

**Peynir Altı Suyu (PAS) Proteini-Hemiselüloz Kompleksine  
*Lactobacillus pentosus*'un Mikroenkapsülasyonu ve Sofralık  
Zeytine Empregnasyonu**

**Program Kodu: 1002**

**Proje No: 118O555**

Proje Yürütücüsü:  
**Prof. Dr. Hayriye Şebnem HARSA**

Araştırmacı :  
Doç. Dr. Ayşe Handan BAYSAL

Bursiyer :  
Menşure ELVAN

EYLÜL 2019  
İZMİR

## **ÖNSÖZ**

Proje kapsamında probiyotik özelliğe sahip *Lactobacillus pentosus*'un enkapsülasyonu hemiselüloz ve peynir altı suyu proteini kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların gastro-intestinal sisteme taşınması için sofralık siyah zeytinlerin kullanılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, gemlik zeytin yüzeyine vakum altında probiyotik emregnasyonu yapılmıştır. Serbest ve enkapsüle halde emdirilen probiyotik bakterilerin canlılıkları raf ömrü boyunca karşılaştırılmıştır. Yürütülen proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Projede hedeflenen sonuçlara ulaşılmıştır. Probiyotik bakteri zeytin yüzeyinde bir ay boyunca canlılığını korumuştur ve gastro-intestinal sisteme bakterilerin taşınması için uygun biyolojik bir araç olabilir.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	1
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	7
3.1 Probiyotik Bakterilerin Mikroenkapsülasyonu .....	7
3.1.1. PAS Proteini-Hemiselüloz Mikroenkapsüllerinin Hazırlanması .....	7
3.1.2. Kapsüllenmiş Bakterinin Sayımı .....	8
3.1.3. Enkapsüle Probiyotiklerin Mikroskopik İncelenmesi.....	8
3.2. Solüsyon Hazırlanması ve Vakum Empregnasyon .....	8
3.2.1. Mikroyapının Mikroskopik Gözlemlenmesi.....	8
3.2.2. Probiyotiklerle Kaplanmış Zeytinin Mikrobiyolojik Analizi .....	8
3.3. İstatistiksel Analizler .....	9
4. BULGULAR.....	9
4.1. Ksilan Konsantrasyonunun Mikroenkapsülasyon Verimliliğine Etkisi .....	9
4.2. Mikroenkapsülasyonu Gerçekleştirilen <i>L. pentosus</i> ' un Mikroskopik İncelenmesi .....	11
4.3. Vakum Empregnasyon ve Dondurarak Kurutma Sonrası Zeytin Yüzeyine Tutunan Bakterilerin Sayımı.....	11
4.4. Zeytin Yüzeyinin Mikroskopik İncelenmesi .....	14
4.5. Zeytin Örneklerinin Mikrobiyolojik Açıdan Güvenilirliğinin Belirlenmesi .....	15
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	15
KAYNAKÇA.....	18

## TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Tablo 3.1.Ksılan konsantrasyonunun enkapsülasyon verimliliğine ve bakteri canlılığına etkisi... 10	
Şekil 3. 1. PAS proteini-ksılan kompleksinin farklı konsantrasyonları ile enkapsüle edilen <i>L. pentosus</i> 'un canlılığındaki değişim.....9	
Şekil 3. 2. 1:1 oranında PAS proteini konsantresi ve ksılan ile hazırlanan emülsiyon ile enkapsüle edilen <i>L. pentosus</i> 'un 16 haftalık süredeki canlılık değişimi..... 10	
Şekil 3. 3. 1:1 oranında PAS proteini konsantresi ve ksılan ile hazırlanan emülsiyon ile enkapsüle edilen <i>L. plantarum</i> ' un 4 haftalık süredeki canlılık değişimi ..... 11	
Şekil 3. 4. Mikroenkapsüle edilen <i>L. pentosus</i> ' un mikroskopik görüntüleri A) Faz- kontrast mikroskobu görüntüsü, B) Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü ..... 11	
Şekil 3. 5. Gemlik zeytin yüzeyine <i>L. pentosus</i> ve <i>L. plantarum</i> bakterilerinin empregnasyonu sonucunda zeytin yüzeyine tutunan bakteri sayısının 4 haftalık depolama sürecindeki değişimi..... 12	
Şekil 3. 6. Hurma zeytin yüzeyine <i>L. pentosus</i> ve <i>L. plantarum</i> bakterilerinin empregnasyonu sonucunda zeytin yüzeyine tutunan bakteri sayısının 4 haftalık depolama sürecindeki değişimi..... 13	
Şekil 3. 7. Gemlik ve hurma zeytinlerin yüzeyindeki ve empregnasyon sıvılarındaki bakterilerin canlılıklarının değişimi A) <i>L. pentosus</i> 'un gemlik yüzeyinde ve empregnasyon sıvısındaki canlılığının değişimi, B) <i>L. plantarum</i> 'un gemlik yüzeyinde ve empregnasyon sıvısındaki canlılığının değişimi, C) <i>L. pentosus</i> 'un hurma yüzeyinde ve empregnasyon sıvısındaki canlılığının değişimi, D) <i>L. plantarum</i> 'un hurma yüzeyinde ve empregnasyon sıvısındaki canlılığının değişimi ..... 13	
Şekil 3. 8. Yüzeyine probiyotik bakteri empregne edilen gemlik zeytinin mikroskopik görüntüleri A) Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü, B) Çevresel taramalı elektron mikroskobu (ESEM) görüntüsü ..... 14	
Şekil 3. 9. Yüzeyine probiyotik bakteri empregne edilen zeytinlerin faz - kontrast mikroskobu görüntüleri A) Hurma zeytinin mikroskopik görüntüsü, B) Gemlik zeytinin mikroskopik görüntüsü..... 15	

## ÖZET

Proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların amacı, probiyotik özellikteki *Lactobacillus pentosus* NRRL-B 227 suşunun, emülsiyon yöntemi ile enkapsüle edilmesi ve sofralık siyah zeytinlerin yüzeyinin probiyotiklerle kaplanmasıdır. Bu doğrultuda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ksilan ve peynir altı suyu proteini konsantresi kompleksi kullanılarak emülsiyon tekniği ile mikroenkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Zeytin yüzeyini kaplama işlemi için ise vakum empregnasyon yöntemi ve ardından dondurarak kurutma işlemi yapılmıştır. Bir ay süresince zeytinin yüzeyindeki enkapsüle probiyotik hücrelerin canlılığının takibi yapılarak enkapsüle edilmeyen probiyotik zeytin örnekleriyle karşılaştırılması yapılmıştır. %9 ksilan ve %9 peyniraltı suyu proteini konsantresi kullanılarak yapılan enkapsülleme en yüksek verimliliğe sahiptir. Dört ay sonunda *L. pentosus*' un canlı kalma oranı %82'dir. Gemlik zeytin yüzeyine probiyotik tutundurmak için yapılan vakum empregnasyon ve dondurarak kurutma sonrasında, bakteri canlılığı sabit kalmıştır. Zeytin yüzeyinde hem enkapsüle hem de serbest haldeki *L. pentosus* canlılığını önemli ölçüde korumuştur. Kontrol bakteri olarak kullanılan *Lactobacillus plantarum* DSM 1954, enkapsüle halde zeytin yüzeyinde canlılığını korurken serbest halde canlılık kaybı gözlenmiştir. Enkapsüle bakterilerin gemlik zeytin yüzeyine empregnasyonunda başlangıçta 6,2-6,3 log KOB/g olan her iki probiyotik bakterinin canlılığında 4 hafta sonunda önemli bir değişim gözlenmemiştir. Serbest halde empregne edilen *L. pentosus* zeytin yüzeyinde canlılığını korurken 4 hafta sonunda serbest *L. plantarum* 5,33 log KOB/g olarak sayılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enkapsüle edilen probiyotiklerin gemlik zeytin üzerine empregnasyonu gerçekleştirilerek, mide-bağırsak sistemi sağlığı açısından zeytin, probiyotik bakteriler için uygun bir taşıyıcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: probiyotik, peyniraltı suyu proteini, ksilan, siyah zeytin, vakum empregnasyon

## ABSTRACT

The aim of the studies carried out within the scope of the project is to encapsulate the probiotic *Lactobacillus pentosus* NRRL-B 227 strain by emulsion method and to coat the surface of table olives with probiotics. In this respect, microencapsulation was carried out using emulsion technique using xylan and whey protein concentrate complex prepared at different concentrations. Vacuum impregnation method and then freeze-drying process were performed for olive surface coating. The viability of the encapsulated probiotic cells on the surface of the olives was counted for a month and compared with the non-encapsulated probiotic olive samples. Encapsulation using 9% xylan and 9% whey protein concentrate has the highest efficiency. At the end of four months, the survival rate of *L. pentosus* was 82%. After the attachment of probiotics to Gemlik olive surface by vacuum impregnation and freeze-drying methods, bacterial viability remained constant. Both the encapsulated and free *L. pentosus* on olive surface preserved their viability significantly. *Lactobacillus plantarum* DSM 1954, which is used as control bacteria, remained viable on the surface of the table olive when encapsulated, while lost its viability in the free form. There was no significant change in the viability of both probiotic bacteria, in terms of final viable cell concentrations when compared to initial e.g. 6.2-6.3 log CFU/g, on the surface of Gemlik olives. *L. pentosus*, which was impregnated in free form, remained alive on the olive surface while free *L. plantarum* was counted as 5.33 log CFU/g after 4 weeks. In the light of results obtained from this project, the encapsulated probiotics can be successfully impregnated on Gemlik olives, therefore table olive can be considered a suitable carrier for probiotic bacteria for the sake of gastro-intestinal health.

Keywords: probiotic, whey protein, xylan, table olive, vacuum impregnation

## 1. GİRİŞ

Endüstriyel anlamda ülkemizde probiyotik içeren fonksiyonel ürünlerin çeşitliliğinin ve üretiminin yaygın olmadığı ancak gelişmeye açık bir pazar olduğu görülmektedir. Bu nedenle yeni ve farklı hammaddelerden oluşan probiyotikli yeni ürün kategorileri fonksiyonel gıda pazarının gelişmesi açısından önem kazanmıştır. Güncel araştırmalar, probiyotik gelişimi için önemli olan yeni bir enkapsülasyon materyali geliştirmek, pazarda fonksiyonel özelliğe sahip ürün yelpazesini genişletmek ve tüketicinin talep ve arzularına uygun farklı çeşitlilikte yeni seçenekler sunmak yönünde olmaktadır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Zeytinin anavatanı Anadolu'dur; Ege adalarından Yunanistan, İtalya, Fransa ve İspanya'ya kadar uzanmış ve buradan da Kuzey Afrika'ya geçmiştir. Uluslararası Zeytinyağı Konseyi (IOOC 2018)'ne göre, 2017-2018 döneminde dünya sofralık zeytin üretimi 2 951 500 ton olarak tahmin edilmektedir. Dünya zeytin üretiminde önemli yere sahip olan Türkiye'nin de 450 000 ton sofralık zeytin üretimine ulaşması beklenmektedir. TÜİK (2019) verilerine göre 2018 yılında toplam 1 500 000 ton zeytinin %28'i sofralık olarak tüketilmektedir. Zeytin; su, protein, yağ, selüloz, fosfor, kükürt, kalsiyum, klor, demir, bakır, manganez A, C ve E vitaminlerinden meydana gelir. 100 gram zeytinde 224 kalori vardır. 100 gram zeytinyağında 30 miligram E vitamini bulunur. Zeytinin besinsel değeri fenolikler açısından zengin olmasına bağlıdır. Sofralık zeytinler, çok çeşitli temel mikroblesinler, esansiyel yağ asitleri, biyolojik olarak aktif fitokimyasallar açısından zengin kaynaklardır. Fitokimyasallar, polifenollerini içerir ki bunların birçoğunun sağlığı iyileştirici etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Kountouri vd., 2007).

