezervleri bakımından dünya genelinde önemli bir konuma sahiptir. Özellikle klinoptilolit, şabazit, mordenit, erionit ve analsim gibi mineraller ülkemizde yaygın olarak bulunan zeolit türlerindedir. Türkiye’deki en büyük zeolit yatakları klinoptilolit içerikli olup, bu rezervlerin yaklaşık 50 milyar ton civarında olduğu tahmin edilmektedir (İnan ve Hiçsönmez, 2022; Oyku, 2017). Ege Bölgesi, dünya çapında en büyük beş zeolit üreticisinden biri olarak öne çıkmakta, yüksek saflıktaki klinoptilolit yataklarına sahip olmasıyla bilinir (Eroglu, 2014). Balıkesir Bigadiç ve Manisa-Gördes'te bulunan rezervler, Türkiye’nin zeolit zenginliğini destekleyen başlıca bölgeler arasında yer almakta olup, Bigadiç'teki klinoptilolit rezervinin yaklaşık 500 milyon ton olduğu tahmin edilmektedir (İnan ve Hiçsönmez, 2022). Bu zenginlik, Türkiye’yi zeolit araştırmalarında merkezi bir rol oynamaya iterken, zeolitlerin enerji, çevre, inşaat, deterjan, kimya, ilaç, madencilik, tarım ve hayvancılık gibi birçok sektörde yaygın kullanımına olanak sağlamıştır (Oyku, 2017).

2.3.2. Zeolit türleri

Doğal zeolitler, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından insan tüketimi için uygun kabul edilmiş ve Dünya Sağlık Örgütü’ne bağlı Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC) tarafından “toksik olmayan” olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca Codex Alimentarius Komisyonu, gıda ürünlerindeki zararlı böceklerin kontrolünde zeolitlerin kullanımını desteklemekte ve onları Organik Gıda Üretimi ve Bitki Koruma kapsamında onaylanmış bir madde olarak listelemektedir (Eroglu vd., 2017). Farklı zeolit türleri arasında yapı, bileşim ve kullanım açısından önemli farklar bulunmakta olup, bazı türler yaygın olarak kullanılmaktadır (Mastinu vd., 2019). Aşağıdaki iki çizelge, zeolit türleri arasındaki fiziksel ve biyolojik farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 2.1. Önemli zeolitlerin bazı fiziksel özellikleri (Cataldo vd., 2021)

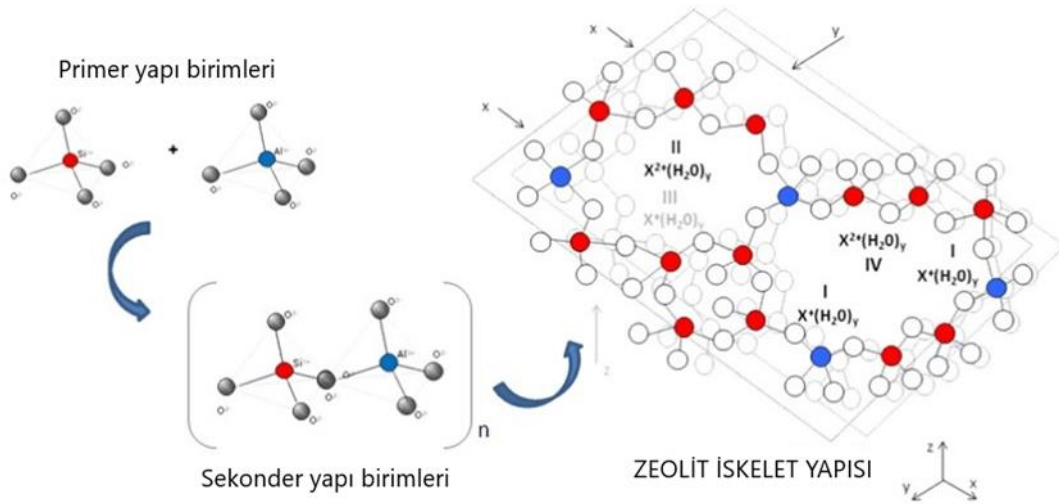
Zeolite	Gözeneklilik [%]	Isı Dayanımı	İyon Değişim Kapasitesi [meq/g]	Özgül Ağırlık [g/cm ³]	Yığın Yoğunluğu [g/cm ³]
Analcim (Analcime)	18	Yüksek	4,54	2,24–2,29	1,85
Çabazit (Chabazite)	47	Yüksek	3,84	2,05–2,10	1,45
Klinoptilolit (Clinoptilolite)	34	Yüksek	2,16	2,15–2,25	1,15
Erionit (Erionite)	35	Yüksek	3,12	2,02–2,08	1,51
Heulandit (Heulandite)	39	Düşük	2,91	2,18–2,20	1,69
Mordenit (Mordenite)	28	Yüksek	4,29	2,12–2,15	1,70
Filipsit (Phillipsite)	31	Orta	3,31	2,15–2,20	1,58

Çizelge 2.2. Bazı zeolit türlerinin kimyasal formülleri ve biyolojik etkileri (Mastinu vd., 2019)

Zeolit	Formül	Etkileri
Analcim	$\text{NaAlSi}_2\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Antioksidan
Filipsit	$(\text{Ca}, \text{Na}_2, \text{K}_2)_3\text{Al}_6\text{Si}_{10}\text{O}_{32} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Antioksidan ve bağırsak mikrobiyotası üzerine etkili
Faujasit (<i>Faujasite</i>)	$(\text{Na}_2, \text{Ca}, \text{Mg})_5 \cdot 5[\text{Al}_2\text{Si}_{17}\text{O}_{48}] \cdot 32(\text{H}_2\text{O})$	Antimikrobiyal
Erionit	$(\text{Na}_2, \text{K}_2, \text{Ca})_2[\text{Al}_4\text{Si}_{14}\text{O}_{36}] \cdot 15\text{H}_2\text{O}$	Kanserojen
Klinoptilolit	$(\text{Na}, \text{K}, \text{Ca})_2 \cdot 3\text{Al}_3(\text{Al}, \text{Si})_2\text{Si}_{13}\text{O}_{36} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Çevresel arıtım, bağırsak detoksifiye edici, antioksidan, antiinflamatuvar, antitümör

2.3.3. Klinoptilolit ve özellikleri

Klinoptilolit, heulandit grubuna ait bir tortul zeolit türüdür ve doğada bol miktarda bulunmaktadır. Si/Al oranı ≥ 4 'tür. "Klinoptilolit" ismi, Yunanca "klino" (eğik), "ptilon" (tüy) ve "lithos" (taş) kelimelerinden türetilmiştir (Jarosz vd., 2022; Polat vd., 2004). AlO_4 ve SiO_4 tetrahedra yapılarının ortak bir oksijen atomu ile bağlanmasıyla oluşan üç boyutlu bir yapıya sahiptir (Şekil 2.2) (Pabiš Mazgaj vd., 2021).



Şekil 2.2. Doğal klinoptilolit-zeolitin üç boyutlu kristal yapısı (Margeta vd., 2013)

Bu yapısal düzen, klinoptilolite, iyonları ve molekülleri seçici olarak adsorplama özelliği kazandırmaktadır. Bu özelliği sayesinde, su arıtımı, hava filtrasyonu ve kimyasal işlemlerde katalizör olarak birçok alanda etkin biçimde değerlendirilmektedir (Margeta vd., 2013).

Klinoptilolit genellikle ince taneli veya iri taneli kristaller ya da agregalar halinde görülmektedir. İçerdiği safsızlıklar ve mineral bileşimine bağlı olarak rengi değişiklik gösterir; beyaz, gri, yeşil, sarı veya pembe tonlarında olabilir (Martínez-Franco vd., 2013). Kristaller genellikle camsı veya sedefimsi parlaklığa sahiptir ve masif ya da lifli formda bulunabilmektedir. Kırıldığında prizmatik ya da kare şekilli kristal yapılar gösterebilir. Genel görünümü, oluştuğu jeolojik yapıya ve özgül özelliklerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Grzeszczak, vd., 2023).

Zeolitler, gaz emilimi konusunda oldukça etkilidir. Doğal zeolitler; CO, CO₂, SO₂, H₂S, NH₃, N₂ gibi çeşitli gazları emebilir ve bu nedenle gaz giderimi veya koku kontrolü amacıyla kullanılmaktadır. Özellikle amonyak ve H₂S gibi kötü kokulu gazların yoğun olduğu hayvancılık tesislerinde, bu gazların seviyelerini düşürmede önemli rol oynamaktadırlar. Yüksek amonyak tutma kapasitesi sayesinde, balık çiftliklerinde de amonyak seviyelerinin doğal yollarla kontrolü amacıyla kullanılabilirler. Filtrasyon sistemlerine entegre edilerek ya da doğrudan su yüzeyine serpilerek uygulanabilmekte ve sucul canlılar üzerinde olumsuz bir etkisi bulunmamaktadır (Cataldo vd., 2021).

Kristal yapılarındaki yüksek gözeneklilik sayesinde, zeolitler kendi ağırlıklarının %60'ına kadar su emme kapasitesine sahiptir. Gözeneklerde tutulan su, yapısal bir

değişiklik olmadan buharlaştırılabilir veya tekrar emme yoluyla geri kazanılabilmektedir (Takil ve Kayan, 2025). Bu özellikleriyle, kurak dönemlerde su sağlayarak veya sulama sırasında suyun doğrudan kök bölgesine ulaşmasını kolaylaştırarak su verimliliğini artırmaktadırlar. Ayrıca tarımsal ilaçların taşınmasında yüksek emme kapasiteleri sayesinde etkili taşıyıcı maddeler olarak kullanılmaktadırlar (Eroglu vd., 2017).

Zeolitlerin negatif yüklü iskelet yapıları, onları pozitif yüklü katyonlar için ideal iyon değiştiriciler hâline getirmektedir. Sodyum, potasyum, baryum ve kalsiyum gibi iyonlar başta olmak üzere, amonyak ve su gibi pozitif yüklü gruplarla da etkileşime girebilmektedirler. Karbonat ve nitrat iyonları da negatif yüke sahip zeolit yapılarına çekilebilmektedir. Emilmiş katyonlar zayıf çekim kuvvetleriyle bağlı olduklarından, standart iyon değişim teknikleriyle kolayca yer değiştirebilmektedirler. Bu yönüyle zeolitler, son derece etkili iyon değiştiriciler olarak öne çıkmaktadır (Michalev vd., 2016).

2.3.4. Klinoptilolit uygulamaları

Klinoptilolit, birçok sektörde geniş uygulama alanına sahiptir. Gıda endüstrisinde; bozunma gazlarını adsorplama, nem kontrolü ve antimikrobiyal ajan salınımı yoluyla korumayı artırmakta, ambalaj performansını geliştirmekte ve raf ömrünü uzatmaktadır (Jarosz vd., 2022; Tzia ve Zorpas, 2012). Atık su arıtımında da etkilidir ve ağır metalleri %90'a kadar verimlilikle uzaklaştırabilmektedir; mikrobiyal immobilizasyonu destekleyerek çevresel ve biyoteknolojik uygulamalarda da kullanılmaktadır (Ersoy vd., 2002; Oyku, 2017). Yüksek su adsorpsiyon kapasitesi, gıda kurutma verimliliğini artırmakta ve tohumların saklanmasıyla fayda sağlamaktadır (Eroglu vd., 2017).

Tarımda, klinoptilolit gübre verimliliğini artırarak ürün verimini yükseltmekte ve çevresel etkileri azaltmaktadır (Jarosz vd., 2022). Toprak yapısını geliştirerek havalanmayı ve nem tutmayı iyileştirmekte, tuzluluk ve ağır metal biyoyararlılığını azaltarak toprak düzenleyici olarak da kullanılmaktadır (Tzia ve Zorpas, 2012). Ayrıca, hayvan yemi katkı maddesi olarak, büyümeyi desteklemekte, yem dönüşüm oranını iyileştirmekte ve mikotoksin etkilerini azaltmaktadır (Cataldo vd., 2021).

Farmakolojik uygulamalarda, amonyağı uzaklaştırarak detoksifikasyon sürecini desteklemekte ve irritabl bağırsak sendromu (IBS) ile kolorektal kanser gibi durumlara fayda sağlamaktadır (Kraljević Pavelić vd., 2018). Aynı zamanda güvenli bir antiasit ajan olarak görev yapmakta ve kontrollü ilaç salımına imkân tanıyarak tedavi etkinliğini artırmaktadır. Örneğin doksorubicin yüklü kompozitler aracılığıyla akciğer kanseri

tedavisinde kullanılmaktadır (Iane vd., 2023). Bununla birlikte, antimikrobiyal özellikleri (özellikle gümüş veya bakır ile iyon değişimi yapıldığında) enfeksiyon tedavisi ve yara iyileşmesi gibi alanlarda da kullanım potansiyeli taşımaktadır (Hubner vd., 2020).

2.4. Yağsız Süt Tozunun Kriyoprotektan Olarak Kullanımı

Kriyoprezervasyon, *B. bifidum* da dahil olmak üzere probiyotik kültürlerin canlılığını uzun süreli korumak amacıyla yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Ancak, dondurma ve dondurarak kurutma işlemleri sırasında buz kristallerinin oluşumu, ozmotik stres ve oksidatif hasar gibi etkenler, bakteriyel hücrelere önemli zararlar verebilmektedir. Bu olumsuz etkileri azaltmak amacıyla, kriyoprotektan ajanlar, hücresel bütünlüğü ve canlılığı korumada önemli rol oynamaktadır. Çeşitli kriyoprotektanlar arasında öne çıkan yağsız süt tozu (SMP), *B. bifidum*'un dondurma ve liyofilizasyon işlemleri sırasında korunmasında etkili ve ekonomik bir seçenek olarak öne çıkmaktadır (Tanimomo vd., 2016).

Yağsız süt tozu, protein stabilizasyonu, ozmoproteksiyon, tamponlama ve besin desteği gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla koruyucu etki göstermektedir. SMP içeriğindeki kazein ve peynir altı suyu proteinleri, bakteriyel hücrelerin etrafında koruyucu bir matris oluşturarak buz kristallerinin ve ozmotik şokun olumsuz etkilerini azaltmaktadır. Ayrıca SMP'de bulunan laktoz, ozmoprotektan olarak işlev görerek hücre zarının dehidrasyonunu önler ve zar bütünlüğünü korur (Santivarangkna vd., 2007a). SMP, pH stabilitesinin korunmasına yardımcı olarak bakteriyel canlılığın düşmesini engellerken, aynı zamanda besin kaynağı görevi görerek dondurma veya kurutma sonrası hücrelerin rejenerasyonunu desteklemektedir (Carvalho vd., 2004).

Yapılan birçok çalışma, SMP'nin kriyoprotektan formülasyonlarına dahil edilmesinin *B. bifidum* kültürlerinin hayatta kalma oranlarını önemli ölçüde artırdığını ortaya koymaktadır. SMP'nin koruyucu etkinliği; kullanılan konsantrasyona, kurutma yöntemine ve bakteri suşuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Genellikle %5 ile %15 arasındaki SMP konsantrasyonları, optimum koruma sağlamaktadır (Morgan vd., 2006). Karşılaştırmalı çalışmalar, SMP'nin gliserol ve trehaloz gibi sentetik kriyoprotektanlarla eşdeğer hatta daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymuştur (Storey vd., 1998). SMP'nin sukroz veya maltodekstrin gibi diğer koruyucularla birlikte kullanılması ise ilave ozmotik koruma sağlamakta ve oksidatif stresi önleyerek bakteriyel canlılığın daha da artmasına katkı sağlamaktadır (Fu ve Chen, 2011).

Yağsız süt tozunun kriyoprotektan olarak kullanılması, probiyotik ürünlerin üretiminde önemli avantajlar sunmaktadır. SMP, yoğurt, fermente süt ürünleri ve gıda takviyeleri gibi ürünlerde kullanılacak probiyotik kültürlerin dondurarak kurutulmasında süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. SMP'nin maliyet açısından avantajlı oluğu, kolay temin edilebilirliği ve süt bazlı probiyotik formülasyonlarla doğal uyumluluğu, onu sentetik alternatiflere kıyasla tercih edilen bir seçenek haline getirmektedir (Zayed ve Roos, 2004).

Sonuç olarak, yağsız süt tozu, *B. bifidum*'un dondurma ve dondurarak kurutma iğlemleri sırasında canlılık oranlarını artıran etkili ve doğal bir kriyoprotektandır. Uygun maliyeti ve süt ürünleriyle olan yüksek uyumluluğu sayesinde, hem arağtırma hem de endüstriyel uygulamalarda probiyotiklerin korunmasında ideal bir tercih olarak öne çıkmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, probiyotik mikroorganizma olarak *B. bifidum* kullanılmıştır. Bakteri, rutin olarak -80 °C'de saklanan Necmettin Erbakan Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Bakteriyel kültürasyonun başlangıç aktivasyon aşamasında BSM (Bifidus Selective Medium), depolama dönemi boyunca L-sistein (0,5 g/L; Sigma-Aldrich, Almanya) takviyeli MRS (de Man, Rogosa ve Sharpe) agar kullanılmış ve fungal kontaminasyonu engellemek amacıyla sikloheksimid (50 µg/L; Sigma-Aldrich, Almanya) ilave edilmiştir.

Ayrıca, bakteriyel hücrelerin kültürasyondan sonra yıkanmasında PBS (phosphate-buffered saline) ve canlılık analizinde seyreltmeler için steril fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl; FTS) kullanılmıştır.

Koruyucu ajan olarak ise Enka Süt A.Ş.'den temin edilen yağsız süt tozu ve Aromel Kimya Medikal A.Ş. (Konya) tarafından sağlanan klinoptilolit tozu kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Koruyucu ajanların bazı fiziko-kimyasal özellikleri

Temin edilen klinoptilolit zeolit ve yağsız süt tozunun bazı karakteristik özelliklerini saptamak ve son ürünlerdeki etkisini yorumlayabilmek için; nem miktarı, su sorpsiyon yeteneği, pH, toplam titre edilebilir asitlik (TTA), partikül boyutu ve morfolojik özelliği (FE-SEM analizi ile) belirlenmiştir.

3.2.1.1. Nem miktarı

Yağsız süt tozunun nem içeriği, 102 °C'de sabit ağırlığa ulaşmaya kadar etüvde kurutma yöntemi ile belirlenmiştir (IDF, 2004). Klinoptilolit'in nem içeriği ise AOAC (2005) yöntemine göre 135 °C'de 2 saat boyunca kurutularak gravimetrik olarak tayin edilmiştir.

3.2.1.2. Su sorpsiyon yeteneği

Yağsız süt tozu ve klinoptilolit tozu örneklere (yaklaşık 1 g), NaCl doymuş çözeltisi ile birlikte hava geçirmez bir desikatöre yerleştirilmiş ve 25 °C'de 7 gün süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda numuneler tartılmış ve adsorbe edilen nem miktarı, 100 g kuru madde başına gram (g/100 g) cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.1.3. pH lm

Hammaddelerin pH değerinin belirlenmesi amacıyla 2 g numune tartılmış, 20 mL saf su ile yeniden hidratize edilerek iyice karıştırılmıştır. Ardından, öncesinde kalibre edilen pH metre ile çözelti pH'ları llerek kaydedilmiştir.

3.2.1.4. Toplam titreedilebilir asitlik (TTA)

Asitlik tayini için 2 g numune 20 mL saf su ile seyreltikten sonra birkaç damla fenolftalein indikatörü eklenmiştir. rnek, 0,1 N sodyum hidroksit (NaOH) zeltisi ile kalıcı pembe renk oluşana dek titre edilmiştir (yaklaşık pH 8,2). Harcanan NaOH hacmi kaydedilmiş ve titrasyon asitliği aşağıdaki formül ile laktik asit cinsinden hesaplanmıştır:

$$TTA(\%) = \frac{V \times N \times \text{laktik asit eşdeğer ağırlığ}}{m} \times 100 \quad (3.1)$$

Burada;

TA (%): Titrasyon asitliği yüzdesi

V: Kullanılan sodyum hidroksit (NaOH) hacmi (mL)

N: Sodyum hidroksit (NaOH) normalitesi (N)

Laktik asit eşdeğer ağırlığı (g/mol): 90,08

m: Kurutulmuş kültürün kütlesi (g)

olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.5. Partikül boyut dağılımı analizi

Klinoptilolit ve süt tozu örneklerinin ortalama parçacık boyutu dağılımı, laser difraksiyon yöntemiyle çalışan Cilas 1190 (Anton Paar, Les Ulis, Fransa) partikül boyutu ölçüm cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, kuru formdaki numunelerde gerçekleştirilmiştir. Zeolitin kırılma indisi 1,47–1,50 aralığında, yağsız süt tozunun kırılma indisi ise 1,34 olarak alınmıştır.

3.2.1.6. FE-SEM analizi

Mikroyapı incelemeleri, ZEISS Gemini FE-SEM 500 (Almanya) alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (Field Emission Scanning Electron Microscope - FE-SEM) ile yapılmıştır. Toz halindeki parçacıklar, çift taraflı yapışkan bantla FE-SEM numune tablasına monte edilmiş, ardından altın ile kaplanarak çeşitli büyütme oranlarında incelenmiştir.