Fonksiyonel gıda endüstrisinin, bağırsak mikrobiyolojisinin insan sağlığı ve beslenmesindeki önemine ilişkin algısı, piyasada mevcut probiyotik ve prebiyotik bazlı ürünlerin önemli ölçüde artmasına yol açmıştır. Fonksiyonel gıdalar ilk olarak kalsiyum ve bazı vitamin benzeri bileşiklerin sağlık üzerine yararları nedeniyle gıdalara ilavesi sonucu ortaya çıkmıştır. Daha sonraki yıllarda, kardiyovasküler hastalık ve tip 2 diyabet riskinde azalma, anti-inflamatuar potansiyel, kolit ve epitelyal hücre hasarına karşı koruma, insülin direncinin, steatozun azaltılması etkileri (Bron vd., 2017; Lourens-Hattingh ve Viljoen, 2001; Marco vd., 2017; Shah vd., 2010; Sánchez vd., 2016) ve bağırsak florası üzerinde pozitif etkileri olan ve çoğunlukla da probiyotikleri kapsayan katkıların gıdalara ilavesi kavramı ortaya atılmıştır (Tharmaraj ve Shah, 2003). Her ne kadar süt ürünleri hala probiyotik bakterilerin baskın taşıyıcıları olsa da süt ürünlerinin tüketimindeki dezavantajlar, bu ürünlerin genellikle soğuk ortamda muhafaza edilmesi ve laktöz intoleransı olan veya kolesterol

problemi olan kişiler için uygun olmamalarıdır. Dahası, bazı tüketiciler süt ürünlerini sevmeyebilir ve başka türde probiyotik ürün tüketmek isteyebilirler (Rodrigues vd., 2018). Bazı araştırmalar meyve ve sebzelerin, probiyotikler için uygun matrisler olarak vejeteryan tüketicilerin artan pazarındaki rekabet avantajları ile birlikte kullanılabileceğini göstermektedir. Özellikle sofralık zeytinler, sadece halihazırda iyi bilinen besin özellikleri için değil, aynı zamanda onları probiyotikler için oldukça uygun taşıyıcılar yapan içsel özelliklere sahip oldukları için de ilgi çekmektedir (Peres vd., 2012).

Dünya Sağlık Örgütü' nün tanımına göre; probiyotikler, yeterli miktarda alındığında insan sağlığı üzerinde faydalı etki yaratan canlı mikroorganizmalardır (FAO/WHO, 2002). Hastalıktan koruma ve tedavi edici özelliklere sahip olan probiyotikler, bireylerin sağlığının korunmasında önemli bir yere sahiptir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* en yaygın probiyotik cinsleridir (Parvez vd., 2006). Türk Gıda Kodeksi'ne göre gıdanın en az  $1.0 \times 10^6$  KOB/g canlı probiyotik mikroorganizma içermesi gerekir. Bununla birlikte, yüksek düzeyde canlı probiyotik tüketimi, hücrelerin bağırsağa gelişinden sonra aynı canlılık oranını garanti etmemektedir (Iravani vd., 2015). Probiyotik aynı zamanda üst gastro-intestinal sistemde hayatta kalmalıdır, canlılığını koruyabilen hücreler böylece bağırsak mukozasına yapışabilir ve patojenleri rekabetçi bir şekilde ortadan kaldırabilir (Sharma ve Devi, 2014). Kapsülleme, olumsuz koşullarda mikroorganizmalar için koruyucu bir ortam sağlamak için kullanılan, yaygın olarak bilinen mikroorganizma dağıtım sistemidir (Burgain vd., 2011).

Probiyotik hücre kapsüllemesinde en uygun metot emülsiyon tekniğidir (Heidebach vd., 2012). Kapsülleme işlemi bakterinin uzun süre canlılığını ve canlı mikroorganizma sayısının korunmasını sağlar. Mikroenkapsülasyon sistemi, son dönemlerde gıda üretim aşamalarında sıkça tercih edilmektedir. Bu sistem, yenilebilir polimer maddelerle gıda içerisindeki hassas mikroorganizmaları ve bileşenleri koruyan bir teknolojidir (Eslami vd., 2017). Çift emülsiyon yöntemi ile mikroenkapsüle edilen *L. delbrueckii*, bakteriyel fonksiyonlarını koruyarak canlılığını devam ettirmiştir (Eslami vd., 2017). *L. acidophilus* DD910 ve *B. lactis* DD920 suşlarının bir kalsiyum - aljinat polimer kullanılarak kapsüllemesi sonucunda, hücre sayıları kapsüllememiş olanlarla karşılaştırıldığında, 7 haftalık süre sonunda, sırasıyla 2 ve 1 log daha az kayıp olduğu ortaya konulmuştur (Kailasapathy, 2006). *Lactobacillus rhamnosus* GG suşunun, kitosan ve aljinat ile enkapsülasyonu bu bakterinin elma suyunda 90 gün canlılığını devam ettirmesini sağlamıştır. Ayrıca mikrokapsüllü bakteriler, gastro-intestinal tedaviler sırasında serbest bakterilere kıyasla daha yüksek canlılık oranı göstermiştir (Gandomi vd., 2016).



Proteinler özellikle jel oluşturabilmenin yanı sıra çeşitli fonksiyonel özelliklere sahip oldukları için enkapsülasyon prosesinde tercih edilmektedirler. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı peynir altı suyu proteindir. Peynir altı suyu proteini peynir üretimi esnasında yan ürün olarak elde edilen ucuz bir proteindir. Literatürde, bu projede kullanmayı düşündüğümüz peynir altı suyu proteini ile farklı probiyotik mikroorganizmanın mikroenkapsülasyonuna ilişkin birçok başarılı çalışma ve yayın bulunmaktadır. *Lactobacillus rhamnosus*, emülgatör olarak tatlı peynir altı suyu kullanılarak çift emülsiyon tekniği ile kapsüllenmiştir. Kapsüllenen hücreler gastro-intestinal sistemde asit ve safra tuzlarına karşı önemli ölçüde direnç sergilemişlerdir. Buna ek olarak, uygulanan bu çift emülsiyon metodu hem bakterinin canlılığının korunması hem de tatlı peynir altı suyu kullanımı ile bakterinin çoğalması için ortam sağlamıştır (Pimentel-González vd., 2009). *L. acidophilus* LA-5'in mikroenkapsülasyonu pektin ve peynir altı suyu proteinin kullanarak gerçekleştirilmiştir, 35 günlük süreçte kapsüllenmemiş hücrelere oranla canlılıklarını daha yüksek miktarda korumuşlardır (Ribeiro vd., 2014). Probiyotik *Lactobacillus bulgaricus* emülsiyon tekniği ile peynir altı suyu proteini içinde enkapsüle edilmiştir, mide-bağırsak sistemi koşullarında canlılığını korumuştur (Chen vd., 2017). *L. acidophilus*, ilk defa oluşturulan peyniraltı suyu-pullulan kompleksi ile enkapsülasyonu sonucunda probiyotiğin canlılığını koruyan mikrokapsüller elde edilmiştir (Çabuk ve Harsa, 2015).

Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) tarafından selüloz, hemiselüloz, pektin, oligosakkarit, zambak ve çeşitli lignifiye bileşikler dahil olmak üzere çeşitli sindirilemeyen bitki polisakkaritleri, diyet lifi olarak tanımlanmıştır. Hemiselülozlar çoğunlukla ksilanlar, glukomananlar, arabinanlar, galaktanlar ve glukolanlar içerir. Hemiselülozun, yapıştırıcı, kalınlaştırıcı, stabilize edici ve emülsifiye edici (Yadav vd., 2009) bunlara ek olarak film oluşturma özelliklerinden ötürü değerli olduğu kabul edilmektedir (Hansen ve Plackett, 2008). Bu nedenle, hemiselülozlar gıda endüstrisinde kapsülleme ve emülsifikasyon süreçleri için önemli bir potansiyele sahiptir (Ebringerová, 2006). Hemiselüloz, küçük miktarlarda lignin ve proteinlerin varlığına bağlı olarak hidrofobik merkezler olarak hareket eden ve film oluşturma etkilerinden dolayı stabil köpükler ve yağ / su tipi emülsiyonlar üretir (Ebringerová, 2006). Hemiselüloz esaslı veya türetilmiş ürünlerin kimyasal ve fiziksel özellikleri incelenmesine rağmen (Ebringerová, 2006; Hansen ve Plackett, 2008), hemiselülozların kapsülleme veya kaplama uygulamalarındaki potansiyelini araştırmaya hala ihtiyaç vardır (Celebioglu vd., 2012). Hemiselüloz içeren farklı emülsiyonlar balık yağının enkapsülasyonunda kullanılmıştır. Hemiselülozun kullanımını arttırmak için, kaplama malzemesi olarak çeşitli hemiselüloz kaynaklarının kullanılması gerekmektedir ve ayrıca daha iyi bir mikrokapsülleme işlemi için diğer kaplama ajanları ile farklı kombinasyonlar test edilmelidir (Tatar

vd., 2014). Ksilan tipi hemiselülozlar ağaçların kök ve gövdelerinde bol miktarda bulunur (Börjesson vd., 2018). Tarımsal bir sanayi yan ürünü olan ksilan tipi hemiselülozlar, kağıt güçlendirici maddeler veya boyutlandırma maddeleri, biyoetanol/biyokimyasal hammaddeler, biyobozunur filmler, gıda endüstrisinde emülgatörler olarak potansiyel uygulamalara sahiptir (Jin vd., 2019).

Biyoprotektif bir ajan olarak probiyotik mikroorganizmaların kullanımı fermente ürünlerdeki etkinliği çeşitli çalışmalarla test edilmektedir. Liu vd. (2016), *Lactobacillus pentosus*' u başlangıç kültürü olarak kullandıktan sonra fermente mantarlardaki nitrit içeriğini inceleyerek inoküle edilen numunelerde nitritin kontrol örneklerine göre önemli derecede düşük olduğu belirtmektedir. Et ürünlerinde *L. pentosus* 'un N-nitrosodipropylamine, N-nitrosodiphenylamine üzerinde inhibe edici etkiye sahiptir (Sun vd., 2017). *L. pentosus* suşu LAP1, güçlü bir anti-*Candida* aktivitesi ile sadece gıda endüstrilerinde değil, aynı zamanda farmasötik endüstrilerinde *Candida* enfeksiyonlarına karşı biyoterapötik ajan olarak çok geniş uygulamalar için kullanılabilecek önemli bir antibiofilm aktivitesine sahip probiyotiktir (Aarti vd., 2018). Mojgani vd. (2015), *L. pentosus*' un yüksek agregasyon ve adhezyon özelliklerininin yüksek olduğunu gözlemlemiştir. *L. pentosus* suşu LAP1, *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*' ye karşı güçlü antimikotik aktivite sergilemektedir. Benzer çalışmalarla Okkers vd. (1999) ve Voulgari vd. (2010), *L. pentosus*' un *Candida*' ya karşı fungistatik etkisi olduğu belirtilmektedir. Elde edilen sonuçlar *L. pentosus* LAP1 suşunun simüle mide suyu ve safra tuzu ortamlarındaki düşük pH'a yüksek tolerans gösteren, agregasyon özellikleri ve önemli ölçüdeki hidrofobik yapısı ile antibiyotiklere karşı dirençli bir probiyotik olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir (Aarti vd., 2018). *Lactobacillus pentosus*' un antifungal etkisi domates püresi, ticari ekmek, işlenmiş peynir dilimleri (Muhialdin vd., 2011), ekmek hamuru ve ekşi maya (Teresa vd., 2008) üzerinde araştırılmıştır. Muhialdin vd. 2011 yaptığı çalışmada, oluşturduğu iki farklı kombinasyon ile (*L. paracasei* D5, *L. fermentum* Te007) ve (*P. pentosaceus* Te010, *L. pentosus* G004) ekmek yüzeyinde küf misellerinin gelişmesini kontrol örnekle karşılaştırdığında 5-7 gün geciktiğini belirtmiştir. *L. fermentum* Te007, *P. pentosaceus* Te010, *L. pentosus* G004 ve *L. paracasei* D5 ekmek endüstrisinde biyokoruyucu olarak umut vaat eden, ısıya dirençli antifungal maddeler üreten laktik asit bakterileridir. Bu bakteriler işlenmiş gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanılabilir (Muhialdin vd., 2011). Bakteri suşlarının antifungal aktivitesi gelişme ortamına ve küf türüne bağlıdır. Lipinska vd. (2016) yürüttüğü bir çalışmada kullandığı laktik asit bakterilerinden sadece insandan izole edilen *L. mucosae* 0988, *L. delbrueckii* 0987, bitki kaynaklı *L. pentosus* 0979 suşlarının az da olsa *Candida vini* mayasını inhibe edici etki gösterdiğini belirtmiştir. Ancak ksilitol ve galaktosil-ksilitol varlığında *L. pentosus* 0979'un süpernatantı

*Alternaria brassicicola*'yı büyük ölçüde inhibe etmiştir (Lipinska vd., 2016). *Lactobacillus pentosus* LOCK 0979'un mayalara karşı olan antagonistik aktivitesi zayıf ancak galaktosil-poliol ve özellikle gal-eritritol varlığında *Candida* türlerini inhibe edici etkiye sahiptir (Lipinska vd., 2017).

Çoğu probiyotik mikroorganizmalar laktik asit bakterileridir (LAB). Yoğurtlar, dondurmalar ve diğer süt ürünlerinin yanı sıra meyve suları ve fermente sosisler gibi süt ürünü olmayan ürünler de dahil olmak üzere probiyotikler geniş bir yelpazede gıda ürünlerinde bulunmaktadır veya ürünlere takviye edilmektedir (Granato vd., 2010; Rivera-Espinoza ve Gallardo-Navarro, 2010). Doğal olarak fermente edilmiş zeytinlerde *L. pentosus* baskın kültürü oluşturmaktadır (Abriouel vd., 2011; Hurtado vd., 2008). *L. pentosus* yeşil zeytin fermantasyunda starter kültür olarak kullanılmaktadır (de Castro vd., 2002). Ek olarak, son çalışmalar, iki potansiyel probiyotik LAB suşunun, yani *Lactobacillus pentosus* B281 ve *L. plantarum* B282'nin, starter kültürler olarak İspanyol tarzı yeşil zeytinlerin üretiminde kullanılmaktadır (Argyri vd., 2014). Bu iki suş daha önce zeytinyağı mikrobiyotasından izole edilmiştir (Doulgeraki vd., 2013) ve *in vitro* testlerle probiyotik özelliklere sahip oldukları bulunmuştur (Argyri vd., 2013). Her iki suşun, probiyotik referans suşu *L. casei* ATCC 393 ile karşılaştırıldığında Caco-2 kolon kanseri hücrelerine adhezyonlarının daha yüksek oranda olduğu gösterilmiştir (Saxami vd., 2016). Rodríguez-Gomez vd., (2014) yürüttüğü çalışmada, probiyotik *Lactobacillus pentosus* TOMCLAB2 suşu takviye edilmiş fermente İspanyol usulü yeşil zeytinler, tuzlu su ile cam kavanozlara doldurularak 200 gün boyunca ortam sıcaklığında depolanmıştır. Eklenen LAB kültürünün, zeytin yüzeyine kolonize olabildiği ve raf ömrünün sonunda yüksek geri kazanım oranlarını sunabildiği ve bu sayede, seçilen çok işlevli starterlerle, zeytinlerin mikrobiyotalarının başarılı bir şekilde zenginleştirilebileceği belirtilmiştir. Başka bir araştırma, esas olarak, yaklaşık 12 ay boyunca 4 ve 20°C'de, salamura ile doldurulmuş polietilen torbalarda yeşil sofralık zeytinlerin depolanması sırasında, başlangıç kültürleri olarak kullanılan probiyotik LAB suşlarının hayatta kalmasını izlemeye odaklanmıştır. Soğukta 6 aylık depolamadan sonra *L. pentosus* B281 12 ay sonra yüksek oranlarda hayatta kalmayı başarmıştır (Blana vd., 2016). Lavermicocca vd. (2005)'nin probiyotik bakterilerin sofralık zeytin yüzeyine tutunması ve canlılığını koruması üzerine gerçekleştirdiği çalışmasında, *L. paracasei* IMPC2.1 için 3 aylık deney boyunca  $10^7$  KOB/g'dan yüksek canlılık gözlemlenmiştir. Potansiyel probiyotik özellikleri ve zeytinler üzerinde uzun süre hayatta kalması için seçilen bu suş, canlı probiyotik hücreleri insan gastro-intestinal sistemine taşımak için bir taşıyıcı olarak zeytinlerin kullanılabileceğini doğrulamaktadır. 10 gün boyunca yaklaşık  $10^9$  -  $10^{10}$  canlı hücre taşıyan zeytinlerle günde 10-15 adet tüketen beş gönüllüden dördünün fekal örneklerinden *L. paracasei* IMPC2.1 izole edilmiştir.

Probiyotik, prebiyotik, vitamin ve mineral gibi çeşitli maddelerin vücuda taşınması için aracı olarak meyve ve sebzeler kullanılmaktadır. Vakum empregnasyon teknolojisi bu alanda geliştirilen bir yöntemdir (Ursachi vd., 2009). Empregnasyon ya da emdirme, atmosferik basınçta ve vakum altında başarılı olmaktadır; probiyotik meyve ve sebze ürünlerinin geliştirilmesine yönelik yararlı bir araç olarak düşünülebilir, çünkü bitkinin doğal hücresel yapısını bozmaz ve fizyolojik olarak aktif bileşikler veya yararlı mikroorganizmaların eklenmesiyle orijinal bileşimini uygun şekilde modifiye edebilir (Alzamora vd., 2005; Fito vd., 2001). Betoret vd. (2003) çalışmasında, vakum emdirme yöntemini kullanarak probiyotik bakımından zenginleştirilmiş kurutulmuş elma geliştirmiştir; elma silindirlerine, *S. cerevisiae* türü CECT 1347 içeren ticari elma suyu veya  $10^7$ - $10^8$  KOB/mL *L. casei ssp. rhamnosus* suşu CECT 245 içeren tam yağlı süt ile muamele etmiştir. Elmaları askorbik asit açısından zenginleştirmek için vakum emdirme ve atmosfer basıncı altında emdirme teknikleri kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda vakum emdirme ile hem buzdolabı sıcaklığında hem de dondurucuda askorbik asit yüzdesi daha yüksek bulunmuştur (Ursachi vd., 2009). Taze meyve ve sebzeler selüloz içermektedir. İnsanlar tarafından sindirilemeyen selüloz, probiyotiklerin gastro-intestinal sisteme taşınımında koruyucu rol oynayabilir (Alegre vd., 2011; Bove vd., 2013; Arena vd., 2014). Bu bilgiden yola çıkarak Russo vd. (2014) *L. plantarum* ve *L. fermentum* probiyotiklerinin vücuda alınımı için taşıyıcı olarak tüketime hazır ananas dilimleri kullanılmıştır. Benzer olarak, Krasaekoopt ve Suthanwong (2008) guava ve papaya meyvelerine vakum emdirme yöntemi ile probiyotikli fonksiyonel ürün üretmiştir. Betoret vd. (2012) ise mandalina suyuna *Lactobacillus salivarius* suşunu ekleyerek vakum emdirme yapılan elma dilimlerini yüksek sıcaklıkta kurutarak atıştırmalık gıda üretmişlerdir. Vakum empregnasyon yöntemi ozmotik dehidrasyon işleminin vakum altında gerçekleştirilmesidir. Vakum kullanılarak dehidrasyon süresi kısaltılmakta ve verimlilik artmaktadır (Fito ve Chiralt, 2000). Sükroz ve kalsiyum laktat içeren solüsyonda ananasın ozmotik dehidrasyonu artmaktadır (Silva vd., 2014). Pancarın tuzlu suda ozmotik dehidrasyonunun incelendiği bir çalışmada, 25-45°C sıcaklıkları arasında %5-25 oranında kalsiyum laktat kullanılmıştır. En etkili dehidrasyonun 35°C' de % 14,31 tuz ile gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Manivannan ve Rajasimman, 2008).

Bu proje, probiyotik özellikteki *Lactobacillus pentosus* suşunun emülsiyon tekniği ile enkapsüle edilmesi ve sofralık siyah zeytinlerin yüzeyine empregnasyonu konu alınmıştır. Zeytinin raf ömrü boyunca, yüzeyindeki enkapsüle canlı hücre takibi yapılarak enkapsüle edilmeyen probiyotik örneklerle karşılaştırılması yapılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Zeytinler Ege Bölgesi'nden sağlanmıştır, siyah zeytin olarak gemlik ve hurma çeşitleri kullanılmış olup yerel marketten temin edilmiştir. Probiyotik bakteri olarak *Lactobacillus pentosus* NRRL-B 227 ve etkinliğinin test edilmesi için *Lactobacillus plantarum* DSM 1954 İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümü Moleküler Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonundan (İYTE-GMB-GMLKK) temin edilmiştir.