3.2.2. Koruyucu ortamların hazırlanması

Daha önce kuru maddesi belirlenen klinoptilolit ve süt tozu kullanılarak oluşturulan tüm kültür ortamları %20 kuru madde içeriğine sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Kontrol numunesi olması amacıyla yağsız süt kullanılmıştır. Ayrıca hem sütün hem de klinoptilolit sinerjistik veya antagonistik etkisini ortaya çıkarabilmek için %10 klinoptilolit + %10 yağsız süt tozu içeren bir örnek daha hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm kültür ortamları (Çizelge 3.1) otoklavda 90 °C’de 10 dakika tutulmak suretiyle ısı işlem uygulanmıştır. Her grup için iki numune hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Taşıyıcı kültür ortamlarının hazırlanışı

Örnek Adı	Klinoptilolit (%)	Yağsız Süt Tozu (%)	Toplam Kuru Madde (%)	Açıklama
Kontrol	0	20	20	Sadece yağsız süt tozu içeren kontrol örneği
Klinoptilolit Kültürü	20	0	20	Sadece klinoptilolit içeren örnek
Karışım Kültürü	10	10	20	Klinoptilolit ve yağsız süt tozunun karışımı

3.2.3. *B. bifidum* aktivasyonu ve biyokütlenin toplanması

100 µL dondurulmuş *B. bifidum* kültürü, 10 mL BSM sıvı besiyerine eklenerek statik şartlar altında 18 saat süreyle 37 °C'de inkübe edilmiştir. Aktifleştirilen kültürler daha sonra 500 mL BSM sıvı besiyerine alt kültürlenerek, 18 saat boyunca aynı koşullar altında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, 4 °C'de 15 dakika süreyle 3000 g'de santrifüjlenen kültürlerin süpernatant kısmı atılmıştır ve arta kalan hücreler PBS (phosphate buffer saline) ile üç kez yıkanmıştır. Elde edilen *B. bifidum* biyokütlesinin ağırlığı belirlendikten sonra, doğrudan steril koruyucu medyumların içerisine eklenmiştir ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca düşük hızda karıştırılarak kültür ortamları hazırlanmıştır. Bu aşamada yayma plak kültürel ekim metoduyla bakteri yoğunluğu tespit edilmiştir. Başlangıç bakteri yoğunluğunun 10^8 kob/mL'nin üzerinde olması sağlanmıştır.

3.2.4. Liyofilizasyon işlemi

3.2.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan *B. bifidum* kültür ortamları, daha önceden sterilize edilmiş liyofilizasyon tepsilerine dökülerek -80 °C'de 24 saat dondurulmuştur ve ardından 48-72 saat boyunca vakum altında bir liyofilitazör yardımıyla (BFT, DK15, Türkiye) dondurarak kurutulmuştur. Liyofilize edilen kültürler, laboratuvar tipi öğütücüde 1 dakika boyunca öğütülerek toz haline getirilmiştir. Elde edilen tozlar, ışık geçirmeyen vakumlu ambalajlar içinde +4 °C'de 12 hafta boyunca depolanmıştır.

3.2.5. Vakum kurutma işlemi

B. bifidum'un prezervasyonunda alternatif bir yöntem olarak vakum kurutma uygulanmıştır. 3.2.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan *B. bifidum* kültür ortamları, steril alüminyum tepsilere dökülerek önce 2 gün boyunca 10 °C'de inkübatörde ön kurutmaya alınmış, ardından yaklaşık 1 gün boyunca 30 °C'de ve 11 mbar basınç altında vakumlu etüv (CLS, CLVO-27T, Türkiye) içerisinde kurutulmuştur (Foerst ve Kulozik, 2012). Kurutma işleminin tamamlanmasının ardından kültürler toz hâline getirilmiş ve ışık geçirmeyen vakumlu ambalajlarda +4 °C'de en az 12 hafta süreyle depolanmıştır.

Kültürlerde canlılık analizleri, kurutma işlemlerinden hemen önce ve hemen sonrasında, ayrıca 30, 60 ve 90 günlük depolama sürelerinde gerçekleştirilmiştir. Depolama süresince kültürlerin nem, su absorpsiyonu, pH, TTA ve FE-SEM analizleri

ile bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri de belirlenmiştir. Çalışma 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Bu çalışmada hazırlanan örneklere ait kodlar ve içerikleri, Çizelge 3.2’de verilmiştir.

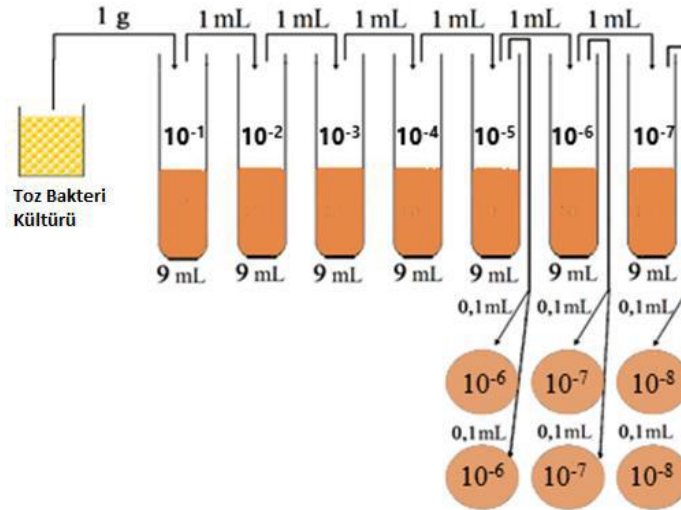
Çizelge 3.2. Örnek kodları ve içerikleri

Örnek Kodu	Açıklamalar
LS	Liyofilize süt kültürü
VS	Vakumla kurutulmuş süt kültürü
LZ	Liyofilize zeolit kültürü
VZ	Vakumla kurutulmuş zeolit kültürü
LK	Liyofilize zeolit ve süt kültürü
VK	Vakumla kurutulmuş zeolit ve süt kültürü

3.3. Vakumla ve Dondurularak Kurutulmuş Kültürlerde Yapılan Analizler

3.3.1. Canlı hücre sayımı

Kültürlerdeki canlı hücre sayısı kültürel sayım yöntemi ile belirlenmiştir. Ekimler için Bifidus Selective Medium (BSM) agar, dilüsyon sıvısı olarak ise fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) kullanıldı. Depolanan kültürler, adaptasyon için oda sıcaklığında 20 dakika bekletildikten sonra dilüsyon sıvısı içerisine alınarak seyreltme işlemleri yapılmıştır. Uygun kültür dilüsyonundan 100 µL alınarak BSM agar besiyerine yayma yöntemi ile ekilmiş ve petriyeler 37 °C’de anaerobik koşullar altında (anaerobik kavanoz kullanılarak) 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan *B. bifidum* kolonileri sayılarak sonuçlar kob/mL olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.1. Dilüsyon hazırlama ve ekim işlemleri



Şekil 3.2. Anaerobik inkübasyonda kullanılan kap sistemi

Liyofilizasyon ve vakumla kurutma işlemlerinin hücrelerin logaritmik olarak canlılığına etkisi her numune için 3.2'deki denklemlerle, depolama süresince bakterilerin canlı kalma oranları ise 3.3'deki denklemlerle hesaplanmıştır:

$$\text{Canlılık kaybı}(\%) = \frac{\text{KÖ hücre sayısı} - \text{KS hücre sayısı}}{\text{KÖ hücre sayısı}} \times 100 \quad (3.2)$$

Burada;

KÖ hücre sayısı: kurutmadan önce logaritmik canlı hücre sayısını (log kob/g),

KS hücre sayısı: kurutmadan sonra logaritmik canlı hücre sayısını (log kob/g)

ifade etmektedir.

$$\text{Canlı kalma oranı (\%)} = \frac{\text{Depolama periyodundaki canlı hücre sayısı}}{\text{Depolama başlangıcındaki canlı hücre sayısı}} \times 100^* \quad (3.3)$$

*Hücre sayısı \log_{10} (kob/g) cinsindedir.

3.3.2. Nem içeriği

Kurutulmuş süt tozu içeren kültürlerin nem içeriği, 102 °C'de sabit ağırlığa ulaşılan kadar etüvde kurutulularak (IDF, 2004), klinoptilolit içeren örneklerin nem içeriği ise AOAC'ye göre 135 °C'de 2 saat kurutulularak gravimetrik olarak belirlenmiştir (AOAC, 2005).

3.3.3. Su sorpsiyon özelliği

Probiyotik toz numuneleri ve klinoptilolit tozu (yaklaşık 1 g), NaCl doymuş çözeltisi ile birlikte hava geçirmez bir desikatöre yerleştirilerek 7 gün boyunca 25 °C'de bekletilmiştir. Süre sonunda numuneler tartılarak, 100 g kuru madde başına adsorbe edilen nem, g/100g cinsinden ifade edilmiştir.

3.3.4. pH

Kurutulmuş kültürlerin pH analizi, asidite ve kalite değerlendirmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. 2 gram örnek, 20 mL saf su ile yeniden hidratize edilerek çözelti elde edilmiş ve daha önceden kalibre edilen bir pH metre (WTW, Inolab pH7110, Almanya) ile ölçülmüştür.

3.3.5. Titre edilebilir asitlik (TTA)

Örneklerin asitliği, 2 g kurutulmuş kültür numunesi 20 mL saf su ile seyreltilip, içine birkaç damla fenolftalein indikatörü eklenerek ve 0,1 N NaOH ile kalıcı pembe renk oluşana kadar titre edilmiş ve harcanan NaOH hacmi kaydedilmiştir. Toplam asitlik, laktik asit cinsinden 3.1'deki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.6. Toz kültürlerin alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopu (FE-SEM) ile incelenmesi

Kurutulmuş *B. bifidum* kültürlerinin morfolojik özelliklerini ve bakteri konumlanmalarını incelemek üzere FE-SEM (ZEISS, Gemini 500, Almanya) analizi gerçekleştirilmiştir. Toz halinde kültürler, çift taraflı yapışkan bantla alüminyum FE-SEM tutucularına monte edilerek altınla kaplanmıştır. Kültürlerin çeşitli büyütme oranlarındaki görüntüleri alınmıştır.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

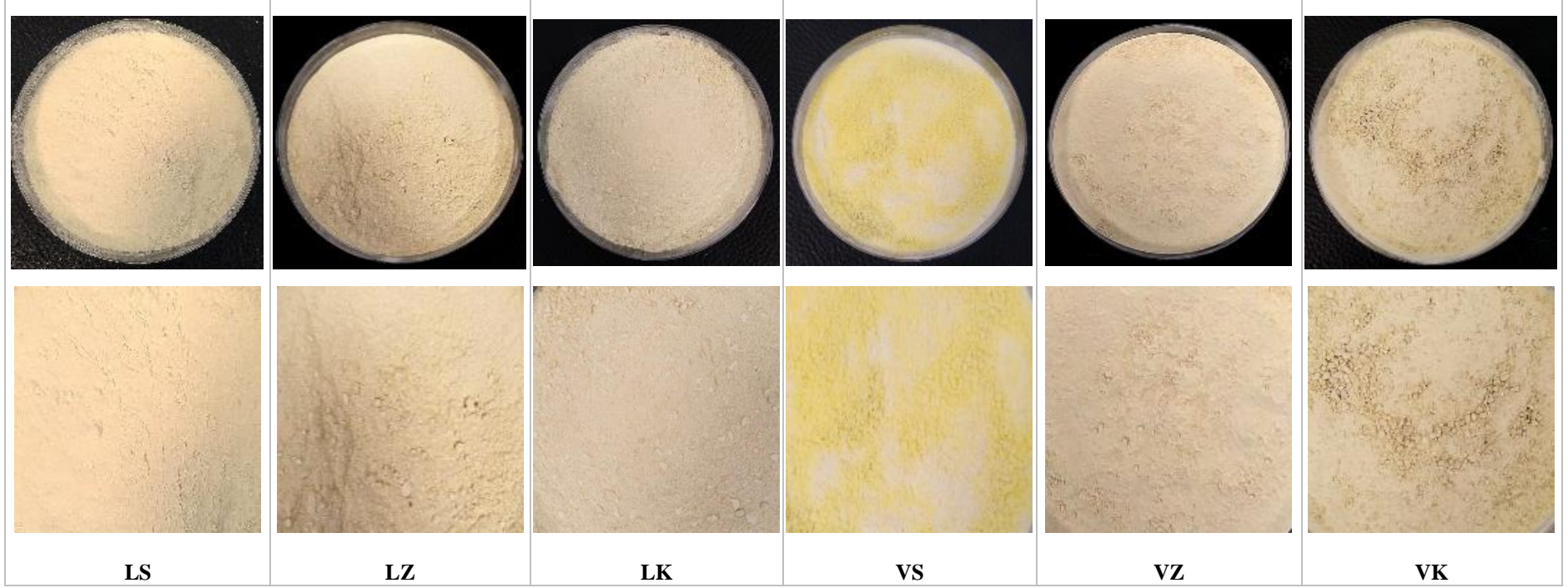
İstatistiksel analizler, Minitab 22.2.1 (Minitab Inc., State College, PA, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası ortalamalar arasındaki istatistiksel anlamlılık, %95 güven düzeyinde ($p < 0,05$) Tukey'nin çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, ortalama \pm standart sapma şeklinde sunulmuştur.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Bifidobacterium bifidum* kültürlerinin kurutulması sırasında koruyucu matris olarak klinoptilolit, yağsız süt ve bu iki bileşenin kombinasyonu kullanılmıştır. Yağsız süt %20 (a/h), klinoptilolit ise %20 (a/h) konsantrasyonunda uygulanmış; kombinasyon formülasyonunda ise %10 klinoptilolit ile %10 yağsız süt karıştırılarak olası sinerjik etkiler araştırılmıştır. Dondurarak kurutma ve vakumla kurutma işlemlerinin ardından elde edilen tozlar alüminyum folyo ile ambalajlanmış ve mikrobiyal stabiliteyi korumak ve çevresel etkilere maruziyeti en aza indirmek amacıyla 4 °C’de depolanmıştır. 90 günlük depolama süresi boyunca, 0., 30., 60. ve 90. günlerde örnekler alınarak, canlı hücre sayısı, nem içeriği, su aktivitesi, pH ve su absorpsiyon kapasitesi gibi çeşitli analizler gerçekleştirilmiştir.

Yağsız sütün ilavesinin, membran bütünlüğünü ve kültür rehidratasyonunu destekleyen protein ve şeker açısından zengin bir ortam sağlayarak koruyucu bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Öte yandan, klinoptilolit gözenekli yapısı ve iyon değişim özellikleri sayesinde nem düzenleme ve asit tamponlama gibi katkılar sağladığı değerlendirilmiştir. Kombinasyon matrisi, her iki bileşenin avantajlarını bir araya getirerek, depolama süresince kuruma kaynaklı stresin ve pH dalgalanmalarının azaltılması yoluyla bakteriyel canlılık ve fiziksel stabilitenin artırılmasını amaçlanmıştır. Bu taşıyıcıların karşılaştırmalı analizi, probiyotik fonksiyonelliğin endüstriyel olarak geçerli koşullarda korunmasında en etkili formülasyonun belirlenmesi açısından önemli bir katkı sunmuştur.

Şekil 4.1’deki görseller, kurutulmuş kültür tozlarının görünümünü göstermekte olup, vakumla kurutma ve dondurarak kurutma işlemlerine tabi tutulan farklı matrislerin fiziksel görünümünün karşılaştırılmasına olanak tanımaktadır. Uygulanan kurutma yöntemlerinin ve taşıyıcı maddelerin nihai ürünün fiziksel görünüşü üzerindeki etkili olduğu görülmektedir. Dondurarak kurutulmuş örnekler arasında, LS örneğinin soluk sarı renkte, kompakt yapıda, düzgün ve homojen bir forma sahip olduğu gözlemlenmiştir. LZ örneği ise grimsi bir renkte, ince ve homojen dokulu bir toz yapı sergilemiştir. LK örneği daha düzensiz bir formda olup, nispeten daha heterojen bir yapı sunmuştur.



Şekil 4.1. Farklı koruyucu ajanlar ve kurutma yöntemleriyle elde edilen *B. bifidum* toz kültürlerine ait görseller

Buna karşılık, görünüş bakımından vakumla kurutulmuş örneklerin liyofilize örneklerle nazaran daha farklı olduğu görülmüştür. VS örneğinin soluk sarı renkte, hafif düzensiz bir dokuya ve belirgin renk farklılıklarına sahip olduğu; VZ örneğinin, grimsi renkli, nispeten düzgün ve ince dokulu olduğu; VK numunesinin ise daha düzensiz bir parçacık dağılımına ve yer yer pürüzlü bir dokuya sahip olduğu görülmüştür. Bu farklı yapısal oluşumlar, hem kurutma yönteminin hem de matris bileşiminin kurutulmuş probiyotik tozların fiziksel özellikleri üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır.

4.1. Koruyucu Materyallerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

B. bifidum kültürlerinin kurutulmasında koruyucu ajan olarak kullanılan zeolit ve yağsız süt tozu hammaddelerinin nem içeriği, su absorpsiyon kapasitesi, pH ve toplam titre edilebilir asitlik (TTA, % laktik asit cinsinden) gibi bazı fizikokimyasal özellikleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hammade örneklerinin fizikokimyasal özellikleri*

Örnek	Nem (%)	Su Absorpsiyonu (%)	pH	TTA (% LA)
Zeolite	2,90±0,06 ^b	0,71±0,07 ^b	8,68±0,12 ^a	0,05±0,00 ^b
Yağsız süt tozu	3,42±0,07 ^a	12,39±0,31 ^a	6,48±0,08 ^b	1,68±0,10 ^a

*Veriler ortalama ± standart sapma şeklindedir. Farklı harflerle (a, b) gösterilen değerler aynı parametre içinde istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p < 0,05$). LA: laktik asit cinsinden

Buna göre, yağsız süt tozunun nem içeriği (%3,42), zeolite kıyasla (%2,90) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, yağsız süt tozunun daha higroskopik (su tutucu) bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu yüksek nem tutma kapasitesi, proteinden ve karbonhidrattan zengin yapısıyla, suyu kolayca çekip tutabilmesinden kaynaklanmaktadır (Meena vd., 2024). Benzer şekilde, Shrestha vd. (2007) de yağsız süt tozunda %3,1–3,8 arasında değişen nem seviyeleri bildirmiş ve bu durumu, laktoz ile süt proteinlerinin higroskopik doğasına atfetmiştir. Buna karşılık, zeolitin daha düşük nem içeriği, onun daha stabil ve inorganik kristal yapısının, organik materyaller gibi su tutma kapasitesinin daha az olmasından kaynaklanmaktadır (Mumpton, 1999).

Su absorpsiyon kapasitesine ilişkin sonuçlarda da benzer bir eğilim gözlemlenmiştir. Yağsız süt tozu, %12,39 oranında yüksek bir su absorpsiyon

kapasitesine olup, bu özellik, çevresindeki nemi kolayca çekebilen higroskopik yapısıyla ilişkilidir. Bu bulgu, Jouppila ve Roos (1994) tarafından yürütülen bir çalışmada da desteklenmektedir; söz konusu çalışmada, süt tozlarının %10–15 oranında su absorpsiyonu gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Öte yandan, zeolitin su absorpsiyon kapasitesi yalnızca %0,71 olarak ölçülmüş; bu düşük değer, mineralin organik yapıli koruyuculara kıyasla sınırlı higroskopik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bu fark, yağsız süt tozunun organik yapısına bağlanabilir. İçerdiği proteinler ve laktoz, su bağlama kapasitesine sahip olup, kurutulmuş probiyotik hücrelerin yeniden hidrasyon süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (Letona vd., 2023). Zeolit ise gözenekli yapısına rağmen, inorganik mineral kompozisyonu nedeniyle su bağlama kapasitesi bakımından sınırlıdır (Mumpton, 1999). Wang ve Peng (2010) de bu durumu doğrulamış ve doğal zeolitlerin %1'in altında su absorpladığını rapor etmiştir.

pH değerleri incelendiğinde, zeolitin 8,68 pH değeriyle belirgin şekilde bazik bir karakter sergilediği, yağsız süt tozunun ise 6,48 pH değeriyle hafif asidik bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Patil vd. (2016) yaptıkları bir çalışmada, yağsız süt tozunun pH değerinin yaklaşık 6,5 olduğunu rapor etmişlerdir. Zeolitin yüksek pH değeri, bazik yüzey gruplarının yanı sıra kalsiyum ve sodyum gibi değiştirilebilir katyonların varlığına bağlanmış (Wang ve Peng, 2010); bu durumun tamponlama kapasitesine katkı sağladığı düşünülmektedir. Yağsız süt tozunun hafif asidik yapısının ise, laktik asit ve protein içeriği ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Aynı doğrultuda, Misaelides (2011), doğal klinoptilolitin su ile temas ettiğinde pH'yı hafif alkali aralığa yönlendirdiğini ve bu davranışın iyon değişim kapasitesinden kaynaklandığını belirtmiştir. Ayrıca Inglezakis ve Grigoropoulou (2004), zeolitlerin yapısındaki değiştirilebilir katyonların çözeltideki H⁺ iyonları ile yer değiştirerek ortam pH'ında artışa neden olabileceğini göstermiştir. Yağsız süt tozunun hafif asidik yapısının ise, laktik asit ve protein içeriği ile ilişkili olduğu değerlendirilmektedir.

Bu farklılık, TTA (toplam titre edilebilir asitlik) değerleriyle de desteklenmiştir. Yağsız süt tozunun, zeolite (%0,05) kıyasla %1,68 (laktik asit cinsinden) gibi anlamlı düzeyde yüksek bir asitliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bu yüksek asitliğin, içerdiği laktik asit ve proteinler nedeniyle, daha güçlü bir tamponlama kapasitesi sağladığı ve yapının hafif asidik özellik kazandığı söylenebilir. Patil vd. (2016) de yağsız süt tozunda 1,5–2 % oranında laktik asit tespit etmiştir. Öte yandan, zeolitin inorganik ve düşük reaktif yapısı nedeniyle çok düşük bir titre edilebilir asitliğe sahip olduğu söylenebilir (Wang ve Peng, 2010). Benzer bir çalışmada, Mumpton (1999), doğal zeolitlerin

(klinoptilolit) laktik asit cinsinden TTA değerinin %0,02–0,07 arasında olduğunu rapor etmiştir.