#### 3.1 Probiyotik Bakterilerin Mikroenkapsülasyonu

Probiyotik bakterinin mikroenkapsülasyonu amacıyla Çabuk ve Harsa, (2015)'de önerilen emülsiyon yöntemi üzerinde gerekli düzenlemeler yapılarak kullanıldı. Öncelikle 10 mL sıvı MRS (de Man Rogosa and Sharpe, Merck, Almanya) besiyerine %1 oranında aşılınmış probiyotik bakterilerin 24 saat süre ile 37°C'de inkübasyonu sonucunda ön canlandırma işlemi gerçekleştirildi. Ön canlandırma işlemi gerçekleştirilmiş bakterilerden tekrar %1 oranında sıvı MRS besi yerine ikinci aşılama işlemi gerçekleştirilip 37°C'de 16-18 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonunda mikroorganizmalar santrifüj (5000 rpm, 4°C, 15 dk) edildi. Santrifüj sonrası santrifüj tüplerinde üste kalan sıvı kısım döküldükten sonra çöken kısımlar mikrokapsülasyon işleminde kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edildi.

##### 3.1.1. PAS Proteini-Hemiselüloz Mikrokapsüllerinin Hazırlanması

Peynir altı suyu (PAS) proteini konsantresi (Alfasol, Türkiye) ortam sıcaklığında steril damıtılmış su içinde manyetik karıştırıcı kullanılarak çözündürüldü. Uygun çözünmeyi sağlamak için yaklaşık 3 saat karıştırma işlemi gerçekleştirildi ve hidrasyondan sonra, protein çözeltisi 80°C'de 30 dakika denatüre edildi. Denatüre protein çözeltisi oda sıcaklığına soğutuldu. Farklı konsantrasyonlarda hemiselüloz olarak kullanılan ksilan, ortam sıcaklığında damıtılmış su içinde çözündürüldü ve polisakkarit çözeltisi, uygun çözünmeyi sağlamak için manyetik karıştırıcı kullanarak yaklaşık 3 saat karıştırıldı. Ksilan (Serva, Almanya) çözeltisi ve denatüre PAS proteini çözeltisi çeşitli nihai konsantrasyonlarda karıştırıldı. Nihai protein çözeltisi konsantrasyonu % 9 (w/v) olarak belirlendi.

İlk olarak, su içinde yağ emülsiyonu oluşturuldu, bu birincil emülsiyon peynir altı suyu proteini konsantresi ve ksilan polimer kompleksi, bakteri hücreleri ve %1 soya lesitininden (Alfasol, Türkiye) oluşmaktadır. Birincil emülsiyon, 5 dakika boyunca bir Ultra Turrax homojenizatör ile homojen hale getirildi (Ultra Turrax, model T25, Janke ve Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Almanya). Emülsiyon daha sonra tekrar 0,1M CaCl<sub>2</sub> çözeltisinde (Applichem, Almanya) 2 dakika boyunca homojenizatör ile homojenize edildi. Mikrokapsül oluşumundan sonra, bu bulamaç mikrokapsüllerin sertleşmesi için 160 rpm'de 30 dakika orbital çalkalayıcı ile çalkalandı.

Sertleştirilmiş mikrokapsüllerin çözültiden ve yağ fazından ayrılması, 1000 rpm'de 1 saat santrifüjleme ile gerçekleştirildi. Elde edilen mikrokapsüller 4°C'de gelecek analizler için muhafaza edildi.

### **3.1.2. Kapsüllenmiş Bakterinin Sayımı**

Mikrokapsüle hapsedilmiş bakterilerin sayılması için öncelikle mikrokapsüllerin parçalanması gerekmektedir. Bunun için pepton sıvısı içerisinde 1/10 oranında seyreltilmiş mikrokapsüller homojenizasyona tabi tutuldu. Uygun dilüsyonlardan örnek alındıktan sonra dökme plak yöntemi ile ekim yapılan petri kutuları 37°C' de 48 saat süreyle anaerobik koşullarda inkübe edildi.

### **3.1.3. Enkapsüle Probiyotiklerin Mikroskopik İncelenmesi**

Mikrokapsüllerin yüzey yapıları İYTE Tümlşik Araştırmalar Merkezi (TAM)'nde faz-kontrast mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu ile (FEI QUANTA 250 FEG, EDX dedektörü) incelendi.

## **3.2. Solüsyon Hazırlanması ve Vakum Empregnasyon**

Empregnasyon sıvısı olarak %10-15 (w/w) kalsiyum laktat (Alfasol, Türkiye) tuz çözeltisi saf su ile hazırlandı (Manivannan ve Rajasimman, 2008). Çözelti içinde  $10^8$  KOB/mL bakteri olacak şekilde mikroenkapsüle *L. pentosus* ve kontrol örneği olarak enkapsüle edilmemiş *L. pentosus* ilave edildi. Zeytinler, 1:20 (w/w) oranında olacak şekilde 35°C'de hazırlanan empregnasyon çözeltisine daldırıldı (Flores-Andrade vd., 2017). Zeytin meyvelerinin vakum empregnasyonu 50 mbar basınç altında 30 dakika süresince gerçekleştirildi (Betoret vd., 2003). Daha sonra vakum kesilerek kapalı sistem atmosferik basınç altında örnekler solüsyonda bekletildi. Empregnasyon sonrasında fazla sıvının uzaklaştırılması için zeytinler filtre kağıdı üzerinde bir süre bekletildi. Daha sonra probiyotik hücreler ile kaplanmış olan zeytinler dondurarak kurutma işlemine tabi tutuldu (Lablanco freeze dryer, Freezone 18, Kansas, ABD). Kurutulmuş zeytinler 4°C'de muhafaza edildi.

### **3.2.1. Mikroyapının Mikroskopik Gözlemlenmesi**

Zeytin yüzeyinin incelenmesi İYTE TAM'daki faz-kontrast mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu (FEI QUANTA 250 FEG, EDX ve ESEM dedektörü) ile gerçekleştirildi.

### **3.2.2. Probiyotiklerle Kaplanmış Zeytinin Mikrobiyolojik Analizi**

Proje süresince belirli aralıklarla oda sıcaklığında muhafaza edilen zeytinler steril tüpte yer alan Tween 80 (0,025%, v/v) ilave edilmiş 20 mL steril NaCl (0,85%, w/v) solüsyonuna aseptik olarak aktarılıp 2 saat boyunca 360 derece çalkalayıcı ile karıştırıldı. Elde edilen süspansiyonlar seyreltilerek MRS agara sayım için ekim yapıldı. Ek olarak, başlangıçta ticari alınan zeytin

örneklerinin mikrobiyal yükünü belirlemek için farklı besiyerlerine de ekim yapıldı; MRS (de Man Rogosa and Sharpe, Merck, Almanya), PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid, İngiltere), PCA (Plate Count Agar, Oxoid, İngiltere) (Lavermicocca vd., 2005).

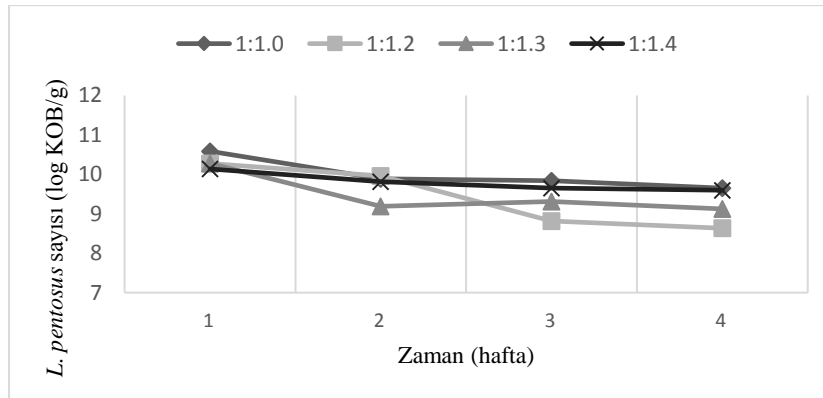
### 3.3. İstatistiksel Analizler

Çalışmada analizler paralelli olarak yapılmış, elde edilen veriler Minitab 18,0 (Minitab Inc., State College, PA, USA) programında değerlendirilmiştir. Önemli bulunan farklılıklar One Way ANOVA ve Tukey testine göre belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Ksılan Konsantrasyonunun Mikroenkapsülasyon Verimliliğine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda (1:1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4) hazırlanan emülsiyon sıvısına aynı miktarda *L. pentosus* hücreleri eklenerek 1 ay boyunca canlılık sayımları haftalık olarak yapılmıştır ve enkapsülasyon verimliliği hesaplanmıştır. Tablo 3.1 ve Şekil 3.1 deki verilere göre 1:1 oranındaki emülsiyonun mikroenkapsülasyon verimliliği diğer konsantrasyonlardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir ve 1 ay sonunda canlılığını önemli ölçüde koruduğu bulgulanmıştır.



Şekil 3. 1. PAS proteini-ksilan kompleksinin farklı konsantrasyonları ile enkapsüle edilen *L. pentosus*' un canlılığındaki değişim

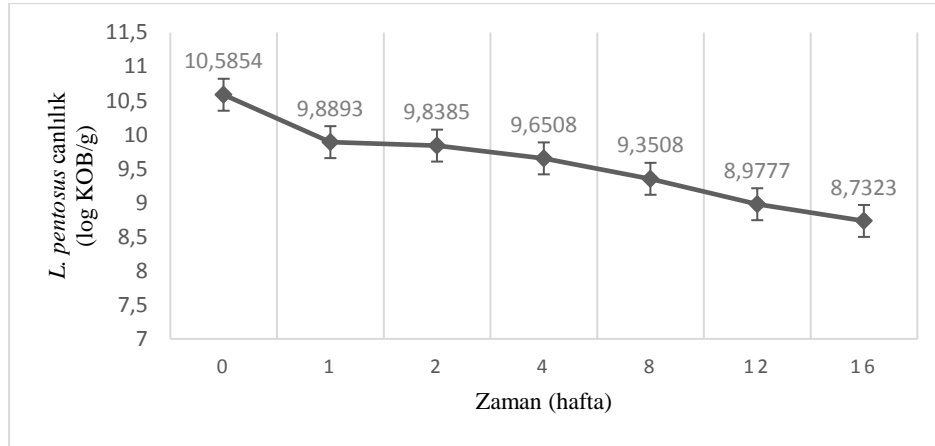
*L. pentosus* mikroenkapsülasyonunda en yüksek verimliliğe %9 PAS proteini konsantrasyonu ve %9 ksilan ile ulaşılmıştır. Değerlendirilen tüm konsantrasyonlarda mikroenkapsülasyon verimliliği %90'ın üzerindedir ve bakteri canlılığı en az 10,1367 log KOB/g olarak sayılmıştır. 4 haftalık süre sonunda bakteri canlılıklarında ortalama 1,067 log KOB/g düşüş gözlemlenmiştir.

Tablo 3. 1. Ksilan konsantrasyonunun enkapsülasyon verimliliğine ve bakteri canlılığına etkisi

PAS proteini- Ksily	Ksilan konsantrasyonu (%)	Mikroenkapsülasyon verimi (%)	Bakteri canlılığı (log KOB/g)	1 ay sonunda canlılık (log KOB/g)
PAS proteini- Ksily <sub>1:1</sub>	9,0	95,8041±0,002 <sup>A</sup>	10,5854±0,001 <sup>A</sup>	9,6508±0,021 <sup>A</sup>
PAS proteini- Ksily <sub>1:1,2</sub>	10,8	93,097±0,159 <sup>B</sup>	10,2742±0,021 <sup>B</sup>	8,6334±0,030 <sup>D</sup>
PAS proteini- Ksily <sub>1:1,3</sub>	11,7	92,9954±0,0147 <sup>B</sup>	10,2762±0,030 <sup>B</sup>	9,5965±0,011 <sup>B</sup>
PAS proteini- Ksily <sub>1:1,4</sub>	12,6	91,365±0,533 <sup>C</sup>	10,1367±0,011 <sup>C</sup>	9,1225±0,018 <sup>C</sup>

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. Aynı sütundaki farklı büyük harfler, Tukey testinde anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir (p<0,05).

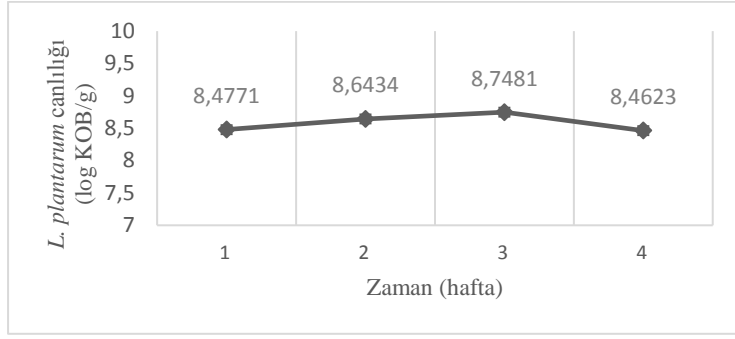
1:1 oranında PAS proteini konsantresi ve ksilan içeren emülsiyon sıvısı ile enkapsüle edilen *L. pentosus*'un canlılığı 16 haftalık süre sonunda 1,8531 log KOB/g azalmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. 1:1 oranında PAS proteini konsantresi ve ksilan ile hazırlanan emülsiyon ile enkapsüle edilen *L. pentosus*'un 16 haftalık süredeki canlılık değişimi

*L. pentosus*'un yanısıra kontrol bakteri olarak kullanılan *L. plantarum*'un da mikroenkapsülasyonu 1:1 oranında PAS proteini konsantresi ve ksilan ile gerçekleştirilmiştir ve 1 aylık süredeki canlılığı belirlenmiştir. *L. plantarum* 4 haftalık süre boyunca canlılığını önemli ölçüde korumuştur (Şekil 3.3).

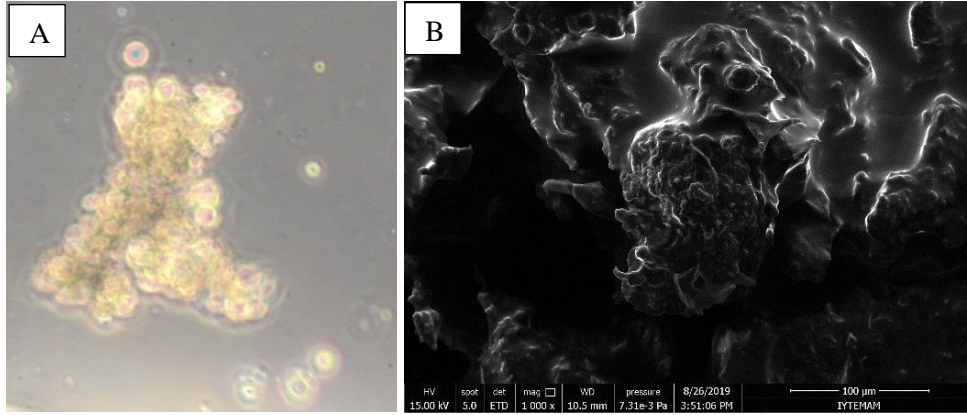




Şekil 3. 3. 1:1 oranında PAS proteini konsantresi ve ksilan ile hazırlanan emülsiyon ile enkapsüle edilen *L. plantarum*' un 4 haftalık süredeki canlılık değişimi

#### 4.2. Mikroenkapsülasyonu Gerçekleştirilen *L. pentosus*' un Mikroskopik İncelenmesi

*L. pentosus* mikroenkapsülleri saf su ile seyreltilerek faz - kontrast mikroskobu altında incelenmiştir. Mikroenkapsüle bakteriyi taramalı elektron mikroskobunda incelemek için ise örnek liyofilize edilmiştir ve örnek üzerine altın kaplama yapılmıştır (Şekil 3.4).



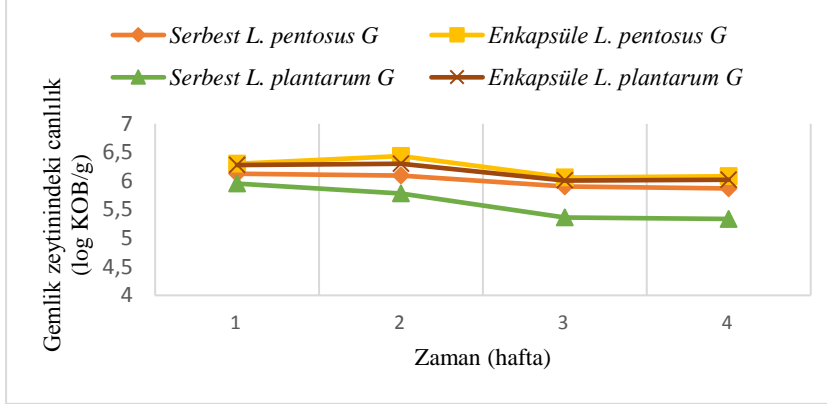
Şekil 3. 4. Mikroenkapsüle edilen *L. pentosus*' un mikroskopik görüntüleri A) Faz- kontrast mikroskobu görüntüsü, B) Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü

#### 4.3. Vakum Emregnasyon ve Dondurarak Kurutma Sonrası Zeytin Yüzeyine Tutunan Bakterilerin Sayımı

37°C' de 30 dakika vakum emregnasyona tabii tutulan siyah zeytinler, süre sonunda 5 dk normal basınç altında emregnasyon sıvısında çalkalanmıştır. Bu işlemden sonra zeytinler aseptik koşullarda ambalajlanarak yüzeye tutunan bakteri sayımları için -4°C'de muhafaza edilmiştir. Ancak haftalık yapılan sayımlar sonucunda, yüzeye tutunan bakteriler canlılıklarını kısa bir sürede yitirmiştir. Canlılığı korumak amacıyla gerçekleştirilen dondurarak kurutma işlemi ile bu sorun

çözümüştür. Şekil 3.5'te *L. pentosus*' un ve kontrol olarak kullanılan *L. plantarum*' un gemlik üzerindeki canlılığının 4 haftalık süreçteki değişimi gösterilmektedir.

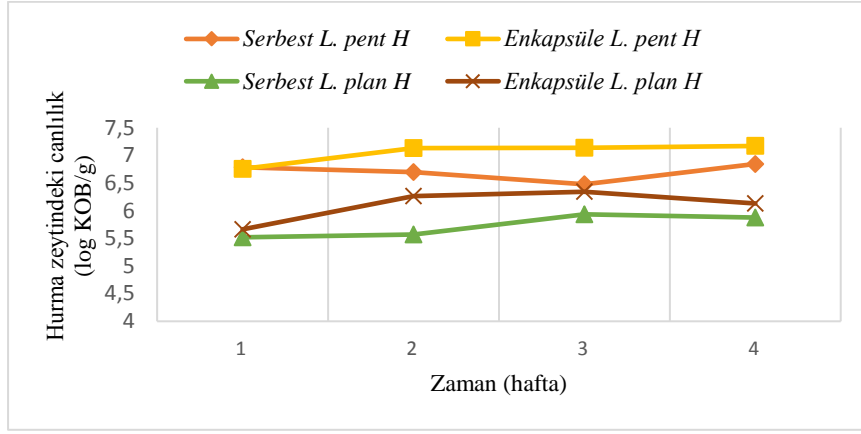
Kapsüllenen bakteriler zeytin yüzeyinde canlılıklarını önemli ölçüde korurken, serbest halde empregne edilen hücrelerin sayıları 1-2 log KOB/g azalmıştır.



Şekil 3. 5. Gemlik zeytin yüzeyine *L. pentosus* ve *L. plantarum* bakterilerinin empregnasyonu sonucunda zeytin yüzeyine tutunan bakteri sayısının 4 haftalık depolama sürecindeki değişimi

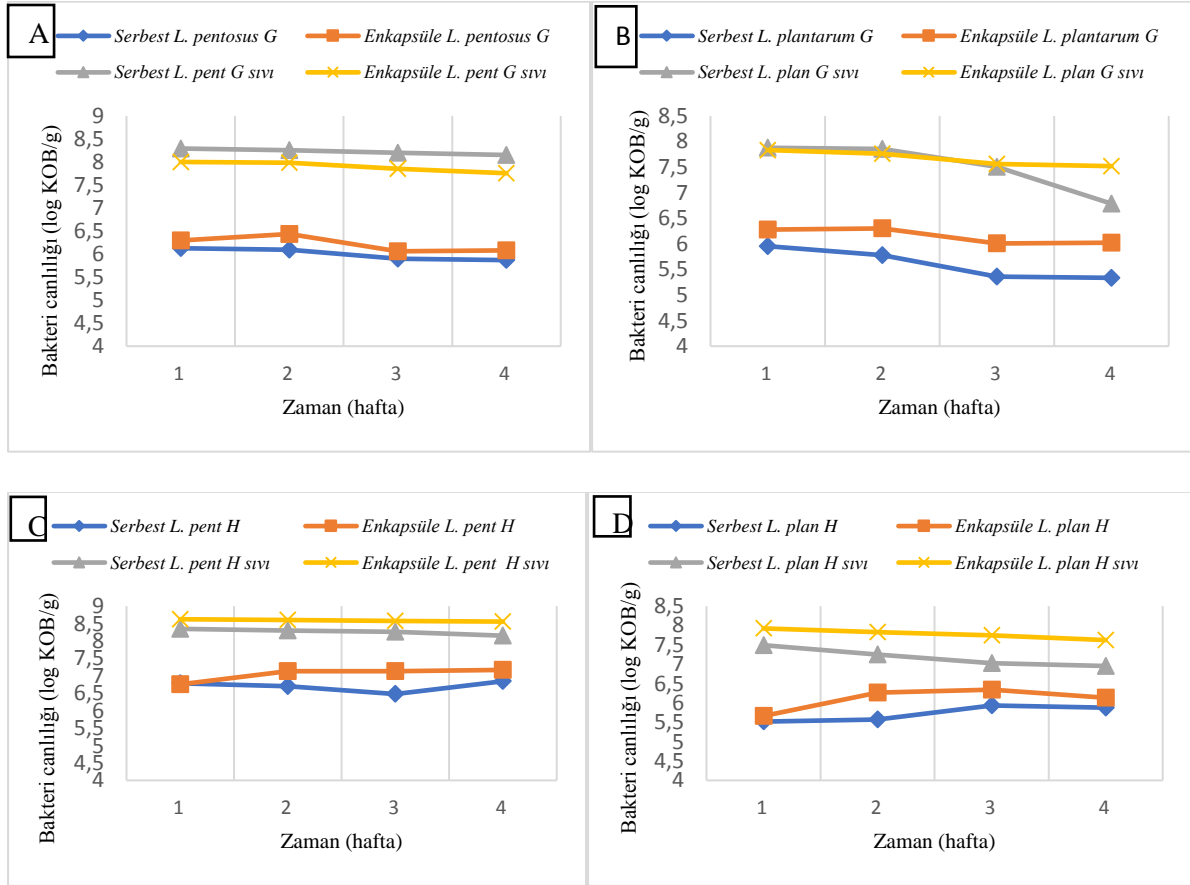
Enkapsüle bakterilerin gemlik zeytin yüzeyine empregnasyonunda başlangıçta 6,28 log KOB/g olan her iki probiyotik bakterinin canlılığında 4 hafta sonunda önemli bir değişim gözlenmemiştir. Serbest halde empregne edilen *L. pentosus* zeytin yüzeyinde canlılığını korurken 4 hafta sonunda serbest *L. plantarum* 5,33 log KOB/g olarak sayılmıştır.