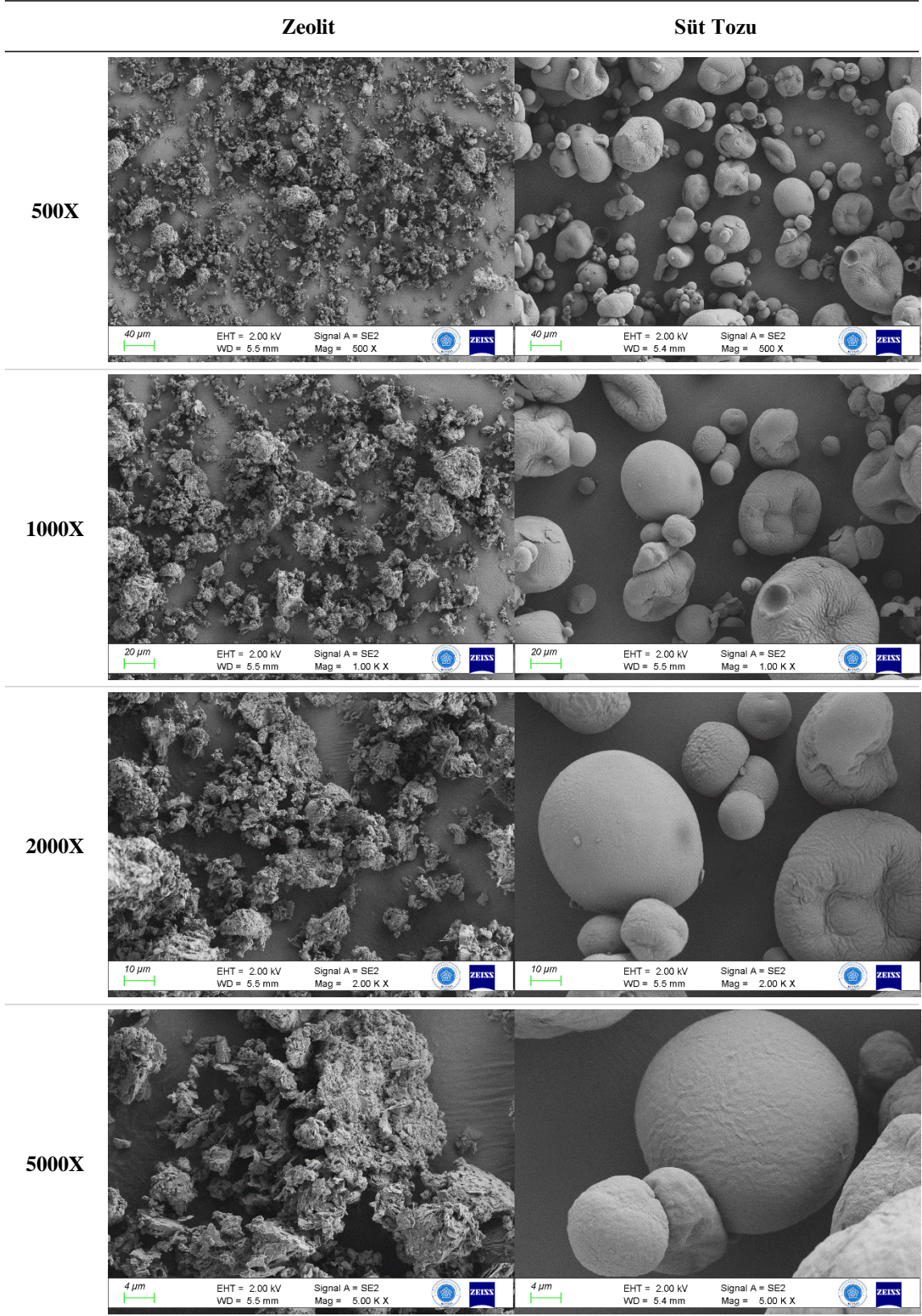
Hammadde örneklerinin partikül boyut dağılım sonuçları Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Yağsız süt tozunun partikül boyutlarının, $D_{50} = 56,84 \mu\text{m}$ ve $D_{90} = 80,83 \mu\text{m}$ değerleriyle, zeolite kıyasla belirgin şekilde daha büyük olduğu belirlenmiştir. Zeolitin medyan partikül çapı ise $5,18 \mu\text{m}$ ile oldukça düşük olduğu görülmüştür. Ortalama partikül çapı süt tozunda $47,96 \mu\text{m}$, zeolitte ise yalnızca $4,58 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüş ve zeolitin beklendiği üzere yüksek oranda mikronize olduğu ortaya konmuştur. Bu durumun, zeolitin daha yüksek özgül yüzey alanına sahip olması nedeniyle potansiyel koruyucu etkisini artırabileceği yönünde bir gösterge sunduğu değerlendirilmektedir.

Süt tozunun, geniş partikül dağılımı (D_{10} – D_{90} farkı) sergilediği, buna karşılık zeolitin daha dar ve homojen bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bulgu, zeolitin üretim sürecinde daha kontrollü bir öğütme ve sınıflandırma işlemine tabi tutulduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.2. Örneklerin parçacık boyut dağılımı

Örnek	D_{10} (μm)	D_{50} (μm)	D_{90} (μm)	Ortalama Çap (μm)	Obscuration (%)
Zeolit	0,31	5,18	7,14	4,58	0,31
Yağsız süt tozu	5,39	56,84	80,83	47,96	0,23

Her iki örnekte de obskürasyon (obscuration) %0,2–0,3 aralığında ölçülmüş olup, bu değerlerin lazer difraksiyon analizleri için ideal ölçüm sınırları içerisinde yer aldığı ve elde edilen sonuçların güvenilirliğini desteklediği belirlenmiştir. “Obskürasyon”, lazer ışınının ne kadarının partiküller tarafından engellendiğini gösteren bir parametredir; bu oranın çok yüksek veya çok düşük olması ölçüm doğruluğunu olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Viriden, 2010).



Şekil 4.2. Koruyucu ajanlara ait FE-SEM görüntüleri

Numunelerin FE-SEM görüntüleri Şekil 4.2’de sunulmuştur. Yağsız süt tozuna ait partiküllerin, genellikle heterojen bir boyut dağılımı sergilediği ve çoğunlukla

aglomerasyon eğilimi gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu aglomere yapının, süt tozunun üretimi sırasında maruz kaldığı ısıl ve mekanik stresler sonucu oluşmuş olabileceği düşünülmektedir (Schuck, 2013). Partiküller arasında yüzeysel yapışmaların mevcut olduğu ve yüzey detaylarında yer yer mikro çatlaklar ile yüzey pürüzlülüklerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu yapısal özelliklerin, süt tozunun çözünürlük, su bağlama kapasitesi ve reaktivite gibi fonksiyonel özelliklerini doğrudan etkileyebileceği ifade edilmektedir (Kelly vd., 2014).

Zeolit numunesine ait görüntülerde ise kristalimsi ve geometrik partikül morfolojisinin belirgin olduğu görülmüştür. Partiküllerin daha keskin kenarlara sahip olduğu ve oldukça poröz bir yüzey yapısı sergilediği gözlemlenmiştir. Bu gözenekli yapı, zeolitin adsorpsiyon kapasitesi açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır (Grzeszczak, vd., 2023). Ayrıca, partikül boyutlarının homojen olarak dağılmış olması, zeolitin mikronize edildiğini ve kontrollü bir öğütme süreciyle hazırlandığını göstermektedir (Mastinu vd., 2019).

4.2. Kurutulmuş Kültürlerde Canlı Hücre Sayımı

Koruyucu ajanlarla muamele edilen *B. bifidum* kültürlerinde, hem liyofilizasyon hem de vakumla kurutma işlemleri öncesi ve sonrasında kültürel sayımlar yapılarak canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Kurutma öncesi ve sonrası canlılık oranları hesaplanarak, uygulanan kurutma yöntemlerinin neden olduğu canlılık kayıpları ile koruyucu ajanların etkinlikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.3’de verilmiştir.

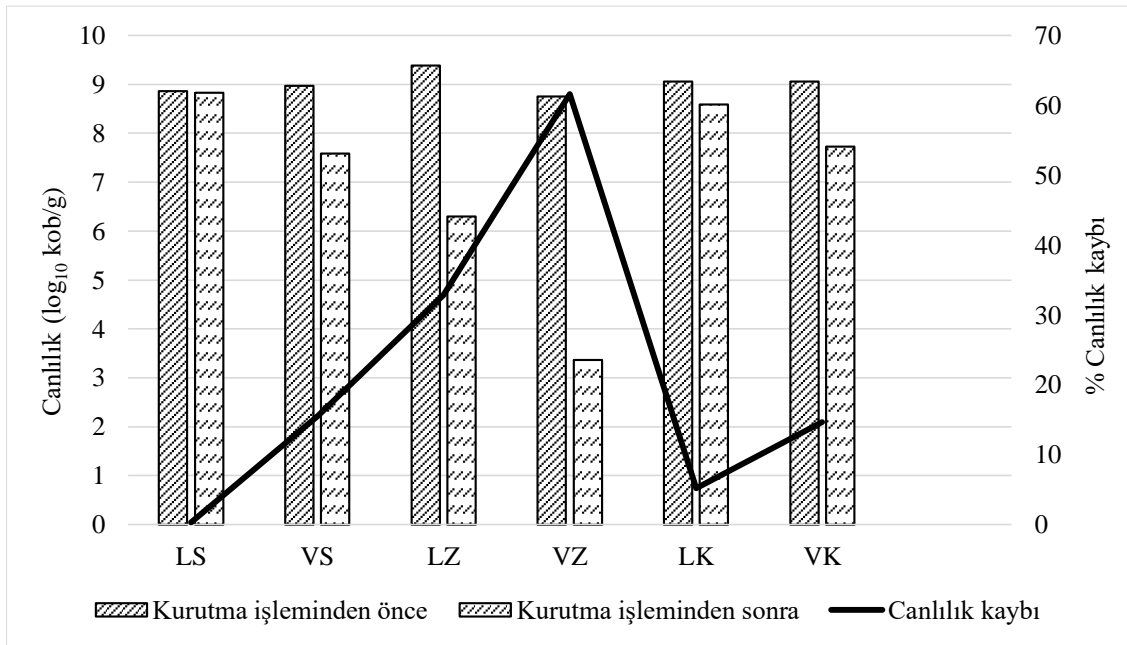
Çizelge 4.3’de sunulan veriler, kurutma yöntemlerinin ve taşıyıcı maddelerin *B. bifidum* kültürlerinin canlılığı üzerinde anlamlı düzeyde etkili olduğunu ortaya koymaktadır. LS örneğinde hücre canlılığı, 8,86 log kob/g’den 8,83 log kob/g’a yalnızca çok küçük bir azalma göstererek, yalnızca 0,03 log kob/g birimlik bir canlılık kaybına neden olmuştur. Bu oldukça düşük azalma, dondurarak kurutma sırasında yağsız süt tozunun yüksek koruyucu etkisini göstermektedir. Yağsız süt tozunun bakteriyel hücreleri koruma yeteneği, çoğunlukla içeriğindeki laktoz ve proteinlerin dondurarak kurutma koşullarında hücre zarlarını stabilize etme özelliğine bağlanmaktadır (Carvalho vd., 2004). Buna karşın, VS örneğinde canlılık 8,97 log kob/g’den 7,58 log kob/g’a belirgin bir düşüş göstermiş ve 1,39 log kob/g birimlik bir canlılık kaybı meydana gelmiştir. Bu durum, yağsız süt tozunun bir miktar koruma sağladığını, ancak vakumla kurutma işleminin hücreler üzerinde daha fazla stres oluşturduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.3. *B.bifidum*'un kriyoprotektif ajanlar varlığında dondurarak kurutma işlemi öncesi ve sonrasındaki canlılık oranları[†]

Örnek	Kurutma işleminden önce (log kob/g)	Kurutma işleminden sonra (log kob/g)	Canlılık kaybı (log)	Canlılık kaybı (% log)	<i>B. bifidum</i> biyokütle ağırlığı (g)
LS	8,86±0,09 ^{aBC}	8,83±0,08 ^{aA}	0,03	0,33	7,865
VS	8,97±0,10 ^{aBC}	7,58±0,14 ^{bB}	1,39	15,49	7,766
LZ	9,38±0,05 ^{aA}	6,30±0,14 ^{bC}	3,08	32,84	7,902
VZ	8,75±0,08 ^{aC}	3,36±0,17 ^{bD}	5,39	61,60	7,746
LK	9,06±0,02 ^{aB}	8,59±0,17 ^{aA}	0,47	5,19	8,892
VK	9,06±0,0 ^{aB}	7,73±0,08 ^{bB}	1,33	14,68	7,125

[†] Ortalama ± standart sapma. Aynı sütündeki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0,05). L: Liyofilizasyon, V: Vakum kurutma, S: Süt tozu, Z: Zeolit, K: Süt-zeolit karışımı

Yalnızca zeolit içeren örneklerde canlı hücre sayılarının belirgin şekilde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. LZ örneğinde canlılık, 9,38 log kob/g'dan 6,30 log kob/g'ye düşerek 3,08 log birimlik bir kayıp meydana gelmiştir. Daha dikkat çekici sonuç ise VZ numunesinde gözlemlenmiş, canlılık 8,75 log kob/g'dan 3,36 log kob/g'ye gerileyerek 5,39 log birimlik bir azalma oluşmuştur. Ancak zeolit, süt tozu ile birlikte kullanıldığında daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Dondurarak kurutulmuş zeolit-süt tozu karışımının içeren oluşan LK örneği, nispeten düşük bir canlılık kaybı göstererek 9,06 log kob/g'dan 8,59 log kob/g'ye düşmüş ve bu durum 0,47 log kob/g birimlik bir azalmaya karşılık gelmiştir. Bu bulgu, süt tozu bileşeninin bakteri hücresi korumasında baskın rol oynadığını, zeolitin ise muhtemelen ortamın nem düzenlenmesine katkı sağladığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, vakumla kurutulmuş süt-zeolit karışımı örneği (VK) daha daha sınırlı bir azalma göstermiş, canlılık 9,06 log kob/g'den 7,73 log kob/g'ye düşerek 1,33 log kob/g birimlik bir kayıp göstermiştir.



Şekil 4.3. Kurutma işlemi öncesi ve sonrası *B. Bifidum*'un canlılık değerleri (log₁₀ kob/g)

Şekil 4.3, farklı örnek formülasyonları ve kurutma yöntemleri kullanılarak *B. bifidum* hücrelerinde meydana gelen canlılık kaybı yüzdeleri göstermektedir. Elde edilen veriler, kurutma koşulları ile koruyucu matris bileşiminin bakteri canlılık düzeyi üzerinde anlamlı etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, en belirgin canlılık kaybı yaklaşık %61,60 ile VZ örneğinde gözlenmiş olup, bu durum kurutma sürecinde hücresel hasarın ciddi seviyede olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, zeolitin fizikokimyasal özelliklerine dayandırılabilir. Zeolit yüzeyi yüksek iyon değişim kapasitesine sahip olup, çevresel koşullarda çeşitli katyonların (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ gibi) yer değiştirmesine olanak tanımaktadır; bu durum lokal iyon dengesini bozarak probiyotik hücreler için olumsuz bir mikro-çevre oluşumuna neden olabilmektedir (Miller vd., 1994).

Yağsız süt tozunun aksine, zeolit, osmotik basıncı dengeleyebilecek besin bileşenlerini içermemesi nedeniyle hücre içi ve dışı su hareketlerini düzenlemek üzere osmotik dengeye önemli bir katkı sağlayamamaktadır. Bu nedenle, osmotik stresin hafifletilmesi ya da hücre içi koşulların stabilize edilmesi bakımından yetersiz kalmakta; sonuç olarak kurutma işlemi sırasında hücresel dehidratasyonun artmasına ve canlılık kaybının yükselmesine neden olmaktadır (Carvalho vd., 2004; Saarela vd., 2006). Ayrıca, klinoptilolitin sulu ortamda belirgin bir alkalileştirici etkisi bulunmakta olup, pH'yı nötrden hızla 9,0–9,2 civarına yükseltmektedir (Ersoy vd., 2002). Buna karşılık, *B.*

bifidum, hafif asidik ila nötr koşullarda (pH 6,5–7,0) gelişmekte olup, optimum aktivitesi genellikle 6 ile 7,5 pH aralığında gözlemlenmektedir (Chen vd., 2021). Kurutma sırasında tamponlayıcı ajanlar yoksa alkali pH'ya maruz kalmak, enzim fonksiyonu ve zar stabilitesini olumsuz etkileyerek yapısal strese ve canlılık kaybına açabilmektedir. Bu bağlamda, LZ örneğinde %32,48 oranında canlılık kaybı gözlemlenmiş olup, bu durum klinoptilolitin tek başına yeterli bir kriyoprotektan olmadığını ortaya koymaktadır.

LS örneği %1'in altında en düşük canlılık kaybı göstererek, süt bileşenlerinin üstün koruyucu etkisini doğrulamıştır. Yağsız sütün içeriğindeki laktoz ve kazein, dondurarak kurutma sırasında cam benzeri bir matris oluşturarak bakteriyel hücreleri etkili biçimde immobilize etmekte ve zar lipidleri ile proteinlerin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Bu matris, zararlı buz kristallerinin oluşumunu sınırlandırmakta ve su uzaklaştırılırken osmotik dengeyi desteklemektedir (Carvalho vd., 2004). VS örneği ise yaklaşık %15,5 oranında orta düzeyde bir canlılık kaybı sergilemiştir. Süt tozu önemli bir koruma sağlamakla birlikte, vakum kurutma işlemi, 30 °C gibi nispeten düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinde dahi, bakteriyel hücreler üzerinde çeşitli stres etkileri oluşturabilmektedir. Bu stresler, özellikle proteinlerde kısmi denatürasyona ve koruyucu matrisin etkinliğinde azalmaya neden olarak gözlemlenen canlılık kaybını açıklamaktadır (Santivarangkna vd., 2007a). Bu nedenle, koruyucu ajanların etkili olabilmesi yalnızca bileşimlerine değil, aynı zamanda uygulandıkları kurutma koşullarının uygunluğuna da bağlıdır.

Zeolitin tek başına koruyucu ajan olarak yetersiz olduğu VZ ve LZ örneklerindeki yüksek canlılık kayıplarıyla açıkça ortaya konmuştur. Ancak dikkat çekici şekilde, LK örneği %5,19 gibi oldukça düşük bir canlılık kaybı göstermiştir. Bu durumda, süt tozunun membran ve protein stabilizasyonuna katkısı ile zeolitin matris içindeki nemi düzenleyerek su aktivitesini azaltması etkili olmuştur. Bu çift yönlü koruma, kurutma homojenliğini artırmış ve mikroçevresel stresi azaltmış olabilir. Benzer şekilde, VK örneğinde canlılık kaybı %14,68 oranında daha yüksek olmakla birlikte, koruyucu sinerjinin vakum koşullarında da belirli ölçüde varlığını sürdürdüğü görülmüştür. Ancak daha önce de belirtildiği gibi, vakum kurutmaya özgü stres faktörlerinin, koruyucu matrisin etkinliğini sınırlamış olabileceği düşünülmektedir.

Bu sonuçlar, zeolitin tek başına bakteriyel hücrelerin kurutma sırasında yeterli koruma sağlayamadığını göstermektedir. Bu bulgu, mikroporoz yapısı ve yüksek yüzey alanına rağmen zeolitin, *Paraburkholderia phytofirmans PsJN* suşunun dehidrasyon kaynaklı hasarını önlemede tek başına etkili olmadığını bildiren Berninger vd. (2017)

tarafından gerçekleştirilen çalışma ile uyumludur. İlgili araştırma, kurutma ve depolama sırasında hücre zarlarının sağlam kalabilmesi için yağsız süt veya jelatin gibi koruyucu ajanların eklenmesinin önemini vurgulamaktadır. Bu çalışmanın bulguları da, zeolitin yapısal destek sağlamakla birlikte, bakteriyel hücrelerin etkin şekilde korunabilmesi için biyokimyasal koruyucularla birlikte kullanılması gerektiğini desteklemektedir.

Her iki kurutma yönteminin sonuçları karşılaştırıldığında, kurutma yönteminin probiyotik canlılığı üzerinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Vakum kurutma, hücre zarları ve duvarlarında hasara yol açabilen dehidrasyon ve basınç değişikliklerine neden olabilmektedir. Santivarangkna vd. (2007), gelişmiş mikroskopi teknikleri kullanarak *Lactobacillus helveticus*'ta bu tür yapısal hasarları gözlemlemiştir. Bu hasarlar, hücrelerin yapısal bütünlüğünü zayıflatarak hayatta kalma kapasitelerini azaltmaktadır. Ayrıca, hücrelerin vakum koşullarına maruz kalma süresi uzadıkça, besin ve enerji rezervlerinin tükenmesiyle birlikte metabolik stres ve hücresel yaşlanma meydana gelebilmekte; bu da bakterilerin kurutma sonrası toparlanmasını zorlaştırmaktadır (Santivarangkna vd., 2007a; Wang ve Zhong, 2024). Kurutma sırasında matrisin büzülmesi ve yoğunlaşmasından kaynaklanan mekanik stresler de hücrelere fiziksel zarar verebilmektedir. Vakum kurutma, her ne kadar ortamın oksijen seviyesini azaltsa da, ortamda kalan düşük miktardaki oksijenin, hücre zarları ve protein yapılarında oksidatif hasara yol açarak canlılık oranını daha da düşürebileceği bildirilmektedir (Wang ve Zhong, 2024).