Kontrol zeytin olarak kullanılan hurma zeytinde de aynı işlemler gerçekleştirilerek yüzeydeki bakterilerin sayımı yapılmıştır, ancak hurma zeytinin normal mikroflorasında da LAB'lerinin yer aldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla vakum empregnasyon ve dondurarak kurutma sonrası elde edilen sonuçların doğruluk değeri düşüktür. Hurma zeytin mikroflorası açısından zengin (Sözbilen ve Baysal, 2016) olduğu için bu projenin yürütülmesinde uygun bir faktör olmadığı anlaşılmıştır. Şekil 3.6'da gösterilen sonuçlarda ise beklenmeyen artışlar ve azalışlar mevcuttur.



Şekil 3. 6. Hurma zeytin yüzeyine *L. pentosus* ve *L. plantarum* bakterilerinin empregnasyonu sonucunda zeytin yüzeyine tutunan bakteri sayısının 4 haftalık depolama sürecindeki değişimi

Zeytinlerin yüzeyine probiyotik bakteri tutundurmak için hazırlanan empregnasyon sıvısında kalan bakterilerin miktarı da 1 aylık süre içerisinde haftalık olarak sayılmıştır (Şekil 3.7).

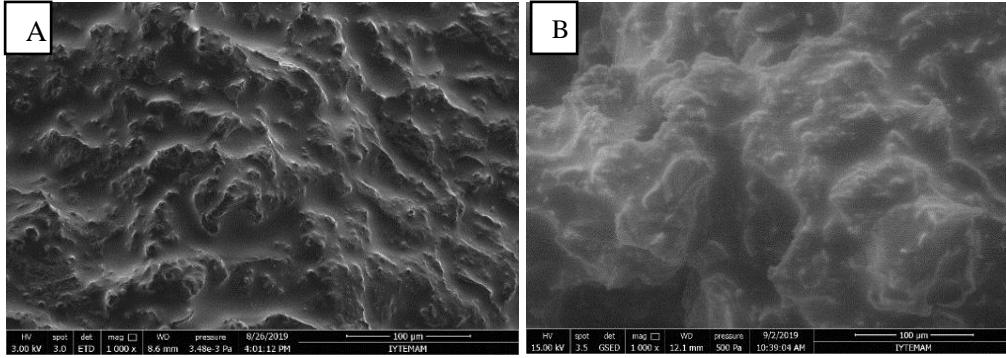


Şekil 3. 7. Gemlik ve hurma zeytinlerin yüzeyindeki ve empregnasyon sıvılarındaki bakterilerin canlılıklarının değişimi A) *L. pentosus*'un gemlik yüzeyinde ve empregnasyon sıvısındaki

canlılığının değişimi, B) *L. plantarum*'un gemlik yüzeyinde ve empregnasyon sıvısındaki canlılığının değişimi, C) *L. pentosus*'un hurma yüzeyinde ve empregnasyon sıvısındaki canlılığının değişimi, D) *L. plantarum*'un hurma yüzeyinde ve empregnasyon sıvısındaki canlılığının değişimi *L. pentosus* ile hazırlanan empregnasyon sıvısındaki bakteri canlılığında 4 haftalık depolama süresince önemli bir değişim gözlenmemiştir. Gemlik zeytinler için hazırlanan empregnasyon sıvıları ile zeytin yüzeyindeki bakteri sayımları arasında yaklaşık 1,5-2 log KOB/g fark bulunmuştur.

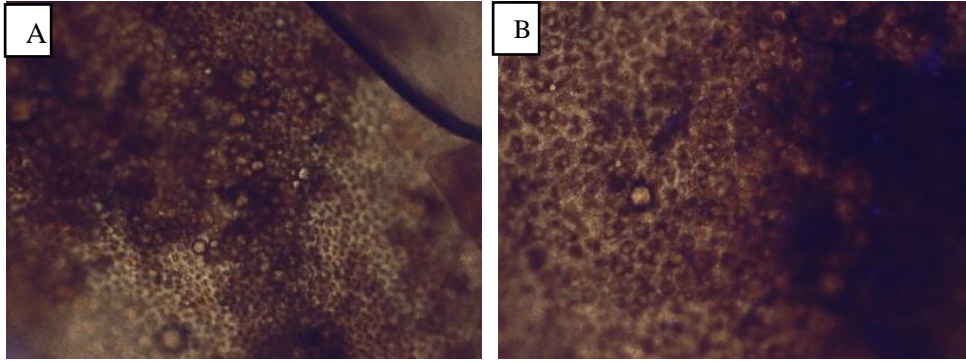
#### 4.4. Zeytin Yüzeyinin Mikroskopik İncelenmesi

Dondurarak kurutulmuş zeytin örnekleri taramalı elektron mikroskobundan görüntü almak için uygundur. EDX dedektörü ile yapılan inceleme öncesi zeytin yüzeyine altın kaplama yapılmıştır. ESEM dedektörü ile yapılan incelemede ise kaplama yapılmamıştır. Empregnasyon sıvısı zeytin yüzeyini kapladığı için net olarak bakteri görülememiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3. 8. Yüzeyine probiyotik bakteri empregne edilen gemlik zeytinin mikroskopik görüntüleri A) Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü, B) Çevresel taramalı elektron mikroskobu (ESEM) görüntüsü

Faz-kontrast mikroskobu görüntüleri zeytin yüzeyinden alınan ince bir kesit üzerine saf su damlatılarak alınmıştır. Görüntüler zeytin dokusunu ve bakteri mikrokapsüllerini açık bir şekilde göstermektedir (Şekil 3.9).



Şekil 3. 9. Yüzeyine probiyotik bakteri empregne edilen zeytinlerin faz - kontrast mikroskobu görüntüleri A) Hurma zeytinin mikroskobik görüntüsü, B) Gemlik zeytinin mikroskobik görüntüsü

#### 4.5. Zeytin Örneklerinin Mikrobiyolojik Açıdan Güvenilirliğinin Belirlenmesi

Gemlik ve hurma zeytinler analizlerde kullanılmadan önce MRS, PCA ve PDA besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Gemlik zeytini ile yapılan ekimlerde mikroorganizma gelişmesi yok iken, hurma zeytinde MRS besiyerinde  $1,85 \times 10^5$  KOB/g ve PCA besiyerinde  $5,45 \times 10^5$  KOB/g sayılmıştır. Dondurarak kurutma işlemi sonrasında her iki zeytin türünde de küf gelişimi gözlenmemiştir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği 15.11 maddesinde zeytinler için küf limiti  $10^3$  -  $10^4$  KOB/g olarak bildirilmiştir.

### 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Farklı konsantrasyonlarla hazırlanan PAS proteini konsantresi ve ksilan polimer kompleksi ile oluşturulan emülsiyonlar ile yapılan mikroenkapsülasyon sonucunda tüm konsantrasyonlarda (1:1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4) %90 üzerinde verimlilik elde edilmiştir. Probiyotik bakteri sayım sonuçları  $10,1367 \log$  KOB/g ile  $10,5854 \log$  KOB/g arasında değişmiştir. Mikroenkapsülasyon verimlilikleri yakın sonuçlar vermiştir, en yüksek verimliliğe 1:1 oranında oluşturulan polimer matrisi ile ulaşılmıştır, bu oranda mikroenkapsüle edilen *Lactobacillus pentosus*'ün canlılığı 16 hafta boyunca takip edilmiştir. Başlangıçtaki sayısı  $10,5854 \log$  KOB/g olan bakterinin 16 hafta sonunda sayısı  $8,7323 \log$  KOB/g'a düşmüştür. Sağlığa yararlı etkilerini gösterebilmesi için tüketilmesi gereken probiyotik bakteri miktarı  $6 \log$  KOB/g'dır (Prado vd., 2008). 16 hafta sonunda  $1,85 \log$  KOB/g'lık düşüş olmasına rağmen probiyotik bakteri sayısı belirtilen alt limitin üzerindedir ve bakterinin canlı kalma oranı %82'dir. *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495'in mikroenkapsülasyonu aynı emülsiyon tekniği ile ksilan yerine pullulan kullanılarak yapılmıştır. Başlangıçta  $9,51 \log$  KOB/g olan bakteri miktarı 30 gün sonunda  $7,87 \log$  KOB/g'ye düşmüş ve hayatta kalma oranı %82 olarak belirtilmiştir (Çabuk ve Harsa, 2015).

Mikroenkapsülasyonu sonucunda 4 hafta boyunca 4°C'de depolanan *Lactobacillus plantarum*'un canlılığında önemli bir değişim olmamıştır, başlangıçta 8,4771 log KOB/g olarak sayılan bakteri 4 hafta sonunda 8,4623 log KOB/g olarak sayılmıştır. Yapılan bir çalışmada %2 inulin varlığında mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilen *Lactobacillus plantarum*'un canlılığında 30 günlük depolama süresince 0,47 log KOB/g azalma gözlenmiştir (Valero-Cases ve Frutos, 2015). Alves vd., 2015 çalışmasında, adı geçen bakterinin emülsiyon olmayan bir yöntemle enkapsülasyonu sonucu zeytin ezmesindeki canlılığı raf ömrü boyunca serbest hücrelerle karşılaştırıldığında başarılı sonuç vermemiştir. Projemiz kapsamında %9 ksilan kullanılarak gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon ile bakteri sayısında 30 günlük depolamada sadece 0,0148 log azalma gözlenmiştir, bu süreçte bakterinin hayatta kalma oranı %99'dur. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada, *Lactobacillus plantarum*' u kapsüllemek için prebiyotik arabinoksilan ve aljinat kullanılmıştır. Probiyotik ve prebiyotikleri bir araya getiren bu simbiyotik enkapsülasyon ile yüksek kapsülleme etkinliği ve gastro-intestinal koşullara yüksek direnç elde edilmiştir (Wu ve Zhang, 2018). Dolayısıyla projemizde seçilen özgün simbiyotik ve emülsiyon tekniği ile mikroenkapsülasyonun, probiyotiklerin gıda ürünlerindeki canlılığını korumada güçlü etkileri olduğu sonucuna varılabilir.

Zeytinlerin yüzeyine bakteri tutundurmak/emdirmek için içerisinde en az 8 log KOB/g bakteri olacak şekilde empregnasyon sıvısı hazırlanmıştır. Vakum empregnasyon sonrası gerçekleştirilen liyofilizasyon ile bakterilerin zeytin yüzeyinde kalması sağlanmıştır. Sadece vakum empregnasyon bakterilerin zeytin yüzeyinde tutunup canlılığını korumasını sağlayamamaktadır. Ester vd., 2019'nın probiyotik *Lactobacillus salivarius*'un elma dilimlerine empregnasyonu için yaptığı çalışmada, enkapsüle edilmiş ve edilmemiş bakteriler kullanmıştır ve başlangıçta elma yüzeyindeki bakteri sayısı 6-7 log KOB/g iken 7 gün sonunda 1-2 log KOB/g azalma görülmüştür ve 14 gün sonunda bakteri canlılığını %60 oranında kaybetmiştir. Yürütülen bu projede de aynı şekilde zeytin yüzeyine probiyotik empregnasyonunda çok hızlı canlılık kaybı gözlenmiştir. Bu nedenle dondurarak kurutma işlemi uygulanarak canlılık kaybı 30 gün boyunca minimuma indirgenmiştir. Dondurularak kurutma işlemi, *Lactobacillus rhamnosus* emdirilmiş elma dilimlerinde bakteri canlılığını korumak için en iyi sistem olarak belirtilmiştir. Bu yöntem ile, *L. rhamnosus* canlılığında 1,1 log KOB/g azalma gözlenirken, 40°C'de taşınımlı (konvektif) kurutucu ve radyan enerji vakumuyla birleştirilmiş taşınımlı kurutucu ile kurutulan elma dilimlerinde sırasıyla 1,7 ve 2,1 log KOB/g kayıp meydana gelmiştir (Noorbakhsh vd., 2013). Bir başka çalışmada, *L. plantarum* ile zenginleştirilen elma küpleri dondurarak kurutma işlemine tabii tutulmuştur, ilk gün

7,99 log KOB/g olan canlı sayısı 25°C'de 120 gün muhafaza sonrasında 7,03 log KOB/g'a düşmüş ve böylece canlı sayısında sadece yaklaşık 1 log azalma gözlenmiştir (Cui vd., 2018).

Sonuçlar, hurma zeytin için olmasa da, gemlik zeytinin probiyotik bakterilerin vücuda taşınması için uygun bir araç olduğunu ortaya koymaktadır. Mikrobiyolojik analizlerden elde edilen sonuçlara göre, bir aylık raf ömrü süresince *L. pentosus* ve *L. plantarum* zeytin yüzeyinde canlılıklarını önemli ölçüde korumuşlardır. Serbest hücrelerin zeytin yüzeyine empregnasyonu sonucunda ise *L. plantarum*'un *L. pentosus*'a göre daha hassas bir bakteri olduğunu ortaya çıkmıştır. Enkapsüle hücrelerle yapılan empregnasyonda her iki bakterinin de canlı kalma oranı tüketim açısından uygundur ( $10^6$  KOB/g). Sonuç olarak, sofralık zeytinler yeni ve lezzetli fonksiyonel, bitkisel bir ürün üretmek için iyi bir gıda maddesi olabilir; zeytin yüzeyindeki canlı probiyotik suşlarının seviyesi  $10^6$  -  $10^7$  KOB/g arasında değişmiştir. Bu, porsiyon başına yaklaşık 10-15 zeytin alımı göz önüne alındığında (40-60 gram zeytine denk gelir), probiyotik suşlarının  $10^7$ - $10^8$  KOB arasında değişen bir miktarda vücuda alınabileceği anlamına gelir.

### **Öneriler**

Dondurarak kurutma yöntemi ile atıştırmalık probiyotik siyah zeytin üretilebilir, bu işlem için zeytinlerin çekirdeklerinin çıkartılması ve dilimlenmesi prosesi hızlandıracaktır ve kolay bir tüketim sağlayacaktır. Zeytinin artan fonksiyonel gıda özelliği, beraberinde tüketim yelpazesini genişletecek ve ihracat potansiyelinin artırılmasına ve çeşnilendirilmiş probiyotik zeytin üretimine yol açacaktır.

## KAYNAKÇA

- Aarti, C., Khusro, A., Varghese, R., Arasu, M.V., Agastian, P., Al-Dhabi, N.A., Ilavenil, S., Choi, K.C. 2018. "In vitro investigation on probiotic, anti-Candida, and antibiofilm properties of *Lactobacillus pentosus* strain LAP1", *Archives of Oral Biology*, 89, 99–106.
- Abriouel, H., Benomar, N., Perez-Pulido, R., Canamero, M. M., Galvez, A. 2012. "Annotated genome sequence of *Lactobacillus pentosus* MP-10, which has probiotic potential, from naturally fermented Aloreña green table olives", *Journal of Bacteriology*, 193, 4559-4560.
- Alegre, I., Vinas, I., Usall, J., Anguera, M., Abadias, M. 2011 "Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG", *Food Microbiology*, 28(1), 59-66.
- Alves, M., Peres, C.M., Hernandez-Mendonza, A., Bronze, M.R., Peres, C., Malcata, F.X. 2015. "Olive paste as vehicle for delivery of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 33", *Food Research International*, 75, 61-70.
- Alzamora, S.M., Salvatori, D., Tapia, M.S., Lopez-Malo, A., Welti-Chanes, J., Fito, P. 2005. "Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds", *Journal of Food Engineering*, 67, 205–214.
- Arena, M.P., Caggianiello, G., Fiocco D., Russo, P., Torelli, M., Spano, G., Capozzi, V. 2014. "Barley  $\beta$ - Glucans-containing food enhances probiotic performances of beneficial bacteria", *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 3025-3039.
- Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. 2013 "Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests", *Food Microbiology*, 33, 282-291.
- Argyri, A.A., Nisiotou, A.A., Mallouchos, A., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. 2014 "Performance of two potential probiotic *Lactobacillus* strains from the olive microbiota as starters in the fermentation of heat shocked green olives", *International Journal of Food Microbiology*, 171, 68-76.
- Betoret, N., Puente, L., Díaz, M.J., Pagán, M.J., García, M.J., Gras, M.L., Martínez-Monzó, J., Fito, P. 2003. "Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation", *Journal of Food Engineering*, 56, 273-277.



Betoret, E., Betoret, N., Arilla, A., Bennár, M., Barrera, C., Codoñer, P. 2012. "No invasive methodology to produce a probiotic low humid apple snack with potential effect against *Helicobacter pylori*", *Journal of Food Engineering*, 110, 289-293.

Blana, V.A., Polymeneas, N., Tassou, C.C., Panagou, E.Z. 2016. "Survival of potential probiotic lactic acid bacteria on fermented green table olives during packaging in polyethylene pouches at 4 and 20°C", *Food Microbiology*, 53, 71-75.

Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A., Spano, G., Fiocco, D. 2013. "Lactobacillus plantarum passage through an orogastro- intestinal tract simulator: carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis", *Microbiological Research*, 168(6), 351–359.

Börjesson, M., Larsson, A., Westman, G., Ström, A. 2018. "Periodate oxidation of xylan-based hemicelluloses and its effect on their thermal properties", *Carbohydrate Polymers*, 202, 280-287.

Bron, P.A., Kleerebezem, M., Brummer, R.J., Cani, P.D., Mercenier, A., MacDonald, T.T., Wells, J.M. 2017. "Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function?", *British Journal of Nutrition*, 117, 93–107.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. 2011. "Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications", *Journal of Food Engineering*, 104, 467-483.

Celebioglu, H.Y., Cekmecelioglu, D., Dervisoglu, M., Kahyaoglu, T. 2012. "Effect of extraction conditions on hemicellulose yields and optimisation for industrial processes", *International Journal of Food Science and Technology*, 47(12), 2597-2605.

Chen, H., Li, X., Liu, B., Meng, X. 2017. "Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions", *Journal of Functional Foods*, 29, 248-255.

Cui L., Niu L.-Y., Li D.-J., Liu C.-Q., Liu Y.-P., Liu C.-J., Song J.-F. 2018. "Effects of different drying methods on quality, bacterial viability and storage stability of probiotic enriched apple snacks", *Journal of Integrative Agriculture*, 17 (1), 247–255.

Çabuk, B., Harsa, S. 2015. "Protection of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 under in vitro gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(6), 650-656.

de Castro, A., Montano, A., Casado, F.J., Sánchez, A.H., Rejano, L. 2002. "Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation", *Food Microbiol*, 19, 637–644.

Doulgeraki, A.I., Hondrodinou, O., Eliopoulos, V., Panagou, E. 2012. "Lactic acid bacteria and yeast heterogeneity during aerobic and modified atmosphere packaging storage of natural black *Conservolea* olives in polyethylene pouches", *Food Control*, 26, 49-57.

Ebringerová, A. 2006. "Structural diversity and application potential of hemicelluloses", *Macromolecular Symposia*, 232 (1), 1-12.

Eslami, P., Davarpanah, L., Vahabzadeh, F. 2017. "Encapsulating role of  $\beta$ -cyclodextrin in formation of pickering water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing *Lactobacillus dellbrueckii*", *Food Hydrocolloids*, 64, 133-148.

Ester, B., Noelia, B., Laura, C.-J., Francesca, P., Cristina, B., Rosalba, L., Marco, D.R. 2019. "Probiotic survival and in vitro digestion of *L. salivarius* spp. *salivarius* encapsulated by high homogenization pressures and incorporated into a fruit matrix", *LWT*, 111, 883-888.

Fito, P., Chiralt, A. 2000. "An approach to the modeling of solid food-liquid operations: Application to osmotic dehydration", *Food engineering*, 231-252.

Fito, P., Chiralt, A., Barat, J.M., Andres, A., Martinez-Monzo, J., Martinez-Navarrete, N. 2001. "Vacuum impregnation for development of new dehydrated products", *Journal of Food Engineering*, 49, 297–302.

Flores-Andrade, E., Pascual-Pineda, L.A., Alarcon-Elvira, F.G., Rascon-Díaz, M.P., Pimentel-Gonzalez, D.J., Beristain, C.I. 2017. "Effect of vacuum on the impregnation of *Lactobacillus rhamnosus* microcapsules in apple slices using double emulsion", *Journal of Food Engineering*, 202, 18-24.

Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization 2002. "Guidelines for the evaluation of probiotics in food", London Ontario, Canada: United Nations.

Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., Noori, N. 2016. "Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions", *LWT - Food Science and Technology*, 69, 365-371.

Granato, D., Branco, G., Cruz, A.G., Faria, J.A.F., Shah, N. 2010. "Probiotic dairy products as functional foods", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 455-470.

Hansen, N.M.L., Plackett, D. 2008. "Sustainable films and coatings from hemicelluloses: A review", *Biomacromolecules*, 9(6), 1493-1505.

Heidebach, H., Först, P., Kulozik, U. 2012. "Microencapsulation of probiotic cells for food applications", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(4), 291-311.

Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., Rozès, N. 2008. "Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives", *Food Research International*, 41, 738-744.

Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S.V. 2015. "Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products", *Journal of Food Science and Technology*, 52 (8), 4679–4696.