Buna karşılık, liyofilizasyon, suyu sıfırın altındaki sıcaklıklarda süblimasyon yoluyla uzaklaştıran ve sıvı fazı atlayarak yüksek vakum altında gerçekleşen daha nazik bir işlemdir. Bu yöntem, sıcaklığı donma noktasının oldukça altında tutarak termal hasarı en aza indirmekte ve zar lipidleri ile hücre içi proteinlerin yapısal bütünlüğünü korumaktadır. Sonuç olarak, dondurarak kurutma işlemi, *B. bifidum* gibi ısıya duyarlı bakterilerin canlılığını daha etkili bir şekilde muhafaza etmektedir. Ayrıca, dondurarak kurutulmuş ürünler depolama süresince oksidatif ve hidrolitik bozulmaya karşı daha dayanıklı olmakta; bu da ürünün raf ömrünü uzatmakta ve probiyotik fonksiyonelliğin korunmasına katkı sağlamaktadır (Sayedboworn vd., 2018).

Ancak bu çalışmada elde edilen sonuçlar, VZ örneği hariç, diğer tüm kurutulmuş örneklerin kurutma sonrası canlı hücre sayılarını probiyotiklerin etkili olabilmesi için gereken minimum seviye olan 6 log kob/g'nin üzerinde tuttuğunu göstermiştir (Dantas vd., 2021). Bu durum, kullanılan kurutma yöntemleri ve koruyucu bileşenlerin bakteri canlılığını ve potansiyel sağlık faydalarını koruma açısından başarılı olduğunu işaret

etmektedir. VZ örneği ise bu önemli eşik değerin altına düşmüş ve zeolitin tek başına vakumla kurutma işleminde bakteriyel canlılığı korumada yetersiz kaldığını göstermiştir. Öte yandan, süt tozu içeren örnekler, ister tek başına ister zeolit ile kombinasyon halinde olsun, önemli ölçüde daha yüksek koruma sağlamıştır. Bu bulgular, probiyotiklerin kurutulmuş ürünlerde canlı kalmasını sağlamak amacıyla, doğru katkı maddelerinin seçilmesinin kritik bir öneme sahip olduğunu vurgulamaktadır.

Çizelge 4.4. Kurutulmuş *B.bifidum* kültürlerinin depolama süresince canlılık değişimleri (\log_{10} kob/g)[†]

	Depolama süresi (gün)				
	0	30	60	90	Ortalama
LS	8,83±0,08 ^{aA}	8,75±0,06 ^{abA}	8,61±0,01 ^{bA}	8,60±0,01 ^{bA}	8,70±0,11
VS	7,58±0,14 ^{aB}	6,62±0,27 ^{bB}	6,60±0,08 ^{bC}	6,53±0,02 ^{bC}	6,83±0,48
LZ	6,30±0,14 ^{cC}	6,63±0,00 ^{bB}	6,93±0,04 ^{abC}	6,52±0,00 ^{bcC}	6,59±0,25
VZ	3,36±0,17 ^{aD}	3,18±0,18 ^{aC}	3,78±0,16 ^{aD}	GG	2,58±1,61
LK	8,59±0,17 ^{aA}	8,38±0,00 ^{aA}	8,58±0,02 ^{aA}	8,56±0,03 ^{aA}	8,53±0,11
VK	7,73±0,08 ^{aB}	6,53±0,24 ^{cB}	7,33±0,26 ^{abB}	6,73±0,10 ^{bcB}	7,08±0,53

[†]Ortalama ± standart sapma. Aynı satırdaki farklı küçük harfler (a–c) ve aynı sütündeki farklı büyük harfler (A–F) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). L: Liyofilizasyon, V: Vakum kurutma, S: Süt tozu, Z: Zeolit, K: Süt-zeolit karışımı, GG: Gelişme gözlenmedi.

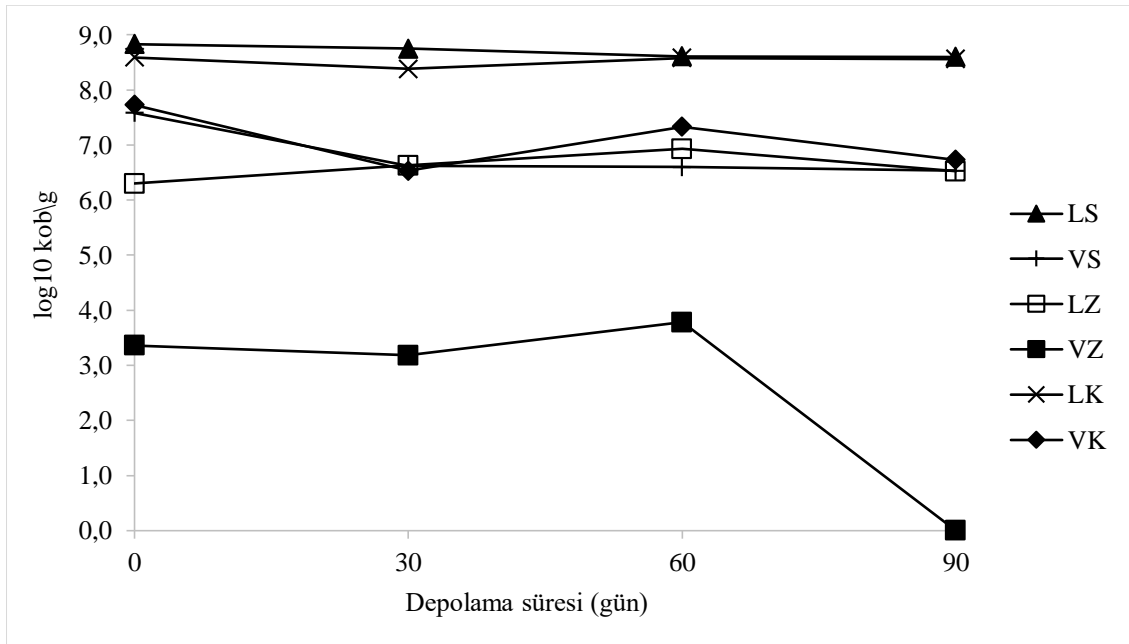
Bu çalışmada, 90 günlük depolama süresi boyunca *B. bifidum*'un canlılık durumu incelenmiştir (Çizelge 4.4). Tablo, kültürlerin farklı taşıyıcılarla ve kurutma yöntemleriyle elde edilen kültür formlarının depolama süresince gösterdiği logaritmik canlılık değerlerini ortaya koymaktadır. LS ve VS örnekleri, uygulanan kurutma yönteminin etkisini yansıtan belirgin farklılıklar göstermiştir.

LS örneğinde başlangıç canlılık değeri 8,83 log kob/g olarak ölçülmüş; bu değer zamanla hafif bir azalma göstererek 90. gün sonunda 8,60 log kob/g seviyesine düşmüştür. Depolama boyunca gerçekleştirilen tüm canlılık ölçümleri dikkate alındığında ise, ortalama canlılık değeri 8,70 log kob/g olarak hesaplanmıştır. VS örneği ise daha düşük bir başlangıç canlılık değeri olan 7,58 log kob/g ile başlamış; depolama süresince bu değer kademeli olarak azalmış ve 90. gün sonunda 6,53 log kob/g'ye gerilemiştir. Bu sonuçlar, yağsız sütün depolama süresince bakteriyel canlılığı yüksek oranda koruduğunu göstermektedir. Bunun başlıca nedeni, yağsız sütte bulunan organik bileşiklerin metabolik aktiviteyi azaltma, hücre lizisini önleme, hidrolitik ve oksidatif

reaksiyonları yavaşlatma gibi canlılık kaybının başlıca nedenlerine karşı koruyucu bir rol oynamasıdır (Letona vd., 2023). Buna ek olarak, aynı taşıyıcı kullanılsa dahi vakumla kurutmanın, liyofilizasyona kıyasla daha fazla canlılık kaybına yol açtığı görülmektedir. Liyofilizasyon yöntemi, vakumla kurutmaya göre, düşük sıcaklıkta ve vakum altında gerçekleşmesi nedeniyle, termal stresin en aza indirilmesini ve probiyotik canlılığın daha uzun süre korunmasını ve raf ömrünün uzamasını sağlamaktadır.

Buna karşılık, VZ örneği en düşük başlangıç canlılık değeri olan 3,36 log kob/g ile ölçülmüş; 90. gün sonunda ise gelişme gözlenmemiştir (GG). Bu bulgular, (Santivarangkna vd., 2007b) tarafından bildirilen sonuçlarla uyumludur. Söz konusu çalışmada, zeolitin mikroporoz yapısına ve nem tamponlama kapasitesine rağmen, canlılığın korunmasında tek başına yetersiz olduğu belirtilmiş; bu nedenle protein veya şeker bazlı koruyucularla birlikte kullanılmasının gerekli olduğu vurgulanmıştır.

Çalışmamızda dikkate değer bir diğer gözlem, LZ, VZ, LK ve VK örneklerinde depolamanın ilk iki ayında canlı hücre sayısında hafif bir artış gözlemlenmiş olmasıdır. Özellikle LZ örneğinde, başlangıçta düşük olan 6,30 log kob/g canlılık değeri, depolama boyunca artış göstererek 6,52 log kob/g seviyesine ulaşmıştır.



Şekil 4.4. Farklı taşıyıcılarla kurutulmuş *B. bifidum* kültürlerinde depolama süresince canlılık değişimi (log₁₀ kob/g)

Bu durum, muhtemelen subletal düzeyde fizyolojik hasar almış hücrelerin zaman içinde toparlanmasına bağlanabilir. Bu hücreler, özellikle vakum kurutma işlemi

sırasında ya da güçlü koruyucu ajanlar içermeyen formülasyonlarda, kurutma esnasında membran bütünlüğü, enzim fonksiyonu veya taşıma sistemlerinde geçici bozulmalara uğrayabilmektedir. Tam anlamıyla inaktive olmamalarına rağmen, bu hücresel işlevlerin geçici olarak baskılanmasıyla, kültür ortamında koloni oluşturma yetenekleri ilk aşamada sınırlamaktadır.

Benzer toparlanma eğilimleri, önceki probiyotik canlılık çalışmalarında da rapor edilmiştir. Örneğin Celik ve O’Sullivan (2013), farklı *Bifidobacterium* suşları üzerinde kurutma ve depolamanın etkisini araştırmış; *B. animalis* subsp. *lactis* ve *B. longum* subsp. *infantis*’in trehaloz dahil çeşitli koruyucu ajanlarla kurutulduğu örneklerde, kurutmadan hemen sonra canlılıkta azalma gözlenmiş; ancak depolama sırasında —özellikle düşük nem ve oksijensiz koşullarda— subletal hasar görmüş hücrelerin kısmi toparlanma gösterdiğini bildirmiştir. Benzer şekilde, Tanimomo vd. (2016), *Bifidobacterium crudilactis* suşunun sorbitol ile liyofilize edilmesi sonrasında depolama sırasında canlılıkta hafif bir artış olduğunu gözlemiş ve bu artışı membran stabilizasyonuna ve matriks içindeki nem dağılımına bağlamışlardır. Tüm bu bulgular, mikroorganizma davranışının sadece başlangıç ya da son ölçümleriyle değil, depolama süreci boyunca sürekli olarak izlenmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Bazı çalışmalar, süt tozu matrislerinde hafif düzeyde canlılık toparlanması bildirmiştir; ancak bu etkilerin büyük ölçüde suş tipi, kurutma yöntemi ve depolama koşullarına bağlı olduğu belirtilmektedir (Santivarangkna vd., 2007a). Mevcut çalışmada ise bu toparlanma, özellikle zeolit içeren örneklerde gözlenmiş, LS veya VS örneklerinde benzer bir artış saptanmamıştır. Ilinskaya vd. (2024), tüm suşların aynı koşullarda depolanmasına rağmen, suşlar arasında farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Örneğin *Lactobacillus plantarum* ve *L. delbrueckii* suşlarının süt tozu içeren kontrollerinde hafif bir canlılık artışı gözlenirken, diğer bazı suşlarda yalnızca daha yavaş bir canlılık azalması kaydedilmiştir. Bu değişkenlik, suşların stres toleransı ve hücresel onarım mekanizmalarındaki farklılıkları yansıtmakta olup, her bir suşun kurutma ve depolamaya verdiği tepkiyi belirgin şekilde etkilemektedir. Bu bulgular, aynı çevresel koşullar altında dahi, her suşun kendi içsel fizyolojik özelliklerinin hayatta kalma ve toparlanma üzerinde kritik rol oynadığını göstermektedir.

Canlılık toparlanmasının sadece suş özelliklerine değil, kullanılan koruyucu matrise de bağlı olduğu unutulmamalıdır. Bu bağlamda, zeolitin hücresel onarıma elverişli bir mikroçevre oluşturma potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir. Zeolitin kristal ve gözenek yapısı, depolama süresince nemi adsorbe edip yavaşça salarak bir nem

tamponu görevi görmesine olanak tanmaktadır (Eroglu vd., 2017). Bu dinamik nem düzenlemesinin, aşırı kurumunun önüne geçerek zarar görmüş hücrelerin rehidratasyonuna katkı sağlandığı ve membran stabilizasyonu açısından uygun koşullar oluşturduğu söylenebilir. Ayrıca zeolitler, iyon değişim kapasitesi ve mineral içeriği sayesinde, bakteriyel metabolizma ve membran bütünlüğü açısından kritik olan kalsiyum, magnezyum ve potasyum gibi iz elementlerin sağlanması yoluyla membran onarımına ve enzim reaktivasyonuna katkıda bulunabilmektedir (Mumpton, 1999; Szatmári vd., 2020). Bu nedenle, LS ve VS örneklerinde, başlangıç canlılıklarını yüksek seviyede korumalarına rağmen, zeolitin sağladığı bu uyarlanabilir mikroçevresel destekten yoksun kalmaları nedeniyle, subletal hasarın onarılmasının güçleştirdiği düşünülmektedir. Bulgular, zeolitin fizikokimyasal özelliklerinin, özellikle kontrollü sıcaklık ve pH koşullarında, kurutma işlemi sırasında zarar gören probiyotik hücrelerin hayatta kalma oranlarını artırabileceği görüşünü desteklemektedir.

Benzer sonuçlar Osborne vd. (2021) tarafından da rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada, zeolitin *E. coli* kültürlerinde durağan fazda hücre canlılığını artırdığı ve mikroçevresel stabilizasyonu sağlayarak membran bütünlüğünü koruyabildiği gösterilmiştir. Bu durum, bizim çalışmamızda LK örneklerinin, VS örneğine kıyasla depolama süresi boyunca daha düşük canlılık kaybı göstermesiyle uyumludur.

Depolama süresi boyunca canlılık trendi incelendiğinde, hem LS hem de LK örneklerinde yüksek *B. bifidum* hayatta kalımı gözlenmiştir. Ancak, başlangıç ve son değerlerin karşılaştırılması, canlılık kaybının derecesinde ince bir fark ortaya koymuştur. En yüksek başlangıç canlılığına sahip LS örneği (8,83 log kob/g), zamanla kademeli bir azalma göstererek 90. günde 8,60 log kob/g'ye gerilemiştir. Buna karşılık, LK örneği daha düşük bir başlangıç canlılığıyla başlamış (8,59 log kob/g), ancak zaman içindeki azalma daha küçük olup (0,03 log kob/g), canlılığın başlangıç seviyesine yakın şekilde korunmasını sağlamıştır. Bu durum, LK formülasyonunun daha stabil bir koruma profili sunduğunu göstermektedir.

Ilinskaya vd. (2024) tarafından yürütülen ve klinoptilolit bazlı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş çeşitli *Lactobacillus* suşlarının sekiz aylık depolama süresince canlılıklarının izlendiği çalışma, bu çalışmanın bulguları ile benzerlik göstermektedir. Söz konusu çalışmada üç farklı formülasyon test edilmiştir: sadece zeolite immobilizasyonu (Grup 1), zeolit ile koruyucu ajanların kombinasyonu (süt tozu, jelatin, sukroz; Grup 2) ve sadece koruyucu ajan içeren immobilize edilmemiş kontrol grubu (Grup C). Kontrol grubu örneklerde (Grup C), suşların büyük çoğunluğu, sekiz aylık

depolama sonunda canlılık oranını en yüksek seviyede korumuştur. Örneğin, *Lactobacillus plantarum* için canlılık oranları sırasıyla kontrol, Grup 2 ve Grup 1 formülasyonlarında %70,8, %65,5 ve %64,9 olarak ölçülmüştür. *L. acidophilus* suşunda ise bu oranlar %70,7, %68,1 ve %64,9 şeklindedir. Bu bulgular, klasik kriyoprotektanların uzun vadeli canlılık koruma kapasitesini açıkça ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, immobilize formülasyonlar da anlamlı düzeyde canlılık sağlamış; özellikle koruyucu ajan ilavesi (Grup 2), zeolitin tek başına uygulandığı formülasyona (Grup 1) kıyasla canlılık üzerinde daha olumlu etkiler göstermiştir.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular, protein açısından zengin koruyucular (örneğin süt tozu) ile birlikte kullanıldığında zeolit bazlı matrislerin probiyotiklerin depolama stabilitesini artırabileceği yönündeki hipotezi desteklemektedir. Bu formülasyonda, zeolit adsorpsiyon ve desorpsiyon özellikleri sayesinde nem düzenlemesi sağlarken, süt tozu stabil bir camsı matris oluşturarak hücresel yapıları koruyacak besinsel destek sağlamaktadır. Süt tozu, doğal nem tamponlama veya iyon değişim özelliklerine sahip olmasa da, zeolit ile birlikte sinerjik bir işlev görerek hem kurutma hem de depolama aşamalarında daha etkili bir koruma sistemi oluşturmaktadır. Mevcut çalışmada da görüldüğü üzere, koruyucu ajanlar olarak zeolit ve süt tozunun kombinasyonu, sadece zeolit kullanılan formülasyonlara kıyasla canlılığın korunmasında daha yüksek etkinlik göstermiştir. Bu sonuçlar, mineraller ile protein bazlı bileşenlerin birlikte kullanımının probiyotik stabilitesinin korunmasında kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

4.3. Kurutulmuş Kültürlerin FE-SEM ile Mikromorfolojik Analizi

Bu çalışmada, kurutulmuş probiyotik örneklerin yüzey morfolojisi ve mikroyapısal özelliklerini incelemek amacıyla Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) kullanılmıştır. FE-SEM görüntüleri, partiküllerin şekli, dokusu ve dağılımı hakkında ayrıntılı bilgiler sunarak, farklı kurutma yöntemleri ve taşıyıcı bileşimlerinin, *B. bifidum*'un matris içerisindeki korunması ve entegrasyonu üzerindeki etkilerinin görsel olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (Ramirez-Olea vd., 2024). Üçok ve Sert (2022) yaptıkları bir çalışmada, kurutma işlemi sırasında kullanılan koruyucu maddenin türüne bağlı olarak parçacıkların yüzey yapısı ve mikromorfolojisinin değiştiğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada ise, doğru morfolojik analiz yapılabilmesi ve parçacık boyutu homojenliğinin sağlanabilmesi amacıyla kurutulmuş örnekler öğütülerek mikronize

edilmiştir. FE-SEM analizleri sonucu elde edilen görüntülerde, farklı taşıyıcı bileşenlerle hazırlanan *B. bifidum* kültürlerinin mikroyapı ve yüzey morfolojilerinde belirgin farklılıklar olduğu görülmüştür (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). %20 oranında yağsız süt tozu (LS) içeren liyofilize örneklerde, homojen ve süngersi bir yapı gözlemlenmiş; kristal yapı içermeyen amorf matris içinde belirgin şekilde ayırt edilebilen rod biçimli *B. bifidum* hücre kümeleri tespit edilmiştir (Trelles vd., 2013). Bu bulgu, hücrelerin morfolojik bütünlüklerini koruduğunu ve dondurarak kurutma işleminin canlılık ve hücresel yapı üzerinde minimal hasara yol açtığını göstermektedir.

%20 oranında klinoptilolit içeren liyofilize kültür numuneleri (LZ) ise granüler, köşeli ve kristal yapıya sahip bir yüzey morfolojisi sunmuş; ancak *B. bifidum* hücreleri görüntülerde doğrudan seçilememiştir. Bu durum, hücrelerin zeolit yüzeylerine güçlü şekilde adsorbe olması ya da matrisin yapısal düzensizlikleri içinde tutulmasıyla açıklanabilir. Bununla birlikte, gözlemlenen gözenekli yapılar, potansiyel olarak, bakteriyel canlılığı sürdürebilecek koruyucu bir mikroçevre sunabilecek nitelikte değerlendirilmektedir. Bu gözlemler, rapor edilen benzer SEM analizleriyle de örtüşmektedir. Senila vd., (2022) doğal zeolit üzerinde mikrobiyal biyofilm oluşumunun SEM ile inceledikleri çalışmalarında bireysel hücrelerin zeolit matrisi içinde gömülü halde bulunduğunu ve dolayısıyla net şekilde ayrıştırılamadığı sonucuna ulaşmışlardır.

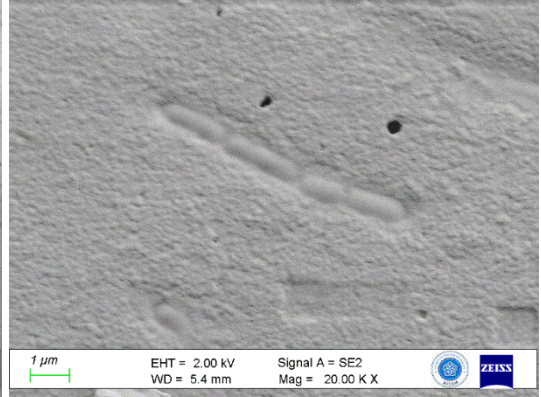
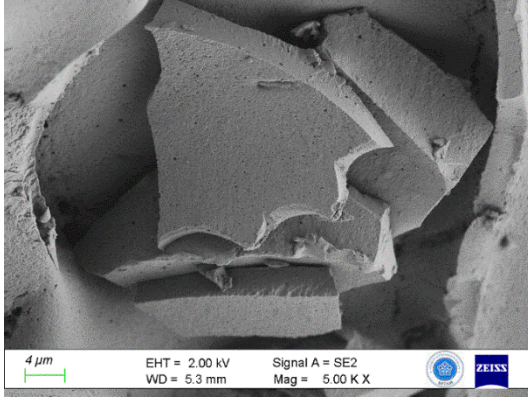
Süt-zeolit karışımı (LK) içeren liyofilize örneklerde, film benzeri amorf alanlarla birlikte mineral parçacıklar gözlemlenmiş; bu heterojen yapı içerisinde çubuksu formunu koruyan *B. bifidum* hücreleri net bir şekilde ayırt edilebilmiştir. Bu bulgu, süt proteinlerinin film oluşturma özelliği ile zeolitin yüksek adsorpsiyon kapasitesi arasında sinerjik bir etki bulunduğunu ve bunun hücre stabilizasyonuna katkı sağladığını göstermektedir.

Büyütme Oranı

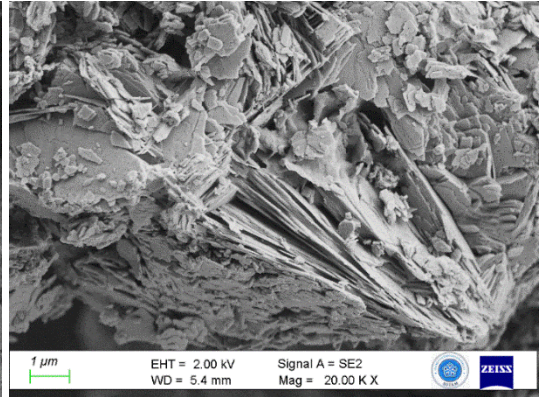
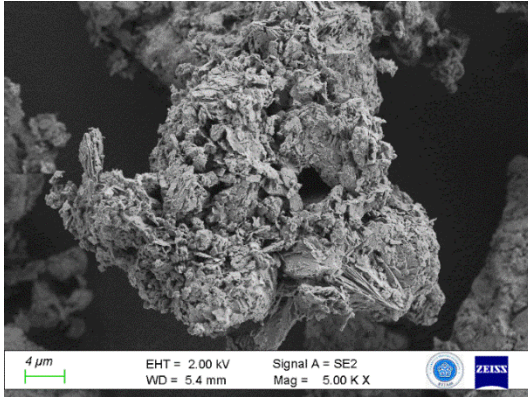
500X
Ölçek çubuğu: 4 μ m

20000X
Ölçek çubuğu: 1 μ m

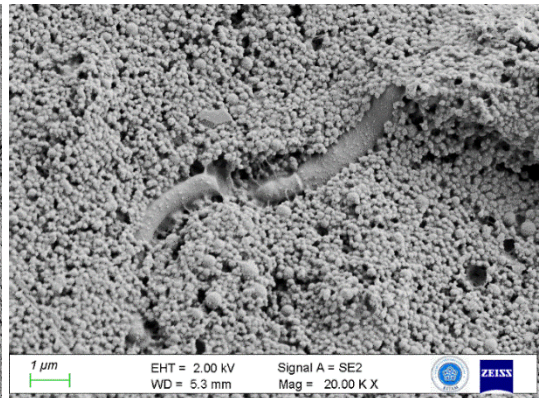
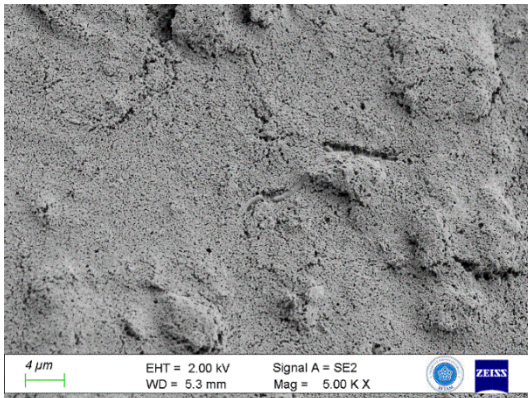
LS



LZ



LK



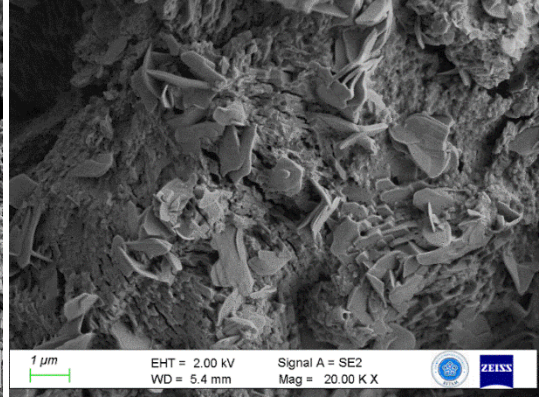
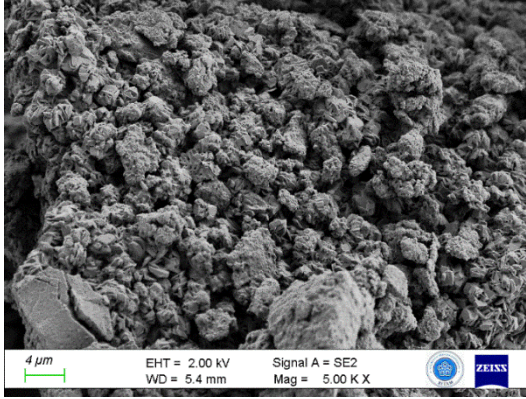
Şekil 4.5. Liyofilize edilen *B. bifidum* kültürlerinin FE-SEM görüntüleri

Büyütme Oranı

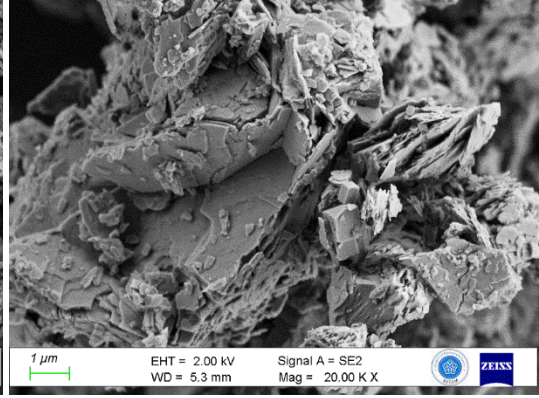
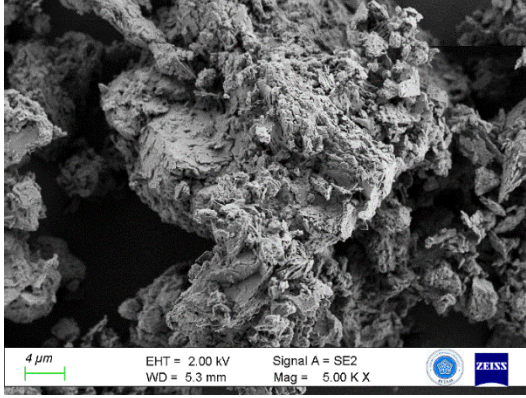
500X
Ölçek çubuğu: 4 μm

20000X
Ölçek çubuğu: 1 μm

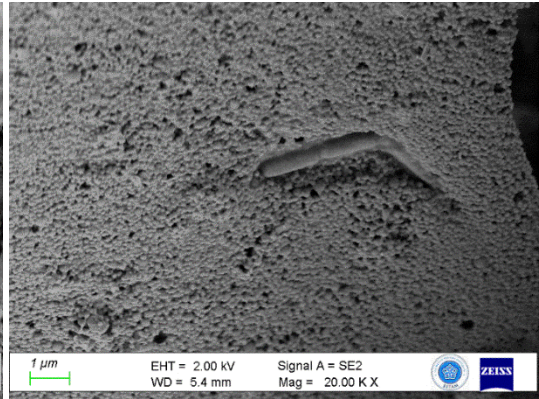
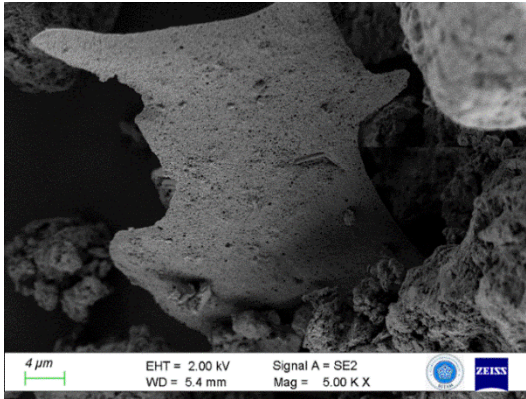
VS



VZ



VK



Şekil 4.6. Vakumla kurutulanan *B. bifidum* kültürlerinin FE-SEM görüntüleri

Vakumlu etüvde kurutulmuş %20 (a/h) oranında yağsız süt tozu içeren kültür örneğinin (VS), FE-SEM görüntüsünde, matrisin yoğun, pürüzlü ve çöküntülü bir yüzey görünümü sergilediği gözlemlenmiştir. Yapının, düşük gözenekliliğe sahip amorf ve sıkışmış bölgeler içerdiği tespit edilmiştir. Dondurarak kurutulmuş kültürlerin aksine, bu örnekte belirgin büzülme ve yüzeyde daralma izleri dikkat çekmektedir. Matris dokusunun daha yakından incelendiği görüntüde ise, yüzeyin pul şeklinde, yassı ve parçalanmış görünümlü bir morfolojiye sahip olduğu görülmektedir. Bu yapıların bazıları çubuksu, eğimli ve kıvrılmış halde olup, bunların muhtemelen kurutulmuş ve kısmen deforme olmuş *B. bifidum* hücreleri olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, yoğun aglomere olmuş matris yapısı nedeniyle, hücre bütünlükleri net biçimde ayırt edilememektedir. Bu durum, yüzeyin kırık bir yapı kazanması ya da hücrelerin sıkışmış matrisin daha derin katmanlarına gömülmüş olmasıyla ilişkilendirilmektedir.

%20 (a/h) oranında klinoptilolit içerisinde hazırlanan ve vakumlu etüvde kurutulmuş *B. bifidum* kültürünün (VZ) mikro yapısının sıkı ve köşeli parçacık morfolojisi sergilediği gözlemlenmiştir. Kristal şekillerin kısmen korunduğu ve parçacıkların birbirine yakın yerleştiği görülmüştür. Aynı formülasyonun dondurarak kurutulmuş örneğine (LZ) göre yüzey daha az gözenekli görünmekte, bazı parçacıklarda ise aglomerasyon yani birbirine yapışma gözlemlenmiştir. Yüzey, mikroskobik düzeyde daha az keskin kenarlı ve hafif pürüzlü bir yapı göstermektedir. Bu durum, vakum altında nispeten daha yüksek sıcaklığa uzun süre maruz kalmanın yüzey düzleşmesine veya parçacıkların birbirine kaynaşmasına yol açtığını düşündürmektedir. Ayrıca, bu örnekte de bakteriyel hücrelere rastlanmamıştır; bu durum kuruma sürecinde meydana gelen yapısal değişimlerin hücre bütünlüğünü ve muhafazasını olumsuz etkilediğini göstermektedir.

Son olarak, %10 (a/h) oranında yağsız süt tozu ve %10 (a/h) oranında klinoptilolit hazırlanmış vakumla kurutulmuş *B. bifidum* kültürü (VK) yoğun, gözenekli ve düzensiz bir mikroyapı sergilemiştir. FE-SEM görüntüsünde, sıkışmış protein matrisi içerisinde dışa doğru çıkan zeolit parçacıkları ve düzensiz yüzeyler dikkat çekmektedir. Bu durum, vakumla kurutma sırasında matrisin büzülmesi ve suyun uzaklaşmasıyla birlikte taşıyıcı maddelerin tam olarak bütünleşemediğini göstermektedir. Ayrıca büyük zeolit parçacıklarının süt matrisi içine kısmen gömüldüğü görülmüştür. Organik (süt) ve inorganik (zeolit) fazlar arasında tam bir bütünleşme sağlanamamış ve zeolit yüzeylerinin süt matrisinin katı fazlarıyla düzensiz şekilde kaplandığı fark edilmiştir. Bununla birlikte, *B. bifidum* hücreleri bu yapıda gözlemlenebilmiş; ancak sayıları daha az ve dağılımları

daha dağınık olmuştur. Hücrelerin matris içinde düzensiz biçimde dağılmış olması ve bazı hücrelerin yüzeye yakın pozisyonda gözlemlenmesi, koruyucu ortamın homojenliğinin yetersiz kaldığını düşündürmektedir.

4.4. Kurutma Yöntemi ve Taşıyıcıların Nem İçeriği Üzerindeki Etkisi

Nem içeriği, probiyotik ürünlerin depolama stabilitesi için kritik bir parametredir. Yüksek nem oranı, probiyotiklerin raf ömrünü veya etkinliğini azaltabilecek oksidasyon, istenmeyen kimyasal reaksiyonlar veya mikrobiyal bozulma riskini artırabilirken; düşük ve stabil nem içeriği raf ömrünü ve ürün güvenliğini artırmaktadır (Savedboworn vd., 2018). Bu çalışmada, farklı formülasyonların nem içeriği, farklı kurutma yöntemlerinin etkinliğini ve koruyucu maddelerin nem düzenlemedeki rolünü değerlendirmek amacıyla, kurutulmuş *B. bifidum* kültürlerinin nem içeriği 0, 30, 60 ve 90. günlerde ölçülmüştür. Çizelge 4.5'te sunulan verilere göre, nem içeriği, kullanılan kurutma yöntemi ve koruyucu maddeye bağlı olarak değişiklik göstermiştir ($p < 0,05$).

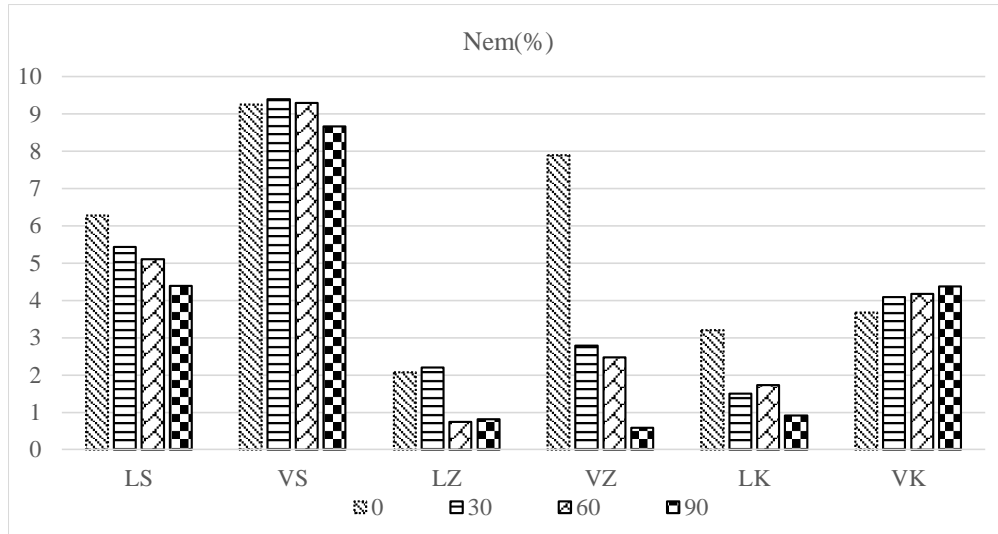
Çizelge 4.5. Kurutulmuş *B. bifidum* kültürlerine ait nem değerleri (%)[†]

	Depolama süresi (gün)				Ortalama
	0	30	60	90	
LS	6,28± 0,26 ^{aC}	5,43± 0,23 ^{bB}	5,10± 0,26 ^{bB}	4,39± 0,24 ^{cB}	5,30±0,74
VS	9,25± 0,23 ^{abA}	9,40± 0,29 ^{aA}	9,30± 0,29 ^{abA}	8,66± 0,22 ^{bA}	9,15±0,37
LZ	2,07± 0,11 ^{aE}	2,20± 0,20 ^{aD}	0,74± 0,02 ^{bF}	0,81± 0,08 ^{bC}	1,45±0,72
VZ	7,89± 0,46 ^{aB}	2,79± 0,30 ^{bD}	2,47± 0,36 ^{bD}	0,59± 0,11 ^{cC}	3,43±2,84
LK	3,20± 0,28 ^{aD}	1,50± 0,10 ^{bE}	1,73± 0,15 ^{bE}	0,92± 0,03 ^{cC}	1,84±0,89
VK	3,67± 0,21 ^{bD}	4,09± 0,28 ^{abC}	4,17± 0,11 ^{abC}	4,37± 0,18 ^{aB}	4,07±0,32

[†]Ortalama ± standart sapma. Aynı satırdaki farklı küçük harfler (a–c) ve aynı sütundaki farklı büyük harfler (A–F) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). L: Liyofilizasyon, V: Vakum kurutma, S: Süt tozu, Z: Zeolit, K: Süt-zeolit karışımı

LS örneği, nispeten yüksek olan %6,28 nem içeriği ile başlamış, zamanla bu değer yavaş fakat istikrarlı bir azalma göstererek 90. gün sonunda %4,39'a düşmüştür. Elde edilen bu değerler, daha önce yapılan çalışmalarda dondurularak kurutulmuş süt tozu bazlı probiyotik formülasyonlarda %3 ile %6 arasında kalan artık nem seviyeleriyle uyumludur (Carvalho vd., 2004) ve kurutma işlemi ile koruyucu matrisin etkinliğini

doğrulmaktadır. Buna karşılık, literatürde protein bazlı matrisler kullanılarak vakumla kurutulan probiyotik tozlarının genellikle %8 ile %12 arasında nem içerdiği bildirilmiştir (Corcoran vd., 2004; Santivarangkna vd., 2007a). VS örneğinde de, depolama süresi boyunca gözlenen yaklaşık %9,15 seviyesinde seyreden yüksek nem içeriği, vakum kurutmanın süt tozu matrisinden bağlı suyu uzaklaştırmada sınırlı etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu durum, laktoz ve proteinler gibi higroskopik bileşenlerin kurutma işlemi sonrasında bile su tutma eğiliminde olmalarıyla açıklanabilir. Bu bulgu, vakumla kurutma yönteminin dondurarak kurutmaya kıyasla daha fazla nem tuttuğunu ortaya koyan Picot ve Lacroix (2004) ile Heidebach vd. (2012) tarafından yürütülen çalışmalarla da örtüşmektedir; her iki çalışmada da vakum kurutulmuş örneklerde nem oranı %9–11 arasında bildirilmiştir



Şekil 4.7. Depolama süresince *B. bifidum* kültürlerinin nem içeriği değişimleri

Yalnızca klinoptilolit içeren örnekler (LZ ve VZ), genel olarak düşük nem içeriği sergilemiştir. Bu durum, klinoptilolitin yüksek su adsorpsiyon kapasitesi, mikroporöz yapısı ve termal olarak stabil kristal yapısına bağlanabilir. Protein veya şeker bazlı koruyucular higroskopik doğaları nedeniyle bağlı suyu tutma eğilimi varken, klinoptilolit kurutma sırasında daha etkili nem uzaklaştırılmasına katkı sağlamaktadır (Król vd., 2024; Margeta vd., 2013). LZ örneği, tüm depolama süresi boyunca oldukça düşük nem değerleri göstermiştir; başlangıçta %2,07, 60. ve 90. günlerde ise %0,74 ve %0,81 seviyelerine kadar düşmüştür. Ortalama nem içeriği %1,45 olup, bu değer Ilinskaya vd. (2024) tarafından klinoptilolit içeren tüflerde bildirilen %0,40 seviyesinden bir miktar

yüksek olsa da, mineral saflığı, kurutma parametreleri ve kullanılan probiyotik suş farkları bu durumu açıklayabilir.

VZ örneği ise daha değişken bir nem profili sergilemiştir. Başlangıçta %7,89 olan nem içeriği, 30. ve 60. günlerde sırasıyla %2,79 ve %2,47 olarak ölçülmüş, 90. günde ise %0,59'a kadar düşmüştür. Bu ani düşüş, vakum kurutma işlemi sırasında yüzeydeki bağlı suyun tam olarak uzaklaştırılmamasından kaynaklanabilir. Ayrıca, vakum kurutmanın, dondurarak kurutmaya kıyasla daha düşük kurutma etkinliği, özellikle ilk aşamada bakteriler üzerinde daha yüksek düzeyde stres oluşturarak yapısal hasara yol açabilmektedir (Santivarangkna vd., 2007a). Genel olarak, LZ örneğinde gözlenen sürekli düşük nem oranı ile VZ örneğinde tespit edilen hızlı düşüş eğilimi, klinoptilolit nem azaltıcı etkisini ortaya koymakta ve özellikle liyofilizasyon yönteminde daha kararlı bir kuruma sağladığını ortaya koymaktadır.

Klinoptilolit ve süt tozu kombinasyonu içeren LK örneği, ortalama %1,84 nem içeriği göstermiştir ve bu değer zamanla istikrarlı bir azalma eğilimi sergilemiştir. Bu durum, klinoptilolit kurutucu özellikleri ile süt tozunun stabilizatör etkisi arasında sinerjik bir etkiye işaret etmektedir. 90. gün itibarıyla, LK örneğinin nem içeriği, yalnızca süt tozu içeren LS örneğine (%5,30) kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuş ve bu sonuç, dondurularak kurutulmuş probiyotik tozlar için bildirilen optimal nem aralığı (%3–6) içinde yer almaktadır (Carvalho vd., 2004). VK örneği ise 90 günlük depolama süresince, başlangıçta %3,67 olan nem içeriğini, hafif bir artışla %4,37 seviyesine taşımıştır. Bu küçük artış, muhtemelen ambalaj malzemesinin yetersiz bariyer özellikleri nedeniyle dış ortamdan gelen nemin difüzyonuyla ilişkilidir. Buna rağmen, nem içeriği genel olarak stabil kalmıştır. Önemli olarak, VK örneği, yalnızca süt tozu içeren vakumla kurutulmuş VS örneğine (%9,15) kıyasla anlamlı derecede daha düşük nem seviyeleri korumuştur. Bu durum, klinoptilolit nem uzaklaştırma kapasitesini belirgin şekilde artırarak, vakum kurutma sırasında nem stabilitesine katkı sağladığını göstermektedir.

4.5. Kurutulmuş Kültürlerde Su Absorpsiyon Davranışı

Depolama boyunca su absorpsiyon davranışının izlenmesi, kurutulmuş gıda tozlarının fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik stabilitesini tahmin etmek açısından çok önemlidir. Nem alımı veya kaybı, tozlarda topaklanma, yapışkanlık, Maillard reaksiyonları, dokusal bozulmalar ve mikrobiyal çoğalma gibi kaliteyi olumsuz etkileyen değişikliklere neden olabilir (Foster vd., 2005). Özellikle süt veya karbonhidrat bazlı

higroskopik tozlar, çevresel bağıl nem değişimlerine karşı duyarlıdır; bu durum su aktivitesinin (a_w) değişmesine ve dolayısıyla ürün güvenliğinin tehlikeye girmesine ve raf ömrünün kısılmasına neden olabilir. Aşırı nem alımı su aktivitesini artırarak oksidatif ve hidrolitik bozulmayı teşvik etmekte ve probiyotik canlılığını azaltabilmektedir. Öte yandan, aşırı nem kaybı mekanik strese veya hücre membranında hasara yol açarak rehidrasyon sonrası hücrelerin toparlanmasını engelleyebilmektedir. Bu nedenle, absorpsiyon eğilimlerinin değerlendirilmesi; uygun ambalaj malzemesi seçimi, çevresel nem kontrolü ve işlem parametrelerinin optimizasyonu açısından kritik öneme sahip olup, bu olumsuz etkilerin önlenmesine olanak tanımaktadır (Carvalho vd., 2004; Santivarangkna vd., 2007a)

Bu çalışmada, kurutulmuş *B. bifidum* toz kültürlerinin su absorpsiyon davranışı, yaklaşık %75 bağıl nem sağlayan doygun NaCl çözeltisi bulunan bir desikatörde yedi gün süreyle bekletilerek değerlendirilmiştir. Bu koşullar altında, formülasyonların çevresel nemi alma kapasiteleri incelenmiş ve nem içeriğindeki değişim miktarı absorpsiyon eğilimini yansıtmıştır. Çizelge 4.6'da farklı kurutma yöntemi ve koruyucu bileşimlere sahip kültür örneklerinin nem absorpsiyon düzeylerini ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.6. Kurutulmuş *B. bifidum* kültürlerine ait su absorpsiyonu değerleri (%)[†]

	Depolama süresi (gün)				Ortalama
	0	30	60	90	
LS	6,57±0,18 ^{bA}	6,43± 0,07 ^{bA}	5,93± 0,08 ^{cA}	7,84± 0,11 ^{aA}	6,69±0,74
VS	3,42±0,38 ^{aCD}	3,26± 0,20 ^{aB}	3,09± 0,13 ^{aB}	3,33± 0,32 ^{aBC}	3,27±0,27
LZ	2,61±0,34 ^{aD}	1,84± 0,21 ^{aC}	2,28± 0,36 ^{aC}	2,70± 0,43 ^{aC}	2,36±0,46
VZ	0,15±0,00 ^{bE}	1,07± 0,15 ^{aD}	1,25± 0,16 ^{aD}	1,32± 0,39 ^{aD}	0,95±0,53
LK	4,58±0,53 ^{aB}	3,58± 0,20 ^{abB}	3,35± 0,46 ^{bB}	3,62± 0,27 ^{abB}	3,78±0,59
VK	3,94±0,18 ^{aBC}	1,32± 0,18 ^{cD}	2,84± 0,19 ^{bBC}	1,73± 0,21 ^{cD}	2,46±1,08

[†]Ortalama ± standart sapma. Aynı satırdaki farklı küçük harfler (a–c) ve aynı sütundaki farklı büyük harfler (A–F) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). L: Liyofilizasyon, V: Vakum kurutma, S: Süt tozu, Z: Zeolit, K: Süt-zeolit karışımı

Çalışmada, LS örneğinin su absorpsiyon oranında 60. günde azalma, 90. günde ise anlamlı bir artış göstermiştir. Nemdeki bu geçici düşüş, çevresel nemin toz kültürün su aktivitesinden düşük olması durumunda, örneğin başlangıçta çevreye su kaybetmesiyle ilişkili olabilir. Alternatif olarak, toz yapısında meydana gelen gözenek çökmesi veya

laktoz gibi bileşenlerin kristalleşmesi gibi iç yapısal değişiklikler, erken depolama döneminde su tutma kapasitesinin geçici olarak azalmasına yol açmış olabilir (Foster vd., 2005; Jouppila ve Roos, 1994). 90. gün sonunda nem oranının %7,84'e yükselmesi, toz yapısının zamanla gevşemesi ve süt tozunun higroskopik bileşenlerinin çevresel nemi daha kolay absorbe etmesiyle açıklanabilir. Öte yandan, VS örneği boyunca su absorpsiyonu %3,09 ile %3,42 arasında değişmiş ve genel olarak stabil bir seyir izlemiştir. Bu değerler, LS örneğine göre daha düşük olmakla birlikte, vakum kurutma uygulanmasına rağmen süt tozunun doğal nem çekme eğiliminin tamamen engellenemediğini ortaya koymaktadır. Bu fark, dondurarak kurutulmuş ürünlerin daha gözenekli yapıya sahip olması ve bu nedenle çevresel nemi daha kolay absorbe etme eğiliminde bulunmalarıyla açıklanabilir. Bu durum, Heidebach vd. (2012) tarafından bildirilen bulgularla benzerlik göstermektedir.

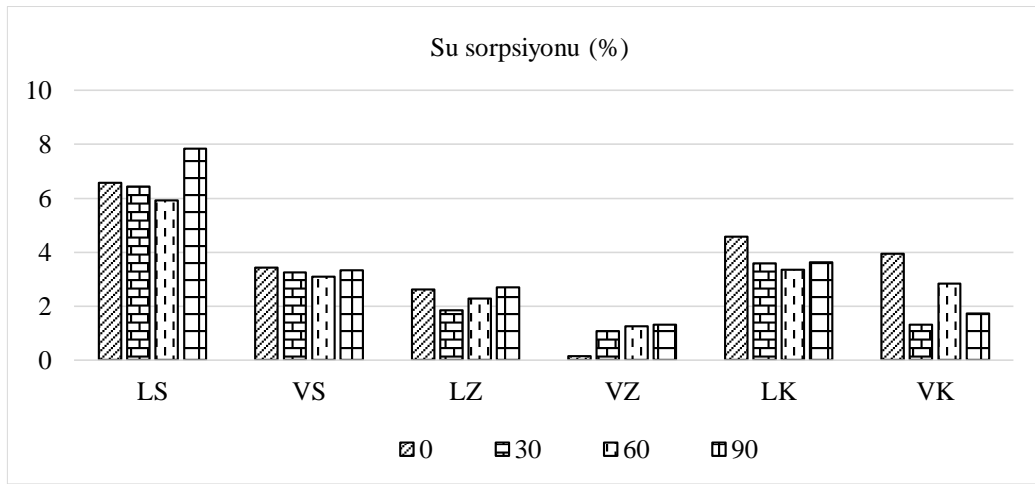
VZ örneği, su absorpsiyonu açısından en düşük değerleri göstermiştir; nem oranı %0,15'ten başlayarak 90. gün sonunda yalnızca %1,32'ye kadar yükselmiştir. Bu sonuçlar, özellikle klinoptilolit (zeolit) ile kombine edildiğinde vakum kurutmanın, nem alımına karşı yüksek direnç sağlayan toz yapıları oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Zeolitin düşük higroskopik özelliği ile vakum kurutma sırasında gelişen kompakt yapı, yüksek bağıl nem koşullarında bile su buharı absorpsiyonunu minimumda tutmaktadır. Bu özellik, depolama sırasında topaklanma, esmerleşme veya mikrobiyal büyümeyi önleyerek tozun fiziksel stabilitesini artırması açısından faydalı olmakla birlikte, çok düşük nem seviyeleri hücresel stres ve dehidrasyona neden olarak probiyotik canlılığının korunmasını zorlaştırabilmektedir (Carvalho vd., 2004; Santivarangkna vd., 2007b).

LZ örneği, düşük ve hafif dalgalanan su absorpsiyonu göstermiştir; başlangıçta %2,61'den %1,84'e düşmüş, 90. günde tekrar %2,70'e yükselmiştir. Bu desen, ortam ile orta düzeyde bir nem alışverişine işaret etmektedir. Klinoptilolit varlığı su alımını sınırlarken, dondurarak kurutma işleminde oluşan gözeneklilik zaman içinde kademeli absorpsiyona izin vermiştir. LZ, süt tozu örneklerine kıyasla daha yüksek nem direnci gösterirken, ancak vakum kurutulmuş zeolite örneğine göre biraz daha yüksek absorpsiyon ile depolama süresince dengeli bir stabilite sergilemiştir. Tripathi ve Giri, (2014) tarafından yapılan çalışmada, polisakkarit veya zeolit bazlı koruyucularla kurutulan probiyotik ürünlerin, protein içeren ortamlara göre daha düşük su absorpsiyon değerleri sergilediği rapor edilmiştir.

LK örneği, 60. güne kadar %4,58'den %3,35'e hafif bir düşüş, ardından 90. günde %3,62'ye küçük bir artışla orta düzeyde ve nispeten stabil nem içeriği göstermiştir. Bu

durum, zeolitin koruyucu etkisi ile aşırı nem alımını sınırladığı, süt tozu bileşeninin ise çevresel nemle bir miktar etkileşime izin verdiği dengeli bir absorpsiyon davranışını işaret etmektedir.

Buna karşılık VK örneği düzensiz su absorpsiyonu sergilemiş; 30. günde %3,94'ten %1,32'ye keskin bir düşüş, 60. günde %2,84'e artış ve 90. günde tekrar %1,73'e azalma göstermiştir. Bu dalgalanmalar, vakum kurutma işlemi sırasında oluşan toz matrisindeki yapısal yeniden düzenlenmelere bağlanabilir; bu da depolama süresince malzemenin nem ile etkileşimini etkileyebilir.



Şekil 4.8. Depolama süresince *B. bifidum* kültürlerinin su absorpsiyon değişimleri

4.6. Kurutulmuş Kültürlerde pH Değişimi

pH, probiyotik bakterilerin işleme ve depolama sırasında hayatta kalması ve fizyolojik stabilitealarının korunmasında etkili olan temel bir parametredir (Tripathi ve Giri, 2014). Bu çalışmada, tüm formülasyonlarda pH ölçümleri 0., 30., 60. ve 90. günlerde gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Süt tozu içeren örneklerde pH dengesinin korunması büyük önem taşımaktadır, çünkü aşırı asidik koşullar, *B. bifidum*'un canlılığına ve metabolik aktivitesi üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir (Saarela vd., 2000). Zeolit içeren örneklerde ise klinoptilolit mineralinin, yüksek tamponlama kapasitesi sayesinde pH dalgalanmalarını dengeleyici etki gösterdiği bildirilmektedir (Mastinu vd., 2019). Süt tozu ve klinoptilolit birlikte kullanıldığı kombinasyon formülasyonlarında ise, organik ve mineral bileşenlerin etkileşimiyle daha karmaşık bir ortam oluşmaktadır. Bu kombinasyon, hem klinoptilolit tamponlayıcı etkisi hem de süt tozunun sağladığı besinsel öğeler sayesinde, probiyotikler için daha

stabil bir mikroçevre sağlayabilmektedir (Mastinu vd., 2019; Santivarangkna vd., 2007a). Bu nedenle, pH takibi yalnızca ürünün asit-baz dengesini değerlendirmekle kalmamakta; aynı zamanda, taşıyıcı bileşenlerin bakterileri kurutma ve depolama süreçlerinde ne ölçüde koruyabildiğini değerlendirmek açısından da önem arz etmektedir. Elde edilen bulgular, probiyotik canlılığını ve fonksiyonelliğini depolama süresince korumaya yönelik formülasyonların geliştirilmesi açısından önemli bilgiler sunmaktadır.

Çizelge 4.7. Kurutulmuş *B.bifidum* kültürlerine ait pH değerleri[†]

	Depolama süresi (gün)				
	0	30	60	90	Ortalama
LS	6,90±0,03 ^{aE}	6,51±0,18 ^{bE}	6,90±0,20 ^{aD}	6,49±0,03 ^{bC}	6,70±0,24
VS	7,48±0,02 ^{aC}	7,00±0,09 ^{bCD}	7,45±0,05 ^{aBC}	7,41±0,14 ^{aB}	7,33±0,22
LZ	8,53±0,03 ^{aB}	8,56±0,32 ^{aA}	8,34±0,05 ^{aA}	8,29±0,05 ^{aA}	8,43±0,19
VZ	8,77±0,14 ^{aA}	8,05±0,05 ^{bB}	8,27±0,16 ^{bA}	8,09±0,10 ^{bA}	8,30±0,32
LK	7,13±0,03 ^{bD}	7,33±0,14 ^{bC}	7,61±0,07 ^{aB}	7,13±0,09 ^{bB}	7,30±0,22
VK	7,24±0,06 ^{abD}	6,77±0,06 ^{bDE}	7,23±0,10 ^{abC}	7,42±0,36 ^{aB}	7.17

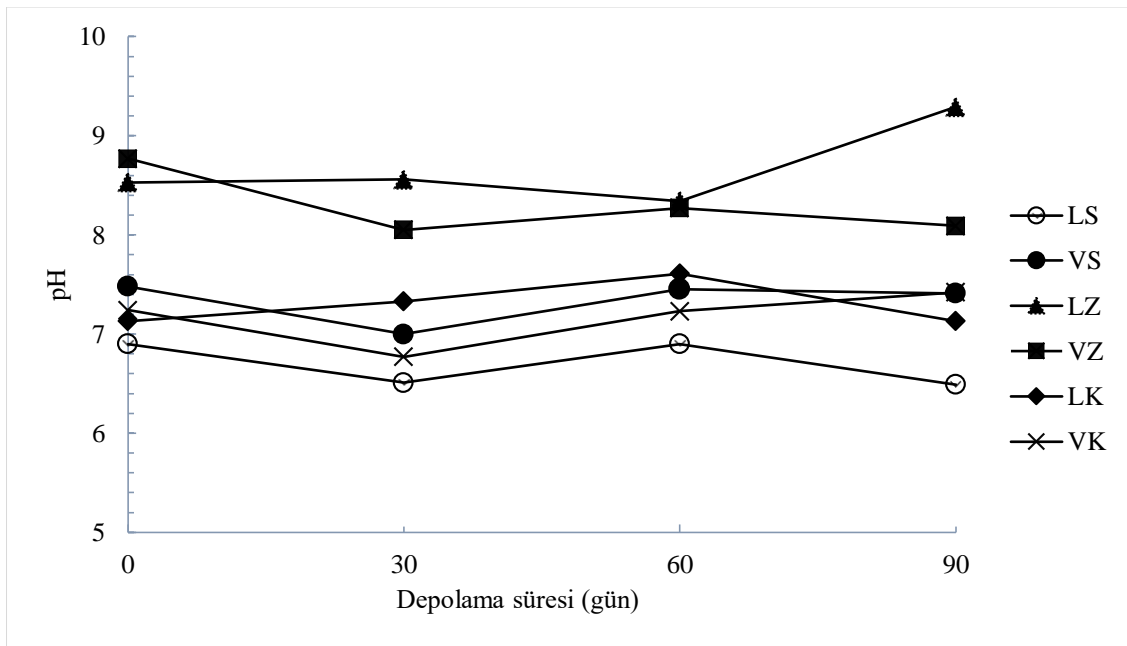
[†]Ortalama ± standart sapma. Aynı satırdaki farklı küçük harfler (a–c) ve aynı sütündeki farklı büyük harfler (A–F) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p < 0,05). L: Liyofilizasyon, V: Vakum kurutma, S: Süt tozu, Z: Zeolit, K: Süt-zeolit karışımı

LS örneklerinde, pH değeri 0. günde 6,90 olarak ölçülmüş, 30. günde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşle 6,51'e gerilemiştir (p < 0,05). 60. günde 6,90'a yükselen pH, 90. günde yeniden azalarak 6,49'a düşmüştür. Bu tür pH dalgalanmaları, kurutma sonrasında bile süt matrisi içinde düşük düzeyli devam eden metabolik aktivite veya protein hidrolizi gibi faktörlerle ilişkili olabilir (Khem vd., 2016). VS örnekleri ise daha yüksek ve görece stabil bir pH profili sergilemiştir. Başlangıç pH'ı 7,48 iken, 30. günde anlamlı şekilde azalarak 7,00'a düşmüştür; ardından 60. ve 90. günlerde sırasıyla 7,45 ve 7,41 değerlerinde ölçülmüştür. Vakum kurutma işleminin, süt bileşenlerinde pH düşüşüne neden olabilecek rezidüel enzimatik veya mikrobiyal süreçleri baskılaması, bu stabilitenin sağlanmasına katkı sağlamış olabilir. Bununla birlikte, ilk 30 gündeki anlamlı düşüş, muhtemelen kurutma sonrası gerçekleşen sınırlı düzeydeki biyokimyasal değişimlerden kaynaklanmaktadır.

Dondurularak kurutulmuş zeolit (LZ) örneğinde, pH değerleri 8,34 ile 8,56 arasında değişim göstermiş; tüm ölçüm noktaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$). Bu sonuç, zeolitin yüksek tamponlama kapasitesine ve iyon değişim özelliklerine bağlı olarak, sistemin pH stabilitesini koruyabildiğini ortaya koymaktadır. Klinoptilolitin doğal yapısı, özellikle hafif alkali bir mikroçevre oluşturarak ortamın asidifikasyonunu sınırlandırmış olabilir (Inglezakis vd., 2003; Polatoğlu, 2005).

Buna karşılık vakumla kurutulmuş zeolit (VZ) örneklerinde, pH 0. günde 8,77 olarak ölçülmüş, 30. günde 8,05'e düşerek istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p < 0,05$). Ancak sonraki zaman noktalarında bu değer sabit kalmıştır. Bu erken düşüş, zeolitin yüzeyinde iyon veya metabolit adsorpsiyonuna bağlı bir denge fazını yansıtır olabilir. Sistemin zamanla yeniden stabilize olması, bu etkileşimlerin belirli bir sürede tamamlandığını düşündürmektedir.



Şekil 4.9. Depolama boyunca *B. bifidum* kültürlerinde pH değişimi

Süt tozu ve zeolitin birlikte kullanıldığı kombinasyon matrislerinde pH davranışı daha karmaşık bir seyir izlemiştir. Dondurularak kurutulmuş karışım (LK) örneğinde, pH değeri başlangıçta 7,13 iken, 60. günde 7,61'e yükselmiş; 90. günde ise tekrar 7,13'e düşerek dalgalı bir profil sergilemiştir. Bu geçici artış, süt ve zeolit bileşenleri arasında geçici olarak tamponlama kapasitesini artıran veya asit oluşumunu geciktiren sinerjik etkileşimlerden kaynaklanabilir. Vakumla kurutulmuş karışım (VK) örneği ise daha belirgin bir değişkenlik göstermiştir. pH değeri 30. günde 6,77'ye düşmüş, ardından 90. günde 7,42'ye yükselmiştir. Vakumla kurutma işleminin, özellikle koruyucu olarak karbonhidratların kullanıldığı sistemlerde, hücre zarlarında hasara yol açan ve matris içi

etkileşimleri artıran moleküler düzeyde streslere neden olabileceği bilinmektedir (Kubbutat vd., 2021; Santivarangkna vd., 2007a). Ayrıca, zeolitin iyon değişim kapasitesine bağlı olarak kontrollü iyon salımı yoluyla pH üzerinde etkili olduğu literatürde açıkça ortaya konmuştur (Berber-Mendoza vd., 2006; Polatoğlu, 2005). Bu mekanizmalar birlikte değerlendirildiğinde, bu çalışmadaki, 90 günlük depolama süresi boyunca gözlenen pH dalgalanmaları ve ortamın kimyasal dengesindeki sürekli değişim açıklanabilir.

4.7. Kurutulmuş Kültürlerde Titre Edilebilir Asitlik (TTA) Değerleri

TTA (Toplam Titre edilebilir Asitlik), probiyotik formülasyonlarda toplam asit içeriğinin değerlendirmek amacıyla kullanılan önemli bir parametredir. Bu ölçüm, işleme ve depolama süreçleri boyunca probiyotik bakterilerin metabolik aktivitesine ilişkin dolaylı ancak kritik bilgiler sunar. pH, yalnızca belirli bir anda ortamda bulunan serbest hidrojen iyonu konsantrasyonunu yansıtırken, TTA bakteriyel fermantasyonla üretilen tüm organik asit türlerini de kapsayan daha kapsamlı bir ölçümdür. Bu özelliği sayesinde TTA, pH değişiminde hemen fark edilemeyen ancak zaman içerisinde ürün kalitesi ve mikrobiyal stabilite üzerinde etkili olabilecek asidik birikimlerin izlenmesine olanak tanımaktadır (Champagne vd., 2011). Probiyotik ürünlerde TTA'daki artış, genellikle devam eden bakteriyel metabolizmanın bir göstergesidir; bu durum ürünün lezzetini, raf ömrünü ve probiyotik canlılık düzeyi üzerinde doğrudan etkili olabilmektedir. Bu nedenle, TTA takibi, süt klinoptilolit veya bunların kombinasyonlarını içeren taşıyıcı matrislerin tamponlama kapasitelerinin karşılaştırılması açısından da önem taşımaktadır. Bu değerlendirme, formülasyonun asidifikasyonu ne ölçüde sınırlandırabildiğini göstererek probiyotik fonksiyonelliğin korunmasına katkı sağlar. Dolayısıyla, TTA ölçümleri, kurutma süreçlerinin optimize edilmesinde ve probiyotik kültürlerin stabilitesinin sağlanmasında değerli bir araç olarak görülmektedir. Kurutulmuş *B. bifidum* kültürlerine ait TTA değerleri Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Dondurularak kurutulmuş süt tozu (LS) örneklerinde, TTA başlangıçta %1,77 ile en yüksek değerlerden birini göstermiştir. 30. günde bu değer istatistiksel olarak anlamlı şekilde %1,46'ya düşmüş ve 60. ile 90. günlerde benzer seviyelerde (%1,46 ve %1,38) kalmıştır ($p < 0,05$). Bu azalma, depolamanın erken döneminde süregelen mikrobiyal veya enzimatik faaliyetlerin zamanla azaldığını, böylece sistemin asit üretimi bakımından daha stabil hâle geldiğini göstermektedir. Benzer eğilimler, fermente süt ürünlerinin

dondurularak kurutulması sonrası yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir (Martínez-Franco vd., 2013).

Çizelge 4.8. Kurutulmuş *B.bifidum* kültürlerine ait toplam titre edilebilir asitlik (TTA) değerleri (%)[†]

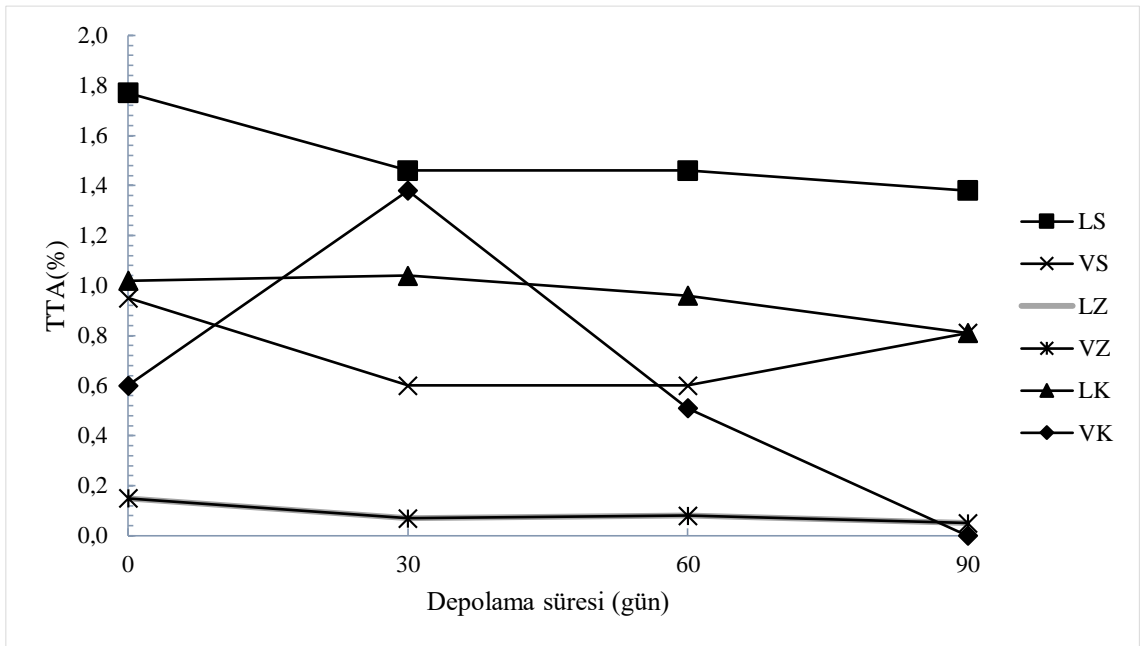
	Depolama süresi (gün)				Ortalama
	0	30	60	90	
LS	1,77±0,11 ^{aA}	1,46±0,07 ^{bA}	1,46±0,07 ^{bA}	1,38±0,03 ^{bA}	1,52±0,17
VS	0,95±0,09 ^{aB}	0,60±0,07 ^{bC}	0,60±0,07 ^{bB}	0,81±0,16 ^{abB}	0,74±0,17
LZ	0,15±0,03 ^{aD}	0,07±0,02 ^{bD}	0,08±0,03 ^{bD}	0,05±0,0 ^{bD}	0,08±0,05
VZ	0,18±0,05 ^{aD}	0,05±0,00 ^{bD}	0,06±0,03 ^{bD}	0,05±0,00 ^{bD}	0,08±0,06
LK	1,02±0,07 ^{aB}	1,04±0,08 ^{aB}	0,96±0,07 ^{abB}	0,81±0,08 ^{bB}	0,96±0,11
VK	0,60±0,09 ^{bC}	1,38±0,03 ^{aA}	0,51±0,03 ^{bcB}	0,42±0,05 ^{cC}	0,73±0,40

[†]Ortalama ± standart sapma. Aynı satırdaki farklı küçük harfler (a–c) ve aynı sütündeki farklı büyük harfler (A–F) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p < 0,05). L: Liyofilizasyon, V: Vakum kurutma, S: Süt tozu, Z: Zeolit, K: Süt-zeolit karışımı

Vakumla kurutulmuş süt tozu (VS) örneklerinde ise TTA başlangıçta daha düşük iken (%0,95); bu değer 30. ve 60. günlerde %0,60'a gerilemiş, 90. günde ise hafif bir artışla %0,81'e yükselmiştir. Bu patern, vakum kurutma işleminin bakteriyel asit üretimini baskılayıcı bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Özellikle bu yöntemde ortamda kalan nem oranının yüksek olması (yaklaşık %9,15), bakterilerin metabolik olarak aktif kalma ihtimalini artırırken, düşük oksijen varlığı mikrobiyal fermentasyonu sınırlandırabilmektedir. 90. gündeki asidite artışı ise, örneklerin ambalaj geçirgenliğine bağlı olarak çevresel nem çekmesi, kısıtlı sayıda canlı bakterinin yeniden metabolik olarak aktive olması ya da matris içerisinde önceden tutulmuş asitlerin zamanla serbest kalması gibi olasılıklarla açıklanabilir. Depolama süresince nemin belirli bir seviyede kalması, biyolojik aktivitenin sınırlı da olsa devam etmesine izin verdiğini göstermektedir (Santivarangkna vd., 2007a).

Tüm formülasyonlar arasında, zeolit bazlı örnekler (LZ ve VZ) depolama süresi boyunca en düşük TTA değerlerini göstermiştir. LZ örneğinde TTA, başlangıçta %0,15 iken 90. gün sonunda %0,05'e kadar azalmıştır. Benzer şekilde, VZ örneğinde %0,18 olan başlangıç değeri yine %0,05'e düşmüş ve her iki örnekte de istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p < 0,05). Ilinskaya vd. (2024), klinoptilolit üzerine immobilize edilmiş probiyotik bakterilerin depolama süresince daha düşük asit üretimi

gösterdiğini ve süt tozu matrislerinde korunan kültürlere göre daha düşük TTA değerlerine sahip olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, Santos vd. (2019), zeolit gibi inorganik taşıyıcılarla formüle edilen probiyotik tozların depolama süresince önemli ölçüde daha düşük asit üretim potansiyeline sahip olduğunu ve bunun başlıca nedenlerinin metabolik aktivitenin sınırlanması ile düşük nem içeriği ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca, Santivarangkna vd. (2007a), yüksek nem tutucu özellikteki organik kurutma matrislerinin (örneğin süt tozu) daha yüksek asit üretimini koruduğunu, inorganik matrislerin ise metabolik aktiviteyi sınırlandırarak TTA seviyelerini düşürdüğünü belirtmiştir.



Şekil 4.10. Depolama boyunca *B. bifidum* kültürlerinde TTA değişimi

Kompozit taşıyıcılarda (süt tozu + klinoptilolit) TTA davranışı daha karmaşık bir profil sergilemiştir. Dondurularak kurutulmuş karışım (LK) örneğinde, TTA değeri %1,02 ile başlamış, 90. gün sonunda %0,81'e kademeli ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşmüştür ($p < 0,05$). Bu düzenli azalma, süt tozunun organik asit üretim potansiyeli ile klinoptilolitin tamponlayıcı ve adsorptif özellikleri arasında dengeli bir etkileşim olduğunu düşündürmektedir. Vakumla kurutulmuş karışım (VK) örneği ise daha değişken bir TTA deseni ortaya koymuştur. Başlangıçta %0,60 olan asidite, 30. günde tüm gruplar arasında en yüksek değer olan %1,38'e ulaşmış, ardından 90. günde %0,42'ye düşerek anlamlı bir azalma göstermiştir. Bu zirve, nem absorpsiyonu veya

matris gevşemesi nedeniyle kalıcı veya geçici olarak yeniden aktive olan bazı metabolik aktivitelerin varlığına işaret ediyor olabilir. Bu tür bir yeniden aktivasyon, hem önceden tutulmuş hücre içi organik asitlerin serbest kalmasına hem de hayatta kalan hücrelerin sınırlı fermantasyonla yeni asit üretimine yol açmış olabilir. Ancak, takip eden süreçte gözlenen belirgin TTA azalması, klinoptilolit tamponlama ve iyon değişim kapasitesinin bu etkiyi sınırladığı, ayrıca vakumla kurutma sırasında oluşan mikroçevrenin stabilizasyonu desteklediği yönünde değerlendirilebilir. Bu sonuçlar, kompozit taşıyıcı sistemlerin pH ve asitlik açısından zamanla dengeleyici bir davranış sergileyebileceğini göstermektedir.

Klinikoptilolit ve süt tozu kombinasyonu ile kurutulmuş probiyotik kültürlerde doğrudan TTA ölçümünü raporlayan çalışma sayısı sınırlı olmakla birlikte, mevcut literatür gözlemlenen eğilimleri desteklemektedir. Organik taşıyıcılar (örneğin süt tozu) genellikle orta düzeyde asit üretimini sürdürürken, inorganik taşıyıcılar (örneğin zeolit) düşük nem içeriği ve metabolik kısıtlama yoluyla asitlik artışını sınırlandırmaktadır (Ilinskaya vd., 2024; Santivarangkna vd., 2007a; Santos vd., 2019).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada, dondurarak kurutma ve vakum kurutma yöntemleriyle kurutulan *Bifidobacterium bifidum* kültürlerinde, farklı taşıyıcı matrislerin (yağsız süt tozu, klinoptilolit-zeolit ve bunların kombinasyonlarının) bakteri canlılığı, fizikokimyasal stabilitesi depolama sürecindeki davranışları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmanın temel amacı, uygun taşıyıcı ve kurutma yöntemi kombinasyonları aracılığıyla probiyotik canlılığını maksimum düzeyde korumak ve elde edilen toz ürünlerin depolama stabilitesini artırmaktır. Elde edilen bulgular, incelenen taşıyıcı matrislerin kurutma ve depolama süreçleri boyunca *B. bifidum* canlılığının korunmasındaki etkili rollerini ve olası koruyucu mekanizmalarını ortaya koyarak literatüre özgün katkılar sağlamaktadır.

Sonuçlar, *B. bifidum* canlılığının korunmasında dondurarak kurutma yönteminin, vakum kurutmaya göre daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle yalnızca süt tozu içeren ve dondurarak kurutulan LS örneği, %0,03 log kob/g gibi son derece düşük bir canlılık kaybı ile en başarılı sonucu vermiştir. Bu bulgu, laktoz ve protein içeriği sayesinde dondurarak kurutma sırasında cam benzeri stabil bir yapı oluşturan süt tozunun üstün kriyoprotektif özelliklerini doğrular niteliktedir. Söz konusu yapı, hücre zarının bütünlüğünü korumakta, osmotik stresin etkilerini azaltmakta ve oksidatif ya da hidrolitik bozunmaları sınırlandırarak hücreyi çevresel stres faktörlerine karşı korumaktadır. Buna karşın, vakum kurutulmuş süt tozu (VS) örneğinde canlılık kaybı 1,39 log kob/g seviyesine ulaşarak belirgin bir düşüş göstermiştir. Bu durum, vakum kurutma işlemi sırasında maruz kalınan termal stresin, süt tozunun koruyucu kapasitesini kısmen azalttığını göstermektedir. Bununla birlikte, her iki yöntemde de süt tozunun varlığı, probiyotik canlılık eşiği olarak kabul edilen 6 log kob/g'nin üzerinde canlılık seviyesinin korunmasını sağlamıştır. Bu da süt tozunun, farklı kurutma koşullarında dahi belirli bir koruyucu etkinliği sürdürebildiğine işaret etmektedir.

Zeolitin tek başına kullanıldığı örneklerde canlılık değerleri, anlamlı ölçüde daha düşük bulunmuştur. Sadece zeolit içeren LZ ve VZ örnekleri, en yüksek canlılık kayıplarını göstermiştir. Özellikle VZ örneğinde canlılık, 8,75 log kob/g'dan 3,36 log kob/g'a gerileyerek 5,39 log birimlik ciddi bir kayıp yaşamıştır. Bu durum, zeolitin inorganik, besin açısından yetersiz yapısının yanı sıra *B. bifidum* için uygun olmayan yüksek alkali mikroçevre (pH ~9,0) yaratma eğiliminin, tek başına koruyucu olarak

kullanımının sınırlamalar getirdiğini ortaya koymaktadır. Zeolitin osmo-koruyucu bileşikler içermemesi ve kurutma esnasında su akışını düzenleyememesi, hücre membran sağlanamamasına ve dehidrasyon kaynaklı stresin önlenememesine neden olmaktadır. Yüksek yüzey alanı, gözeneklilik ve iyon değişim özelliklerine rağmen, fiziksel-kimyasal avantajlar mikroorganizma canlılığının tek başına korunması için yeterli olmamıştır.

Ancak çalışma, zeolitin bu sınırlamalarının süt tozu ile kombinasyon halinde kullanımda önemli ölçüde aşılabileceğini göstermiştir. Hem LK hem de VK örnekleri, yalnızca zeolit içeren formülasyonlara kıyasla anlamlı derecede daha yüksek canlılık değerleri sergilemiştir. Özellikle LK örneği, 0,47 log kob/g gibi düşük canlılık kaybı ve depolama süresince gösterdiği stabil canlılık eğilimi ile LS örneğinden dahi daha üstün bir canlılık koruması sağlamıştır. Bu bulgu, süt tozu ve zeolitin sinerjik bir koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir: süt tozu biyokimyasal koruma ve membran stabilizasyonu sağlarken, zeolit iyon değişimi ve yapısal destek yoluyla nem düzenlemesi ve çevresel stresin tamponlanmasına katkıda bulunmaktadır. Bu sinerji, su aktivitesinin dengelenmesini, matris heterojenitesinin azaltılmasını ve kurutma işleminin homojenliğinin artmasını mümkün kılmaktadır.

Önemli bir diğer gözlem ise, zeolit içeren bazı örneklerde subletal hasar görmüş hücrelerin depolama süresince kısmen iyileşmesi olmuştur. LZ ve VZ örneklerinde, canlılık değerleri ilk iki ayda hafif artış göstermiştir. Bu durum, zeolitin gözenekli yapısı ve nem tamponlama kapasitesi sayesinde, kurutma sonrası hücresel onarımı destekleyen dinamik bir mikroçevre oluşturduğunu düşündürmektedir. Önceki çalışmalar da, kurutma sırasında zarar gören hücrelerin yeterli nem ve membran stabilitesi sağlandığında zamanla yeniden üreme yeteneğini kazandığını veya kültür ortamında çoğalabilir hale geldiğini göstermektedir. Bu bulgu, canlılık takibinin yalnızca kurutma sonrasında değil, tüm depolama sürecini kapsaması gerektiğini vurgulamaktadır.

Fizikokimyasal analizler, mikrobiyolojik bulgularla tutarlılık göstermiştir. Zeolit içeren örnekler, daha düşük nem içeriğine sahip olup, LZ ve VZ örnekleri zeolitin güçlü kurutucu özelliklerini doğrulamıştır. Su absorpsiyon testleri, zeolitin, higroskopik davranışı etkili biçimde sınırladığını ve dolayısıyla topaklanma ya da esmerleşme gibi olumsuz fiziksel değişimleri önlemeye yardımcı olabileceğini göstermiştir. Öte yandan, süt tozu içeren örnekler daha fazla nem tutmasına rağmen, bu nem seviyeleri probiyotik tozlar için güvenli sınırlar içinde kalmıştır. LK örneği, yavaş ve kontrollü nem değişimleri ile yüksek stabilite göstererek olumlu bir nem profili sunarken; VK örneği, vakum

kurutma işlemi sırasında oluşan yapısal yeniden düzenlemeler nedeniyle daha dengesiz bir nem davranışı sergilemiştir.

pH ve toplam titrasyon asitliği (TTA) analizleri, örneklerin mikro ortam koşullarını daha detaylı biçimde ortaya koymuştur. Zeolit içeren örneklerde yüksek ve stabil pH seviyeleri ölçülmüş olup, bu alkali ortam asidofilik *B. bifidum* gibi bakteriler için olumsuz bir etki yaratmıştır. Ancak süt tozu ile kombinasyon halinde kullanılan LK örneğinde pH değerleri daha dengeli kalmıştır. TTA sonuçları, LS ve VK gibi daha nemli örneklerde metabolik aktivitenin sürdüğünü, zeolit içeren örneklerde ise düşük asidite nedeniyle bakteriyel aktivitenin baskılandığını göstermiştir.

FE-SEM görüntüleri, örnekler arasındaki yapısal farklılıkları açıkça ortaya koymuştur. Dondurarak kurutulmuş süt tozu çeren örneklerde, gözenekli yapının korunduğu ve hücrelerin bu yapı içerisinde iyi şekilde muhafaza edildiği gözlenmiştir. Buna karşılık, vakum kurutulmuş örneklerde daha sıkışmış bir yapı ve azalmış gözeneklilik dikkat çekmiştir. Zeolit içeren örnekler ise, kristalize ve pürüzlü yüzey özellikleri sergilemiş; bu yüzeylerde belirgin bakteriyel yapılar izlenememiştir. Öte yandan, süt tozu ve zeolitin birlikte kullanıldığı LK örneği, bakterilerin de gözlemlenebildiği homojen ve kompozit bir yapı sunmuş; bu durum, iki taşıyıcının birlikte kullanımının yapısal bütünlük ve koruyuculuk açısından daha etkili bir koruma sağladığını düşündürmektedir.

Genel olarak, bu sonuçlar klinoptilolitin süt tozu ile birlikte kullanımının, tek başına kullanımına veya yalnızca süt tozu içeren sistemlere kıyasla daha üstün sonuçlar sağladığını göstermektedir. Dondurarak kurutma sürecinde süt tozu, hem besinsel destek sağlayarak hem de cam benzeri koruyucu bir yapı oluşturarak bakteriyel canlılığın korunmasına katkıda bulunmuştur. Zeolit ise, nem kontrolü, pH dengesinin sağlanması ve kurutma sonrası stabil bir mikroçevrenin korunması açısından önemli rol oynamıştır. Bu kombinasyon, hücre canlılığının korunmasına ek olarak, probiyotiklerin işleme ve depolama süreci boyunca işlevselliğini sürdürebilmesi için kritik öneme sahip olan pH ve nem gibi çevresel parametrelerin stabil kalmasına olanak tanımaktadır.

Sonuç olarak, *B. bifidum* gibi probiyotiklerin etkin biçimde korunması, yalnızca kurutma yöntemine değil, aynı zamanda seçilen taşıyıcı materyallerin niteliklerine de doğrudan bağlıdır. Dondurarak kurutma hâlen en etkili ve güvenilir teknik olarak öne çıksa da, farklı fizikokimyasal özellikler taşıyan süt tozu ve zeolit gibi koruyucuların kombinasyonu, bu yöntemin performansını önemli ölçüde artırabilmektedir. Protein ve mineral bazlı taşıyıcıların birlikte kullanımı, özellikle uzun raf ömrü ve kalite tutarlılığı

gerektiren endüstriyel uygulamalar için daha dayanıklı ve etkin probiyotik ürünlerin geliştirilmesine olanak tanıyan umut vadeden bir yaklaşımdır. Gelecekte, süt tozu ve zeolitin farklı oranlarda kombinasyonları, çeşitli probiyotik suşlarla birlikte değerlendirilerek; aynı zamanda gerçekçi ambalajlama ve taşıma koşulları altındaki canlılık ve stabilite performansları araştırılmalıdır. Bu tür araştırmalar, probiyotik ürünlerin üretimden tüketime kadar sağlık faydalarının sürdürülebilir biçimde korunması açısından kritik öneme sahiptir.

5.2. Öneriler

Bu çalışmada, klinoptilolit ve süt tozu sabit oranlarda kullanılmış olmakla birlikte, gelecekte farklı oran kombinasyonlarının sistematik olarak incelenmesi, *B. bifidum* canlılığını en yüksek düzeyde koruyabilecek optimum formülasyonun belirlenmesine katkı sağlayabilir. Özellikle bu taşıyıcıların oranları arasındaki sinerjik etkileşimlerin değerlendirilmesi, koruyucu etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına olanak tanıyacaktır.

Bunun yanı sıra, elde edilen kurutulmuş kültürlerin simüle edilmiş gastrointestinal koşullarda (mide asidi ve safra tuzlarına maruz kalma gibi) dayanıklılıklarının test edilmesi, probiyotiklerin sindirim sistemi boyunca hayatta kalma kapasiteleri ve fonksiyonel etkinlikleri hakkında daha gerçekçi ve uygulamaya yönelik veriler sağlayacaktır. Bu tür çalışmalar, probiyotik ürünlerin insan sağlığı üzerindeki etkilerini daha doğru biçimde öngörebilmek açısından büyük önem taşımaktadır.

İlerleyen araştırmalarda, farklı taşıyıcı materyallerin (örneğin polisakkarit bazlı biyopolimerler, protein türevleri veya doğal lifler) denenmesi ve bu materyallerin *B. bifidum* üzerindeki koruyucu etkilerinin karşılaştırılması, formülasyon çeşitliliğini ve uygulama esnekliğini artırabilir. Ayrıca, sprey kurutma, refraktif pencere kurutma veya mikrodalga destekli kurutma gibi alternatif ve endüstriyel olarak daha hızlı ve ekonomik olabilecek kurutma tekniklerinin değerlendirilmesi, hem ürün kalitesini hem de üretim verimliliğini optimize etmeye yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesini mümkün kılabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları üzerine inşa edilecek daha kapsamlı ve disiplinler arası çalışmalar, probiyotik stabilitesini artıran, teknolojik açıdan uygulanabilir ve endüstriyel ölçekte sürdürülebilir çözümlerin geliştirilmesine zemin hazırlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(5), 240-251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis* (18. bs). Association of Official Analytical Chemists.
- Berber-Mendoza, M. S., Leyva-Ramos, R., Alonso-Davila, P., Mendoza-Barron, J., & Diaz-Flores, P. E. (2006). Effect of pH and temperature on the ion-exchange isotherm of Cd(II) and Pb(II) on clinoptilolite. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *81*(6), 966-973. <https://doi.org/10.1002/jctb.1483>
- Berninger, T., Mitter, B., & Preininger, C. (2017). Zeolite-based, dry formulations for conservation and practical application of Paraburkholderia phytofirmans PsJN. *Journal of Applied Microbiology*, *122*(4), 974-986.
- Bocchio, F., Mancabelli, L., Milani, C., Lugli, G. A., Tarracchini, C., Longhi, G., Conto, F. D., Turroni, F., & Ventura, M. (2024). Compendium of Bifidobacterium-based probiotics: Characteristics and therapeutic impact on human diseases. *Microbiome Research Reports*, *4*(1), 2. <https://doi.org/10.20517/mrr.2024.52>
- Carvalho, A. Sofia, Silva, J., Teixeira, P., & Ho, P. (2004). Effects of Various Sugars Added to Growth and Drying Media upon Thermotolerance and Survival throughout Storage of Freeze-Dried lactobacillus delbrueckii ssp. *Biotechnology Progress*, *20*(1), 248-254. <https://doi.org/10.1021/bp034165y>
- Cataldo, E., Salvi, L., Paoli, F., Fucile, M., Masciandaro, G., Manzi, D., Masini, C. M., & Mattii, G. B. (2021). Application of Zeolites in Agriculture and Other Potential Uses: A Review. *Agronomy*, *11*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081547>
- Celik, O. F., & O'Sullivan, D. J. (2013). Factors influencing the stability of freeze-dried stress-resilient and stress-sensitive strains of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, *96*(6), 3506-3516. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6327>
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, *149*(3), 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>
- Chen, J., Chen, X., & Ho, C. L. (2021). Recent Development of Probiotic Bifidobacteria for Treating Human Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 770248. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.770248>
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Stanton, G. F., & Fitzgerald C., C. (2004). *Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances—Corcoran—2004—Journal of Applied Microbiology—Wiley Online Library*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02219.x>
- Cukrowska, B., Bierła, J. B., Zakrzewska, M., Klukowski, M., & Maciorkowska, E. (2020). The Relationship between the Infant Gut Microbiota and Allergy. The Role of Bifidobacterium breve and Prebiotic Oligosaccharides in the Activation

- of Anti-Allergic Mechanisms in Early Life. *Nutrients*, 12(4), 946. <https://doi.org/10.3390/nu12040946>
- Dantas, A., Verruck, S., de Liz, G. R., Hernandez, E., & Prudencio, E. S. (2021). Lactose-free skim milk and prebiotics as carrier agents of Bifidobacterium BB-12 microencapsulation: Physicochemical properties, survival during storage and in vitro gastrointestinal condition behaviour. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2132-2145. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14823>
- Eroglu, N. (2014). A review: Insecticidal potential of Zeolite (Clinoptilolite), toxicity ratings and general properties of Turkish Zeolites. *Proceedings of the 11th international working conference on stored product protection*, 755-767.
- Eroglu, N., Emekci, M., & Athanassiou, G. (2017). *Applications of natural zeolites on agriculture and food production—Eroglu—2017—Journal of the Science of Food and Agriculture—Wiley Online Library*. <https://doi.org/full/10.1002/jsfa.8312>
- Ersoy, B., Bahri Ersoy, & Çelik, M. S. (2002). Electrokinetic Properties of Clinoptilolite With Mono- and Multivalent Electrolytes. *Microporous and Mesoporous Materials*, 55(3), 305-312. [https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(02\)00433-X](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(02)00433-X)
- Foerst, P., & Kulozik, U. (2012). Modelling the Dynamic Inactivation of the Probiotic Bacterium *L. Paracasei* ssp. *Paracasei* During a Low-Temperature Drying Process Based on Stationary Data in Concentrated Systems. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2419-2427. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0560-4>
- Foster, K. D., Bronlund, J. E., & (Tony) Paterson, A. H. J. (2005). The prediction of moisture sorption isotherms for dairy powders. *International Dairy Journal*, 15(4), 411-418. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.003>
- Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44(5), 1127-1149. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.053>
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., & Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543-547. <https://doi.org/10.1038/nature09646>
- Gavzy, S. J., Kensiski, A., Lee, Z. L., Mongodin, E. F., Ma, B., & Bromberg, J. S. (2023). Bifidobacterium mechanisms of immune modulation and tolerance. *Gut Microbes*, 15(2), 2291164. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2291164>
- Grzeszczak, J., Wróblewska, A., Kiełbasa, K., Koren, Z., & Michalkiewicz, B. (2023). *The Application of Clinoptilolite as the Green Catalyst in the Solvent-Free Oxidation of α -Pinene with Oxygen*. Sustainability. <https://doi.org/10.3390/su151310381>
- He, B.-L., Xiong, Y., Hu, T.-G., Zong, M.-H., & Wu, H. (2023). Bifidobacterium spp. as functional foods: A review of current status, challenges, and strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(26), 8048-8065. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2054934>
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(4), 291-311. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499801>

- Hubner, P., Donati, N., Quines, L. K. de M., Tessaro, I. C., & Marcilio, N. R. (2020). Gelatin-based films containing clinoptilolite-Ag for application as wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, *107*, 110215. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110215>
- Iane, M., Souza, L. M., García-Villén, F., Visera, C., & Pergher, S. B. (2023). Zeolites as Ingredients of Medicinal Products. *15*(5), 1352. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051352>
- IDF. (2004). *Cheese and processed cheese—Determination of the total solids content*. International Dairy Federation.
- Ilinskaya, O., Galeeva, A., Glukhov, M., Kurdy, W., Zelinikhin, P., Kolpakov, A., Yakovleva, G., & Lopatin, O. (2024). New Design and Characteristics of Probiotics Immobilized on a Clinoptilolite-Containing Tuff. *Scientia Pharmaceutica*, *92*(3), 46. <https://doi.org/10.3390/scipharm92030046>
- İnan, S., & Hiçsönmez, Ü. (2022). Adsorption Studies of Radionuclides by Turkish Minerals: A Review. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, *9*(2), 579-600. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.1074651>
- Inglezakis, V. J., & Grigoropoulou, H. (2004). Effects of operating conditions on the removal of heavy metals by zeolite in fixed bed reactors. *Journal of Hazardous Materials*, *112*(1), 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.02.052>
- Inglezakis, V. J., Loizidou, M. D., & Grigoropoulou, H. P. (2003). Ion exchange of Pb(2+), Cu(2+), Fe(3+), and Cr(3+) on natural clinoptilolite: Selectivity determination and influence of acidity on metal uptake. *Journal of Colloid and Interface Science*, *261*(1), 49-54. [https://doi.org/10.1016/s0021-9797\(02\)00244-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9797(02)00244-8)
- Jarosz, R., Szerement, J., Gondek, K., & Mierzwa-Hersztek, M. (2022). The use of zeolites as an addition to fertilisers – A review. *Catena*, *213*, 106125. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2022.106125>
- Jouppila, K., & Roos, Y. H. (1994). Water Sorption and Time-Dependent Phenomena of Milk Powders. *Journal of Dairy Science*, *77*(7), 1798-1808. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77121-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77121-6)
- Kelly, G. M., O'Mahony, J. A., Kelly, A. L., & O'Callaghan, D. J. (2014). Physical characteristics of spray-dried dairy powders containing different vegetable oils. *Journal of Food Engineering*, *122*, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.028>
- Khem, S., Bansal, V., Small, D. M., & May, B. K. (2016). Comparative influence of pH and heat on whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum* A17 during spray drying. *Food Hydrocolloids*, *54*, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.029>
- Kraljević Pavelić, S., Simović Medica, J., Gumbarević, D., Filošević, A., Pržulj, N., & Pavelić, K. (2018). Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applications in vivo. *Frontiers in pharmacology*, *9*, 1350 <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01350>
- Król, M., Dechnik, J., Szymczak, P., Handke, B., Szumera, M., & Stoch, P. (2024). Thermal Behavior of Clinoptilolite. *Crystals*, *14*(7), 646. <https://doi.org/10.3390/cryst14070646>

- Kubbutat, P., Kulozik, U., & Dombrowski, J. (2021). Foam Structure Preservation during Microwave-Assisted Vacuum Drying: Significance of Interfacial and Dielectric Properties of the Bulk Phase of Foams from Polysorbate 80–Maltodextrin Dispersions. *Foods*, *10*(6), 1163. <https://doi.org/10.3390/foods10061163>
- 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). 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>
- Lee, J.-H., & O’Sullivan, D. J. (2010). Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *74*(3), 378-416. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00004-10>
- Letona, A., Ahn, S., An, S., Yun, D., Kim, Y.-R., Muralles, M., & Chung, D. (2023). High-Shear Granulation of Hygroscopic Probiotic-Encapsulated Skim Milk Powder: Effects of Moisture-Activation and Resistant Maltodextrin. *Pharmaceuticals*, *16*(2), 217. <https://doi.org/10.3390/ph16020217>
- Lim, H. J., & Shin, H. S. (2020). Antimicrobial and Immunomodulatory Effects of Bifidobacterium Strains: A Review. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(12), 1793-1800. <https://doi.org/10.4014/jmb.2007.07046>
- Mahdi, L. H., Auda, I. G., Ali, I. M., Alsaadi, L. G., & Zwain, L. A. H. (2018). Antibacterial activity of a novel characterized and purified bacteriocin extracted from Bifidobacterium adolescentis. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, *29*(2), 73. <https://doi.org/10.1097/MRM.000000000000128>
- Margeta, K., Logar, N. Z., Šiljeg, M., & Farkas, A. (2013). Natural Zeolites in Water Treatment – How Effective is Their Use. İçinde *Water Treatment* (ss. 81-112). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/50738>
- Martínez-Franco, R., Moliner, M., Yun, Y., Sun, J., Wan, W., Zou, X., & Corma, A. (2013). Synthesis of an extra-large molecular sieve using proton sponges as organic structure-directing agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(10), 3749-3754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220733110>
- Mastinu, A., Kumar, A., Maccarinelli, G., Bonini, S., Premoli, M., Aria, F., Gianoncelli, A., & Memo, M. (2019). *Zeolite Clinoptilolite: Therapeutic Virtues of an Ancient Mineral*. <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/8/1517>
- Mattarelli, P., & Biavati, B. (2018). Species in the Genus *Bifidobacterium*. İçinde P. Mattarelli, B. Biavati, W. H. Holzapfel, & B. J. B. Wood (Ed.), *The Bifidobacteria and Related Organisms* (ss. 9-48). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805060-6.00002-8>
- Meena, K. K., Taneja, N. K., Jain, D., & Ojha, A. (2024). Optimization and production of dairy-cereal grain-based probiotic beverage powder and its probiotic survivability under simulated gastric and pancreatic conditions. *Discover Food*, *4*(1), 30. <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00099-3>
- Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C., & Ross, R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, *106*(4), 1406-1416. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.076>

- Michalev, T., Markovska, I., & Yaneva, S. (2016). Wastewater treatment with natural zeolite of the clinoptilolite type. *Proceedings of University of Russe 'Angel Kanchev, 55(10.1)*, 390-400.
- Miller, J. G., Wax, M. J., Allen, L. B., Durham, D. R., & Chmurny, A. B. (1994, Haziran 29). *Zeolite support for bacteria and microorganisms useful in the biotreatment of aqueous waste streams*. WR Grace and Co Conn. <https://patents.google.com/patent/EP0603989A2/en>
- Misaelides, P. (2011). Application of natural zeolites in environmental remediation: A short review. *Microporous and Mesoporous Materials, 144(1)*, 15-18. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2011.03.024>
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods, 66(2)*, 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Mumpton, F. A. (1999). La roca magica: Uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(7)*, 3463-3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3463>
- Mysore Saiprasad, S., Moreno, O. G., & Savaiano, D. A. (2023). A Narrative Review of Human Clinical Trials to Improve Lactose Digestion and Tolerance by Feeding Bifidobacteria or Galacto-Oligosacharides. *Nutrients, 15(16)*, 3559. <https://doi.org/10.3390/nu15163559>
- O'Callaghan, A., & van Sinderen, D. (2016). Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology, 7*, 925. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00925>
- Osborne, M. G., Geiger, C. J., Corzett, C. H., Kram, K. E., & Finkel, S. E. (2021). Removal of Toxic Volatile Compounds in Batch Culture Prolongs Stationary Phase and Delays Death of Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology, 87(24)*, e01860-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01860-21>
- Oyku, B. (2017). Technologic Tests of Turkey-Gordes Zeolite Minerals. *Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering, 5*, 252-265.
- Pabiś Mazgaj, E., Gawenda, T., Pichniarczyk, p., & Stempkowska, A. (2021). Mineral Composition and Structural Characterization of the Clinoptilolite Powders Obtained from Zeolite-Rich Tuffs. *Minerals, 11(10)*, 1030.
- Patil, M., Khedkar, C., Chavan, C., & Patil, P. (2016). Studies on physico-chemical properties of skim milk powder sold in Maharashtra. *Asian Journal of Dairy and Food Research, 35(4)*, 261-269. <https://doi.org/10.18805/ajdfr.v35i4.6623>
- Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal, 14(6)*, 505-515. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.008>
- Polat, E., Karaca, M., Demir, H., & Onus, A. N. (2004). Use of natural zeolite (clinoptilolite) in agriculture. *Journal of fruit and ornamental plant research, 12(1)*, 183-189.
- Polatoğlu, İ. (2005). Chemical behaviour of clinoptilolite rich natural zeolite in aqueous medium. Yüksek Lisans Tezi, *İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü*, İzmir. <https://grcris.iyte.edu.tr/bitstream/11147/3358/1/T000352.pdf>

- Rajanala, K., Kumar, N., & Chamallamudi, M. R. (2021). Modulation of Gut-Brain Axis by Probiotics: A Promising Anti-depressant Approach. *Current Neuropharmacology*, *19*(7), 990-1006. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666201215142520>
- Ramirez-Olea, H., Herrera-Cruz, S., & Chavez-Santoscoy, R. A. (2024). Microencapsulation and controlled release of *Bacillus clausii* through a novel non-digestible carbohydrate formulation as revolutionizing probiotic delivery. *Heliyon*, *10*(2), e24923. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24923>
- Raskov, H., Burcharth, J., Pommegaard, H.-C., & Rosenberg, J. (2016). Irritable bowel syndrome, the microbiota and the gut-brain axis. *Gut Microbes*, *7*(5), 365-383. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1218585>
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., & Sánchez, B. (2011). How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. *Genes & Nutrition*, *6*(3), 307-318. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0207-5>
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, *84*(3), 197-215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.-L., Sigvart-Mattila, P., & Mättö, J. (2006). Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, *16*(12), 1477-1482. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.007>
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x>
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2007b). Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. *Biotechnology Progress*, *23*(2), 302-315. <https://doi.org/10.1021/bp060268f>
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P., & Wenning, M. (2007a). Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(3), 748-756. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03123.x>
- Santos, M. S., Estevinho, L. M., Carvalho, C. A. L., Morais, J. S., Conceição, A. L. S., Paula, V. B., Magalhães-Guedes, K., & Almeida, R. C. C. (2019). Probiotic Yogurt with Brazilian Red Propolis: Physicochemical and Bioactive Properties, Stability, and Shelf Life. *Journal of Food Science*, *84*(12), 3429-3436. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14943>
- Savedboworn, W., Teawsomboonkit, K., Surichay, S., Riansa-ngawong, W., Rittisak, S., Charoen, R., & Phattayakorn, K. (2018). Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Food Science and Biotechnology*, *28*(3), 795-805. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0523-x>

- Schlienger de Alba, B. N., & Espinosa Andrews, H. (2024). Benefits and Challenges of Encapsulating Bifidobacterium Probiotic Strains with Bifidogenic Prebiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 16(5), 1790-1800.
- Schuck, P. (2013). 17—Dairy powders. İçinde B. Bhandari, N. Bansal, M. Zhang, & P. Schuck (Ed.), *Handbook of Food Powders* (ss. 437-464). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857098672.3.437>
- Senila, L., Hoaghia, A., Moldovan, A., Török, I. A., Kovacs, D., Simedru, D., Tomoiag, C. H., & Senila, M. (2022). The Potential Application of Natural Clinoptilolite-Rich Zeolite as Support for Bacterial Community Formation for Wastewater Treatment. *Materials*, 15(10), 3685. <https://doi.org/10.3390/ma15103685>
- Shokri, Z., Fazeli, M. R., Ardjmand, M., Mousavi, S. M., & Gilani, K. (2015). Factors affecting viability of Bifidobacterium bifidum during spray drying. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40199-014-0088-z>
- Shrestha, A. K., Howes, T., Adhikari, B. P., & Bhandari, B. R. (2007). Water sorption and glass transition properties of spray dried lactose hydrolysed skim milk powder. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1593-1600. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.003>
- Sibanda, T., Marole, T. A., Thomashoff, U. L., Thantsha, M. S., & Buys, E. M. (2024). Bifidobacterium species viability in dairy-based probiotic foods: Challenges and innovative approaches for accurate viability determination and monitoring of probiotic functionality. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1327010. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1327010>
- Storey, B. T., Noiles, E. E., & Cryobiology, K. A. (1998). Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 37(1), 46-58.
- Stuivenberg, G. A., Burton, J. P., Bron, P. A., & Reid, G. (2022). Why Are Bifidobacteria Important for Infants? *Microorganisms*, 10(2), 278. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020278>
- Szatmári, D., Sárkány, P., Kocsis, B., Nagy, T., Miseta, A., Barkó, S., Longauer, B., Robinson, R. C., & Nyitrai, M. (2020). Intracellular ion concentrations and cation-dependent remodelling of bacterial MreB assemblies. *Scientific Reports*. 10(1), 12002
- Takil, E., & Kayan, N. (2025). Using Zeolite and Nitrogen Applications in Different Growing Conditions for the Improvement Yield in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Legume Research: An International Journal*, 48(4), 623-632. doi: 10.18805/LRF-835
- Tanimomo, J., Delcenserie, V., Taminiau, B., Daube, G., Saint-Hubert, C., & Durieux, A. (2016). Growth and Freeze-Drying Optimization of Bifidobacterium crudilactis. *Food and Nutrition Sciences*, 7, 616-626. <https://doi.org/10.4236/fns.2016.77063>
- Trelles, M., Eberhardt, K. M., Buchholz, M., Schindler, A., Bayer-Karpinska, A., Dichgans, M., Reiser, M. F., Nikolaou, K., & Saam, T. (2013). CTA for screening of complicated atherosclerotic carotid plaque—American Heart Association type VI lesions as defined by MRI. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 34(12), 2331-2337. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3607>

- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Turrone, F., Ribbera, A., Foroni, E., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2008). Human gut microbiota and bifidobacteria: From composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(1), 35-50. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9232-4>
- Tzia, C., & Zorpas, A. A. (Ed.). (2012). *Zeolites in Food Processing Industries*. Bentham Science Publishers. <https://doi.org/10.2174/978160805261511201010601>
- U.S. Food and Drug Administration. (2021). *Generally Recognized As Safe (GRAS) Notification for the Use of Bifidobacterium breve MCC1274 in Conventional Foods*. <https://www.fda.gov/media/155711/download>.
- Üçok, G., & Sert, D. (2022). Trial productions of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* culture using dairy by-products as cryoprotectants: Viability and characterization of cultures. *Food Bioscience*, 46, 101541. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101541>
- Virden, A. (2010). Method Development for Laser-Diffraction Particle-Size Analysis. *Pharmaceutical Technology*, 34(11), 1-7.
- Wang, A., & Zhong, Q. (2024). Drying of probiotics to enhance the viability during preparation, storage, food application, and digestion: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(1), e13287. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13287>
- Wang, S., & Peng, Y. (2010). Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 156(1), 11-24. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.10.029>
- Zayed, G., & Roos, Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 39(9), 1081-1086. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00222-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00222-X)