International Olive Oil Council. "Market Newsletter-December 2017".

<http://www.internationaloliveoil.org/news/view/698-year-2018-news/934-market-newsletter-december-2017>, Son erişim tarihi: 12 Nisan 2018.

Jin, X., Hu, Z., Wu, S., Song, T., Yue, F., Xiang, Z. 2019. "Promoting the material properties of xylan-type hemicelluloses from the extraction step", *Carbohydrate Polymers*, 215, 235-245.

Kailasapathy, K. 2006. "Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt", *LWT - Food Science and Technology*, 39 (10), 1221-1227.

Kountouri, A. M., Mylona, A., Kaliora, A. C., Andrikopoulos, N. K. 2007. "Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans", *Phytomedicine*, 14, 659–667.

Krasaekoopt, W., Suthanwong, B. 2008. "Vacuum impregnation of probiotics in fruit pieces and their survival during refrigerated storage", *Kasetsart J.*, 42, 723-731.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S.L., Angelis, M.D., Morelli, L., Callegari, M.L., Rizzello, C.G., Visconti, A. 2005. "Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food", *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4233–4240.

Lipinska, L., Klewicki, R., Sójka, M., Bonikowski, R., Żyżelewicz, D., Kołodziejczyk, K., Klewicka, E. 2017. "Antifungal activity of *Lactobacillus pentosus* ŁOCK 0979 in the presence of polyols and galactosyl-polyols", *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.

Lipinska, L., Klewicki, R., Klewicka, E., Kobodziejczyk, K., Sójka, M., Nowak, A. 2016. "Antifungal activity of *Lactobacillus* sp. bacteria in the presence of xylitol and galactosyl-xylitol", *BioMed Research International*.

Liu, Y., Xie, X., Ibrahim S.A., Khaskheli S.G., Yang, H., Wang, Y., Huang, W. 2016. "Characterization of *Lactobacillus pentosus* as a starter culture for the fermentation of edible oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.)", *LWT - Food Science and Technology*, 68, 21-26.

Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B.C. 2001. "Yogurt as probiotic carrier food", *International Dairy Journal*, 11, 1–17.

Manivannan, P., Rajasimman, M. 2008. "Osmotic dehydration of beetroot in salt solution: optimization of parameters through statistical experimental design", *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*, 2(1).

Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., Hutkins, R. 2017. "Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond", *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102.

Mojgani, N., Hussaini, F., Vaseji, N. 2015. "Characterization of indigenous *Lactobacillus* strains for probiotic properties", *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(2), e17523.

Muhialdin, B.J., Hassan, Z., Sadon, S.K. 2011. "Antifungal activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004, and *L. paracasei* D5 on selected foods", *Journal of Food Science*, 76, 493-499.

Noorbakhsh, R., Yaghmaee, P., Durance, T. 2013. "Radiant energy under vacuum (REV) technology: A novel approach for producing probiotic enriched apple snacks", *Journal of Functional Foods*, 5 (3), 1049-1056.

Okkers, D.J., Dicks, L.M.T., Silvester, M., Joubert, J.J., Odendaal, H.J. 1999. "Characterization of pentocin TV35b: A bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*", *Journal of Applied Microbiology*, 87, 726–734.

- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y. 2006. "Probiotics and their fermented food products are beneficial for health", *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1171–1185.
- Peres, C.M., Peres, C., Hernandez-Mendoza, A., Malcata, X.F. 2012. "Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - With an emphasis on table olives", *Trends in Food Science & Technology*, 26, 31-42.
- Pimentel-González, D., Campos-Montiel, R., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., Vernon-Cartera, E. 2009. "Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions", *Food Research International*, 42(2), 292-297.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A., Socol, C.R. 2008. "Trends in nondairy probiotic beverages", *Food Res Intl*, 41(2), 111-123.
- Ribeiro, M., Chaves, K., Gebara, C., Infante, F., Grosso, C., Gigante, M. 2014. "Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt", *Food Research International*, 66, 424-431.
- Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y. 2010. "Non-dairy probiotic products", *Food Microbiology*, 27, 1-11.
- Rodrigues, S., Silva, L.C.A., Mulet, A., Cárcel, J.A., Fernandes, F.A.N. 2018. "Development of dried probiotic apple cubes incorporated with *Lactobacillus casei* NRRL B-442", *Journal of Functional Foods*, 41, 48–54.
- Rodríguez-Gomez, F., Romero-Gil, V., García-García, P., Garrido-Fernandez, A., Arroyo-Lopez, F.N. 2014. "Fortification of table olive packing with the potential probiotic bacteria *Lactobacillus pentosus* TOMC-LAB2", *Frontiers in Microbiology*. 5(467), 1-9.
- Russo, P., de Chiara, M.L.V., Vernile, A., Amodio, M.L., Arena, M.P., Capozzi, V., Massa, S., Spano, G. 2014. "Fresh-cut pineapple as a new carrier of probiotic lactic acid bacteria", *Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International*, 309183.
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., Margolles, A. 2016. "Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease", *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(1), 1600240.

Saxami, G., Karapetsas, A., Lampranidou E., Kotsianidis I., Chlichlia A., Tassou C., Zoumpourlis V., Galanis A. 2016. "Two potential probiotic lactobacillus strains isolated from olive microbiota exhibit adhesion and anti-proliferative effects in cancer cell lines", *Journal of Functional Foods*, 24, 461–471.

Shah, N.P., Ding, W.K., Fallourd, M.J., Leyer, G. 2010. "Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants", *Journal of Food Science*, 75, 278–282.

Sharma, M., Devi, M. 2014. "Probiotics: A comprehensive approach toward health foods", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(4), 537-552.

Silva, K.S., Fernandes, M.A., Mauro, M.A. 2014. "Effect of calcium on the osmotic dehydration kinetics and quality of pineapple", *Journal of Food Engineering*, 134, 37-44.

Sözbilen, G.S., Baysal, A.H. 2016. "Microbial profile and bacterial characterisation of naturally debittered Hurma olives compared to non-debittered Erkence variety during ripening period", *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 2099–2105.

Sun, F., Kong, B., Chen, Q., Han, Q., Diao, X. 2017. "N-nitrosoamine inhibition and quality preservation of Harbin dry sausages by inoculated with *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*", *Food Control*, 73, 1514-1521.

Tatar, F., Tunç, M.T., Dervisoglu, M., Cekmecelioglu, D., Kahyaoglu, T. 2014. "Evaluation of hemicellulose as a coating material with gum arabic for food microencapsulation", *Food Research International*, 57, 168-175.

Teresa, Z., Paolo, P., Eugenio, P., Giovanni, S., Annamaria, R. 2008. "Characterization of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs for Cornetto, a traditional bread produced in Basilicata (Southern Italy)", *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 1785-1795.

Tharmaraj, N., Shah, N.P. 2003. "Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and Propionibacteria", *Journal of Dairy Science* 86, 2288-2296.

Türkiye İstatistik Kurumu. 2018. "Zeytin Üretimi".

[http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001). Son erişim tarihi: 12 Eylül 2019.

Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme Ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (2006/34),

<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2006/07/20060707-14.htm>, Son erişim tarihi: 12 Nisan 2018.

Türk Gıda Kodeksi. "Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği".

<https://www.trbism.gov.tr/images/files/mevzuat/tebligler/turk-gida-kodeksi-mikrobiyolojik-kriterler-tebliği-ve-d-.pdf> , Son erişim tarihi: 12 Nisan 2018.

Ursachi, C., Segal, R., Muresan, C. 2009. "Vacuum impregnation pretreatment of fresh cut vegetable", Bulletin of Engineering, 2, 17-20.

Valero-Cases, E., Frutos, M.J. 2015. "Effect of different types of encapsulation on the survival of Lactobacillus plantarum during storage with inulin and in vitro digestion", LWT - Food Science and Technology, 64 (2), 824-828.

Voulgari, K., Hatzikamari, M., Delepoglou, A., Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. 2010. "Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products", Food Control, 21, 136–142.

Wu, Y., Zhang, G. 2018. "Synbiotic encapsulation of probiotic Lactobacillus plantarum by alginate-arabinoxylan composite microspheres", LWT, 93, 135-141.

Yadav, M.P., Johnston, D.B., Hicks, K.B. 2009. "Corn fiber gum: New structure/function relationships for this potential beverage flavor stabilizer", Food Hydrocolloids, 23(6), 1488-1493.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. HAYRİYE ŞEBNEM HARSA
Proje No:	118O555
Proje Başlığı:	Peynir Altı Suyu (Pas) Proteini-Hemiselüöz Kompleksine Lactobacillus Pentosus'un Mikroenkapsülasyonu ve Sofralık Zeytine Emregnasyonu
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	AYŞE HANDAN BAYSAL
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2018 - 01/10/2019
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29997.67
Öz:	<p>Proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların amacı, probiyotik özellikteki Lactobacillus pentosus NRRL-B 227 suşunun, emülsiyon yöntemi ile enkapsüle edilmesi ve sofralık siyah zeytinlerin yüzeyinin probiyotiklerle kaplanmasıdır. Bu doğrultuda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ksilan ve peynir altı suyu proteini konsantresi kompleksi kullanılarak emülsiyon tekniği ile mikroenkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Zeytin yüzeyini kaplama işlemi için ise vakum emregnasyon yöntemi ve ardından dondurarak kurutma işlemi yapılmıştır. Bir ay süresince zeytinin yüzeyindeki enkapsüle probiyotik hücrelerin canlılığının takibi yapılarak enkapsüle edilmeyen probiyotik zeytin örnekleriyle karşılaştırılması yapılmıştır. %9 ksilan ve %9 peyniraltı suyu proteini konsantresi kullanılarak yapılan enkapsülleme en yüksek verimliliğe sahiptir. Dört ay sonunda L. pentosus'un canlı kalma oranı %82'dir. Gemlik zeytin yüzeyine probiyotik tutundurmak için yapılan vakum emregnasyon ve dondurarak kurutma sonrasında, bakteri canlılığı sabit kalmıştır. Zeytin yüzeyinde hem enkapsüle hem de serbest haldeki L. pentosus canlılığını önemli ölçüde korumuştur. Kontrol bakteri olarak kullanılan Lactobacillus plantarum DSM 1954, enkapsüle halde zeytin yüzeyinde canlılığını korurken serbest halde canlılık kaybı gözlenmiştir. Enkapsüle bakterilerin gemlik zeytin yüzeyine emregnasyonunda başlangıçta 6,2-6,3 log KOB/g olan her iki probiyotik bakterinin canlılığında 4 hafta sonunda önemli bir değişim gözlenmemiştir. Serbest halde emregne edilen L. pentosus zeytin yüzeyinde canlılığını korurken 4 hafta sonunda serbest L. plantarum 5,33 log KOB/g olarak sayılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enkapsüle edilen probiyotiklerin gemlik zeytin üzerine emregnasyonu gerçekleştirilerek, mide-bağırsak sistemi sağlığı açısından zeytin, probiyotik bakteriler için uygun bir taşıyıcı olabilir.</p>
Anahtar Kelimeler:	probiyotik, siyah zeytin, suyu proteini, ksilan, mikroenkapsülasyon, vakum emregnasyon
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır