



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**NAR SİRKEŞİNE EKLENEN MİKROENKAPSÜLE
Saccharomyces boulardii MAYASININ CANLILIĞININ
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rumeysa ETLİK

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Deniz KOÇAN**

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 212324407 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Rumeysa ETLİK tarafından hazırlanan “**NAR SİRKESİNE EKLENEN MİKROENKAPSÜLE *Saccharomyces boulardii* MAYASININ CANLILIĞININ BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Deniz KOÇAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Fatma ŞAHMURAT

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Gökçe POLAT YEMİŞ

Sakarya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 28/06/2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Rumeysa ETLİK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren, tezimin hazırlanmasında ve laboratuvar aşamasında yardımları ve yönlendirmeleriyle büyük katkı sağlayan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Deniz KOÇAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca beni her zaman destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Fatma ŞAHMURAT, Doç. Dr. Aysun YÜCETEPE, Arş. Gör. Dr. Halil İbrahim KAHVE ve Arş. Gör. Dr. Furkan AYDIN ve Gıda Mühendisliği Bölümü bütün hocalarıma,

Yüksek Lisans eğitimime başladığımda ve tez sürecim boyunca teknik yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Gıda Yüksek Mühendisi Mervenur ÖZBEK, Gıda Mühendisliği ABD. Tezli Yüksek Lisans öğrencileri Seda ÖZKAN ve Kamran BAGHİROV'a,

Tezimde kullanmış olduğum Nar Sirkesinin üretimini gerçekleştiren Ziraat Mühendisi Fatma MUTLU ve ailesi Selma MUTLU ile Yusuf MUTLU'ya

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan her ne konuda olursa olursun maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen başta annem Tülay ETLİK, babam Harun ETLİK, abim Numan ETLİK'e ve ailemin diğer fertlerine çok teşekkür ederim.

Rumeysa ETLİK
AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Sirke.....	5
2.1.1 Sirke üretim yöntemleri	5
2.1.2 Nar sirkesi bileşimi ve özellikleri	10
2.1.3 Nar sirkesinin insan sağlığına olan etkileri.....	11
2.2 <i>Saccharomyces boulardii</i>	12
2.2.1 Taksonomi ve etki mekanizması	13
2.2.2 <i>S. boulardii</i> 'nin sağlık üzerine etkileri	15
2.2.3 Fermante gıdalarda <i>S. boulardii</i> kullanımı	15
2.3 Mikroenkapsülasyon	20
2.3.1 Mikroenkapsülasyon yöntemleri	25
2.3.2 Mikroenkapsülasyonda kullanılan bazı polimerlerin özellikleri	28
2.3.2.1 Sodyum aljinat	29
2.3.2.2 Kitosan	30
2.3.2.3 İnülin	31
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1 Materyal.....	33
3.1.1 Nar sirkesi	33
3.1.2 <i>Saccharomyces boulardii</i> kültürü	33
3.1.3 Besiyerleri, polimerler ve kimyasallar	33
3.2 Metot	34
3.2.1 <i>S. boulardii</i> kültür aktivasyonu.....	34
3.2.2 Polimer çözeltilerin hazırlanması	35
3.2.3 <i>S. boulardii</i> maya çözeltisinin hazırlanması	36
3.2.4 <i>S. boulardii</i> 'nin ekstrüzyon yöntemiyle mikroenkapsülasyonu	36
3.2.5 <i>S. boulardii</i> mayasının nar sirkesine ilavesi	38
3.2.6 <i>S. boulardii</i> mayasının mikrokapsüllerden salınımı	40
3.2.7 Mikroenkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi	41
3.3 Nar Sirkesine Uygulanan Kimyasal Analizler	41
3.3.1 pH tayini	41
3.3.2 Titrasyon asitliği değeri tayini	41
3.3.3 Suda çözünür kuru madde miktarı tayini	42
3.3.4 Organik asit tayini.....	42
3.4 <i>S. boulardii</i> İlaveli Nar Sirkelerine Uygulanan Kimyasal Analizler.....	43
3.4.1 pH tayini	43
3.4.2 Titrasyon asitliği değeri tayini	43
3.4.3 Suda çözünür kuru madde miktarı tayini	44
3.5 <i>S. boulardii</i> Maya Sayısı	44
3.6 İstatiksel Analizler	45

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	46
4.1 Nar Sirkesinin Kimyasal Analiz Sonuçları	46
4.2 Mikroenkapsülasyon Etkinliği Sonuçları	49
4.3 <i>S. boulardii</i> İlaveli Nar Sirkesinin Kimyasal Analiz Sonuçları	49
4.3.1 pH değeri	50
4.3.2 Titrasyon asitliği değeri	54
4.3.3 Suda çözünür kuru madde miktarı	57
4.4 <i>S. boulardii</i> Maya Sayısı	58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	82



YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAR SİRKESİNE EKLENEN MİKROENKAPSÜLE *Saccharomyces boulardii* MAYASININ CANLILIĞININ BELİRLENMESİ

Rumeysa ETLİK

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Deniz KOÇAN

ÖZET

Dünya nüfusundaki laktoz intoleransı (%65), süt alerjileri ve artan vejetaryenlik eğilimi göz önüne alındığında süt ürünü olmayan yeni probiyotik gıdalara olan ilgi her geçen gün artmaktadır. *Saccharomyces boulardii*, güvenilirliği EFSA (European Food Safety Authority) tarafından kanıtlanmış, çocuk ve yetişkinlerde mikrobiyel ve antibiyotik kaynaklı diyare gibi gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde koruyucu ve tedavi edici olarak kullanılan probiyotik bir mayadır. Düşük pH ve organik asitlere karşı çok iyi bir dirence sahip olması nedeniyle meyveli, fermente ve asitli gıdalarda *S. boulardii* kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır. Enkapsülasyon yöntemi yüksek asitlik gibi stres koşullarından probiyotiklerin korunmasında etkili olmaktadır.

Bu tez çalışmasında *S. boulardii* CNCM I-745 (Biocodex, Fransa) probiyotik mayası, serbest hücre (SH) formunda, inülin prebiyotiği eklenmiş aljinat (ALG-INU) ve çift tabaka aljinat ve kitosan (CTS-ALG-INU) polimerleriyle simbiyotik mikroenkapsüle edilerek nar sirkesine (3.6 pH) eklenmiştir. Nar sirkesi örneklerinin $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 4 hafta depolama süresi boyunca haftalık olarak bazı kimyasal özellikleri (titrasyon asitliği değeri, pH değeri, suda çözünür kuru madde miktarı) ve *S. boulardii* maya sayısı belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda başlangıçta nar sirkesine ~ 8 log kob/mL düzeyinde eklenen *S. boulardii* maya sayısının $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 4 hafta depolama süresi sonunda SH; ALG-INU ve CTS-ALG-INU için sırasıyla 4.27; 7.24 ve 5.02 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Nar sirkesi ortamında aljinat polimerinin *S. boulardii* mayasını kitosana kıyasla çok daha iyi koruduğu anlaşılmıştır. Kitosan polimerinin asetik asit ile etkileşime geçerek maya üzerinde olumsuz etki oluşturduğu düşünülmektedir. pH ve titrasyon asitliği değerlerine göre *S. boulardii* mayasının nar sirkesinde herhangi bir fermantasyona neden olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, yüksek asitli fermante gıdalarda *S. boulardii* mayasının kullanımına dair bundan sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: *S. boulardii*, Probiyotik maya, Probiyotik nar sirkesi, Simbiyotik mikroenkapsülasyon, Kitosan, Aljinat, Ekstrüzyon metodu.

Haziran, 2024; 82 sayfa

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF THE VIABILITY OF MICROENCAPSULATED *Saccharomyces boulardii* YEAST ADDED TO POMEGRANATE VINEGAR

Rumeysa ETLİK

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Deniz KOÇAN

ABSTRACT

Considering lactose intolerance (65%), milk allergies and the increasing trend towards vegetarianism in the world population, interest in new non-dairy probiotic foods is increasing day by day. *Saccharomyces boulardii* is a probiotic yeast whose reliability has been proven by EFSA (European Food Safety Authority) and is used as a preventive and therapeutic agent in the treatment of gastrointestinal disorders such as microbial and antibiotic-induced diarrhea in children and adults. *S. boulardii* has the potential to be used in fruity, fermented and acidic foods due to its low pH and high resistance to organic acids. The encapsulation method is effective in protecting probiotics from stress conditions such as high acidity.

In this thesis study, *S. boulardii* CNCM I-745 (Biocodex, France) probiotic yeast, in free cell (SH) form, was encapsulated in symbiotic microencapsulates with inulin prebiotic added alginate (ALG-INU) and bilayer alginate and chitosan (CTS-ALG-INU) polymers and added to pomegranate vinegar (3.6 pH). Some chemical properties (titratable acidity value, pH value, amount of water-soluble dry matter) and the number of *S. boulardii* yeasts of pomegranate vinegar samples were determined weekly during the 4 week storage period at $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

As a result of the study, the numbers of *S. boulardii* yeast initially added to pomegranate vinegar at the level of $\sim 8 \log \text{cfu/mL}$ at the end of 4 weeks storage at $4\pm1^{\circ}\text{C}$ for SH, ALG-INU and CTS-ALG-INU the living cell numbers were determined as 4.27, 7.24 and 5.02 $\log \text{cfu/mL}$ respectively. It has been understood that alginate polymer protects *S. boulardii* yeast in pomegranate vinegar environment much better than chitosan. It is thought that chitosan polymer interacts with acetic acid and has a negative effect on yeast. According to pH and titratable acidity values, it was concluded that *S. boulardii* yeast did not cause any fermentation in pomegranate vinegar. The results obtained from this study will shed light on future studies on the use of *S. boulardii* yeast in high-acidic fermented foods.

Keywords: *S. boulardii*, Probiotic yeast, Probiotic pomegranate vinegar, Synbiotic microencapsulation, Chitosan, Alginate, Extrusion method.

June, 2024; 82 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sirkedeki etil alkol ve asetik asit fermantasyonu.	6
Şekil 2.2. Sirke üretim akış şeması.	8
Şekil 2.3. Pastör yönteminde kullanılan fiçılar.	9
Şekil 2.4. Nar sirkesi.	11
Şekil 2.5. Akışkan yatak püskürterek kaplama.	27
Şekil 2.6. Ekstrüzyon ve emülsiyon tekniği.	28
Şekil 2.7. Sodyum aljinatın kimyasal yapısı.	29
Şekil 2.8. Kitosanın kimyasal yapısı.	30
Şekil 2.9. İnülinin kimyasal yapısı.	32
Şekil 3.1. Nar sirkesi (ev tipi üretim).	33
Şekil 3.2. <i>S. boulardii</i> kültürünün santrifüj işlemi.	36
Şekil 3.3. Steril şırınga ile mikrokapsül eldesi.	37
Şekil 3.4. Aljinat, inülin ve kitosan kaplı mikrokapsüller.	37
Şekil 3.5. Ekstrüzyon yöntemi.	38
Şekil 3.6. <i>S. boulardii</i> ilaveli nar sirkesi üretim akış şeması.	39
Şekil 3.7. <i>S. boulardii</i> ilaveli nar sirkesi örnekleri.	40
Şekil 4.1. Nar sirkesi organik asit kromatogramı.	48
Şekil 4.2. Nar sirkesi örneklerinin pH değerlerinin depolama süresince değişimi. ...	52
Şekil 4.3. Nar sirkesi örneklerinin titrasyon asitliği (% asetik asit) değerlerinin depolama süresince değişimi.	56
Şekil 4.4. Nar sirkesi örneklerinin maya sayılarının (log kob/mL) depolama süresince değişimi.	65
Şekil 4.5. Nar sirkesi örneklerinin maya sayılarındaki logaritmik azalma.	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Yüksek asitli gıdalarda probiyotik mikroorganizmaların enkapsülasyonu üzerine yapılmış çalışmalar.	24
Çizelge 2.2. Mikroenkapsülasyon teknolojisinde kullanılan kaplama materyalleri, uygulama yöntem ve alanları.	25
Çizelge 3.1. Tez deneme planı.	39
Çizelge 3.2. HPLC cihaz bilgileri ve metot.	43
Çizelge 4.1. Nar sirkesinin kimyasal analiz sonuçları.	46
Çizelge 4.2. Mikrokapsüllerin enkapsülasyon etkinliği sonuçları.	49
Çizelge 4.3. <i>S. boulardii</i> ilaveli nar sirkesinin pH değerleri.	50
Çizelge 4.4. <i>S. boulardii</i> ilaveli nar sirkesinin titrasyon asitliği (% asetik asit) değerleri	55
Çizelge 4.5. <i>S. boulardii</i> ilaveli nar sirkesinin maya sayıları (log kob/mL).	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAB	Asetik asit bakterisi
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ALG-INU	Aljinat-İnülin
ANOVA	Analysis of variance
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATP	Adenozin trifosfat
C₂H₅OH	Etanol
CaCl₂	Kalsiyum klorür
CH₃COOH	Asetik asit
Cm	Santimetre
CTS-ALG-INU	Kitosan-Aljinat-İnülin
Da	Dalton
Dk	Dakika
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FTS	Fizyolojik tuzlu su
g	Gram
GOS	Galaktooligosakkaritler
H₂SO₄	Sülfürik asit
H₂O	Su
IBS	Huzursuz bağırsak sendromu
IgA	İmmünoglobulin A
IgG	İmmünoglobulin G
INU	İnülin
ISAPP	Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Birliği
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
KH₂PO₄	Potasyum di hidrojen fosfat
kob	Koloni oluşturma birimi
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterisi
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
log	Logaritma
Mek	Mikroenkapsülasyon
M	Mol
m/v	Hacimce oran
mL	Mililitre
Na	Sodyum
Na₂HPO₄	Di sodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
PBS	Phosphate buffer saline
pK	Polikasyonik özellik
pH	Potansiyel hidrojen
ppm	Milyonda bir birim, mg/kg

rpm	Dakikada dönüş hızı
<i>S. boulardii</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SH	Serbest Hücre
spp.	Alt tür
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WPI	Peynir altı suyu proteini
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
YGC	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol
α	Alfa
β	Beta
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde
>	Büyüktür
<	Küçüktür
$\sim$	Yaklaşık

1. GİRİŞ

Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Birliği (ISAPP), Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) probiyotikleri “Yeterli miktarda uygulandığında konakçının vücuduna sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamıştır (FAO/WHO, 2001; Hill vd., 2014). Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri arasında bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesi, patojen bakteri gelişiminin önlenmesi, enfeksiyonlara karşı direncin artırılması ve bağışıklık sisteminin desteklenmesi başta gelmektedir. Besin değerinin ötesinde sağlığa ekstra faydası olan gıdalar olarak tanımlanan fonksiyonel gıdalar içinde yer alan probiyotik gıdalar, fonksiyonel gıda pazarının %70’ini temsil etmekte olup sektörde hızlı gelişim göstermektedir (McFarland, 2010; Ohland ve Macnaughton, 2010; Khan vd., 2013). Araştırmacılar son yıllarda kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer, osteoporoz gibi kronik hastalıkları önlemeye ve sağlıklı bir hayat sürmeye yardımcı olacak fonksiyonel gıdaların geliştirilmesine yönelik araştırmalara yönelmişlerdir (Sadler, 2005).

Saccharomyces boulardii, EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) tarafından güvenilir kabul edilmiş, sağlık üzerine yararlı etkileri kanıtlanmış, bakteriyel, viral ve antibiyotiğe bağlı akut ve kronik diyare tedavisinde başarılı sonuçlar veren probiyotik bir mayadır. Gıda kökenli olan bu maya, insan gastrointestinal sistemini düzenleyerek bağırsaklarda bulunan faydalı mikroorganizmaların tekrar kolonize olmasını sağlamaktadır (EFSA, 2010; McFarland, 2010). İnsan kaynaklı bir probiyotik maya olmamasına rağmen *S. boulardii* insan vücut sıcaklığı olan 37 °C’de çok rahat gelişmekte olup mide asidine, safra tuzlarına, pankreatik sıvılara ve antibiyotik uygulamasına karşı dayanıklılık göstermektedir (Karaolis vd., 2013). *S. boulardii* yaygın olarak klinik çalışmalarda preparat olarak kullanılmakta olup gıdalar yoluyla vücuda alınması konusunda literatürde oldukça az sayıda araştırma bulunmaktadır.

Sirke, çok eski yıllardan beri çeşitli hammaddelerden farklı yöntemler kullanılarak, asetik asit fermentasyonu ile üretilen fermante bir gıdadır. Sirkede bulunan organik asitler, fenolik bileşikler, amino asitler, vitaminler ve melanoidinler sirkenin organoleptik özelliklerini etkilemekte olup aynı zamanda antimikrobiyel, antioksidan, antidiyabetik, antitümör, antikarsinojenik, antienfeksiyon etkilerinin oluşumunu da sağlamaktadır (Budak vd., 2011).

Dünya nüfustaki laktoz intoleransı (%65), süt alerjileri ve artan vejetaryenlik eğilimi göz önüne alındığında süt ürünü olmayan yeni probiyotik gıdaların üretimine yönelik artan bir ilgi bulunmaktadır (Lillo-Perez vd., 2021; Mantzourani vd., 2019). Bu ilgi, süt içermeyen yeni fonksiyonel gıdaların geliştirilmesine yol açmış ve fitokimyasallar, tıbbi bitkiler, doğal antioksidanlar, probiyotikler, prebiyotikler, biyoaktif peptitler gibi sağlığı teşvik eden yeni biyoaktif bileşiklerin araştırılmasını gerekli hale getirmiştir (Fernandes vd., 2019). Özellikle pandemiden sonra, bağışıklık sistemini geliştiren gıdalar üzerine olan çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda sindirim sistemi mikrobiyotası ile sağlıklı beslenme ve yaşam arasında doğrudan bir ilişki olduğu netlik kazanmıştır. Günümüzde probiyotikler sağlığın korunmasında ve birçok hastalığın tedavi edilmesinde tercih edilmektedir. Bu çalışma ile sirke gibi antioksidan madde zengini fermante bir gıdaya *S. boulardii* mayası eklenerek sağlık için ekstra faydalar sunan, yeni bir fonksiyonel gıda üretimi gerçekleştirilmiştir. Probiyotik nar sirkesinin fonksiyonel bir gıda olmasının yanında diyare tedavisinde ilaç almakta zorlanan bireyler için de alternatif bir yol olabileceği düşünülmektedir.

Probiyotik mikroorganizmalar, gıda işleme, muhafaza, gastrointestinal sistem ve çevre şartlarına karşı önemli ölçüde duyarlı olup canlılıklarını büyük oranda kaybetmektedir. Gastrointestinal sistemden geçiş sırasında, özellikle mide asitliği olan 1.5-2.0 pH arasında probiyotik mikroorganizmaların çoğunun canlılığı olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu tez çalışmasında tercih edilen *S. boulardii* mayasının diğer probiyotiklere göre asit stresine karşı daha dayanıklı olduğu çeşitli çalışmalar ile belirlenmiştir (Alkan, 2012; Czerucka vd., 2007; McFarland, 2015). Sirke yüksek asitli gıdalar arasında değerlendirilmekte olup nar sirkesinin asitliği 3.0-3.6 pH arasında değişmektedir (Öztürk vd., 2015). *S. boulardii*'nin yüksek asitli, meyve bazlı gıdalarda kullanımına dair az sayıda literatür bilgisi mevcuttur. Bunlar arasında; kaju suyu (Santana vd., 2020), elma suyu ve parçaları (Farinazzo vd., 2020), elma parçaları (Gallo vd., 2014), üzüksü meyveler (Fratianni vd., 2014), domates ve havuç suyu (Sivudu vd., 2016), karpuz, kırmızı pancar ve siyah havuç suyu (Değirmencioğlu vd., 2016) yer almaktadır. Sirkede *S. boulardii* kullanımına dair literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamış olup bu çalışma ilk olma özelliği taşımaktadır.

Yüksek asitli gıdalara eklenen probiyotikler depolama süresi boyunca ortam koşullarından etkilenecek canlılıklarını kaybedebilmektedir. Mikroenkapsülasyon, probiyotiklerin yüksek asitlik gibi olumsuz ortam koşullarından etkilenmelerinin önüne geçebilmek için onların çeşitli polimerlerle kaplanması şeklinde uygulanan bir yöntemdir (Palamutoğlu ve Sarıçoban, 2013). Kullanılan bu polimerlerin farklı stres koşullarına karşı koruyucu fiziksel bariyer oluşturma potansiyelleri de değişmektedir. Mikroenkapsülasyon metodunda en yaygın kullanılan polimer, farklı alg türlerinden elde edilen aljinattır. Aljinat polimerinin kullanım kolaylığı, düşük maliyetli olması, biyoyumumluluğu ve toksik olmaması avantajlı yanlarıyken gözenekli yapısı nedeniyle asit direncinin düşük olması, mekanik stabilite kaybına yatkınlıkları ve gastrointestinal kanal geçişindeki kayıpları dezavantajlı yanlarıdır (Riaz ve Masud, 2013; Ding ve Shah, 2008). Yüksek asitli gıdalarda tek başına aljinat kullanılması etkisiz olabildiği için çift tabaka enkapsülasyon yöntemi tercih edilmektedir. Mikroorganizma ilk tabaka olarak aljinat ile kaplanırken ikinci tabakada asit direnci yüksek farklı bir polimer ya da polimer kombinasyonu ile kaplanmaktadır. Bu çift tabaka kaplama sayesinde probiyotiklerin hassasiyeti azalmakta, canlılığı en yüksek düzeyde tutulmakta ve yararlılığı artmaktadır. Aljinat ile tek tabaka kaplanmış mikrokapsüllerin ikinci bir tabaka kitosan ile kaplanmasıyla aljinat kapsüllerinin yoğunluğu ve mukavemeti artmaktadır (Krasaekoopt vd., 2003; Ding ve Shah, 2008; Cook vd., 2012).

Kitosan kaplı aljinat kapsüller, aljinat mikrokapsüllerin gözenekliliğini azaltır ve sadece aljinattan oluşan kapsüllere göre daha iyi bir fizikokimyasal stabilite sağlar. Yengeç, karides ve kerevit kabuğundan elde edilen kitosan polimeri katyonik karakter, yüksek biyoyumumluluk, toksik olmama ve biyolojik olarak parçalanabilme özelliğindedir (Anal ve Singh, 2007). Asidik koşullara maruz kalma sırasında özellikle aljinat-kitosan kombinasyonu kitosanın anyonik aljinata göre güçlü katyonik doğası nedeniyle etkili koruma sağlamaktadır (Calinoiu vd., 2019; Krasaekoopt vd., 2006; Krasaekoopt vd., 2004). Bu nedenle tez çalışmasında ekstrüzyon yöntemiyle aljinat ve kitosan polimerleriyle çift tabaka enkapsülasyon tercih edilmiştir.

Prebiyotikler bağırsaklarda bulunan probiyotik mikroorganizmaların gelişmesini stimüle eden, gastrointestinal sistemin üst bölümlerinde sindirime uğramadan (ince bağırsakta sindirilmeyen) kolona geçebilen, kalın bağırsakta fermante olabilen ve

patojen bakterilerin sayısını sınırlayan oligosakkaritlerdir. Probiyotik ve prebiyotiğin aynı üründe simbiyotik olarak bulunması her ikisinin de olumlu fonksiyonel etkilerinden faydalanılmasını sağlar (Holzapfel ve Schillinger, 2002). Yapılan araştırmalar ile prebiyotik ve probiyotiklerin birlikte eklendiği gıdalarda probiyotiklerin daha uzun süre canlı kaldığı ve sinerjistik bir etki ortaya çıkardığı tespit edilmiştir (Gandomi vd., 2016; Krasaekoopt vd., 2004). İnülin doğada yaygın olarak bitkilerin depo karbonhidratı formunda bulunan ve fruktoz polimerlerinin heterojen karışımına verilen isimdir (Holzapfel ve Schillinger, 2002). İnülin prebiyotiğinin probiyotik mikroorganizmaların gelişimini destekleyerek meyve bazlı fonksiyonel gıdaların (elma suyu, nar suyu, kıızılcık suyu) üretilmesinde olumlu sonuçlar ortaya koyduğu çalışmalarla belirlenmiştir (Gandomi vd., 2016; Doherty vd., 2012; Krasaekoopt vd., 2004). Bu tez çalışmasında sirkedeki yüksek asitlikte göz önünde bulundurularak *S. boulardii* mayasının gelişimini teşvik edecek prebiyotik olarak inülin tercih edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, *S. boulardii* probiyotik mayası serbest hücre formunda (SH), inülin prebiyotiği içeren tek tabaka aljinat (ALG-INU) ve aljinat üzerine kitosan polimeriyle çift tabaka (CTS-ALG-INU) olmak üzere ekstrüzyon yöntemiyle simbiyotik mikroenkapsüle edilerek nar sirkesine eklenmiştir. Nar sirkesi örneklerinin 4 ± 1 °C’de depolama süresinin 0, 1, 2, 3 ve 4. haftalarında bazı kimyasal özellikleri (titrasyon asitliği değeri, pH değeri, suda çözünür kuru madde miktarı) ile *S. boulardii* maya sayısı belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, bundan sonra üretilecek olan bitkisel fermante gıdalar gibi yüksek asitli gıdalara *S. boulardii* mayasının eklenmesi sırasında oluşabilecek sorunların çözümüne yardımcı olacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Sirke

İnsanlık tarihinde sirke, meyvelerden, tahıllardan ve sebzelerden alkollü fermantasyonun keşfi ile tarımın başlangıcında ortaya çıkmıştır. Sirkenin doğuşu şarabın kökeninden pek ayırt edilemez. Önceleri gıda çeşnisi ve koruyucu madde olarak görülse de günümüzde sağlıklı bir içecek olarak karşımıza çıkmaktadır (Solieri ve Giudici, 2009).

Sirke kelimesi Fransız vin (şarap) ve aigre (ekşi) kelimelerinden türetilmiştir. Baharat ve gıda koruyucu olarak kullanılan ekşi ve keskin bir sıvıdır (Cruess, 1958). İnsan tüketimine uygun nişasta ve şekerler içeren tarımsal kökenli uygun bir hammaddeden çift fermantasyon işlemiyle üretilen bir sıvı olarak tanımlanmaktadır (Codex Alimentarius, 1987).

Farklı bir ifade olarak Türk Standartları Enstitüsü sirkeyi tarımsal kökenli hammaddelerden üretilen ilk olarak etil alkol fermantasyonu ardından asetik asit fermantasyonu ile çeşitli fermantasyon teknikleriyle elde edilen özgün bir ürün olarak tanımlamaktadır. Farklı hammaddelerden elde edilebilen bu ürün şarap, tahıl, malt gibi ve hatta meyvelerden geniş ölçekte elde edilebilmektedir (TSE 1880 EN13188, 2024).

FAO (Food and Agricultural Organization) ve WHO (World Health Organization) ise sirkeyi tanımlarken nişasta ve şeker içerikli tarımsal hammaddelerin iki aşamalı fermantasyonuyla (etil alkol fermantasyonu, asetik asit fermantasyonu) üretilen kendine özgü bir sıvı olarak tanımlamaktadır (Giudici vd., 2017).

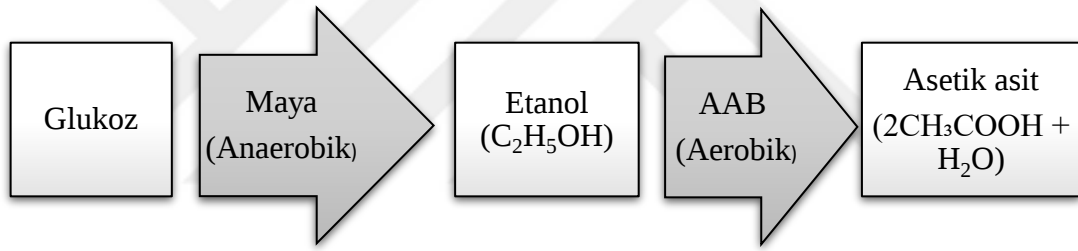
Sirkede bulunan organik asitler, fenolik bileşikler, amino asitler, vitaminler ve melanoidinler sirkenin organoleptik özelliklerini etkilemekte olup aynı zamanda antimikrobiyel, antioksidan, antidiyabetik, antitümör, antikarsinojenik, antienfeksiyon etkilerin oluşumunu da sağlamaktadır (Samanidou vd., 2001).

2.1.1 Sirke üretim yöntemleri

Sirke üretimi öncelikle şeker ve/veya nişasta içerikli hammaddelerin mayalar tarafından anaerobik bir şekilde fermente edilmesiyle başlamaktadır. Mayalar

tarafından fermente edilen şekerler etanole (C_2H_5OH) dönüşür ve ikinci fermantasyon aşaması olan etanolden asetik asit bakterilerinin (AAB) fermantasyonu ile asetik asit (CH_3COOH) oluşur. Bu iki fermantasyon olayı biyokimyasal reaksiyon olarak değerlendirilmekte olup alkol dehidrogenaz enzimi ile etanolün oksidasyonu ve ardından aldehit dehidrogenaz enzimi ile asetik asidin oluşmasını ortaya koymaktadır (Gullo vd., 2006).

Sirke, bir bakteri cinsi olan *Acetobacter* tarafından etil alkolün asetik aside dönüştürülmesinden elde edilen üründür. Bu nedenle alkol-su karışımlarından çeşitli meyve şaraplarına kadar herhangi bir alkollü maddeden sirke üretilebilir (Peppler ve Beaman 1967). Asetik asit bakterileri (AAB) olarak da adlandırılan sirke bakterileri *Acetobacter* cinsinin üyeleridir ve etil alkolü (C_2H_5OH) oksidasyon yoluyla asetik aside (CH_3COOH) dönüştürme yetenekleriyle karakterize edilir. Sirkedeki asetik asidin oluşumuna ait akış şeması Şekil 2.1’de verilmiştir (Sievers ve Swings, 2005).



Şekil 2.1. Sirkedeki etil alkol ve asetik asit fermantasyonu.

Asetik asit bakterileri (AAB), sirke üretiminde en başta gelen mikroorganizma türü olup *Acetobacter* ve *Gluconobacter* familyasından, Gram negatif, obligat (zorunlu) aerob, çubuk şeklinde, katalaz pozitif ve oksidaz negatif, polar olabilen flagella varlığından dolayı hareketli bakterilerdir. Optimum gelişme sıcaklıkları 25-30°C arasındadır. Genel olarak gelişme sıcaklıkları değerlendirildiğinde 5-45°C arasında değişim gözlenmektedir. Boyutları 0.4-1 µm genişliğinde ve 0.8-4.5 µm uzunluğunda değişen bakterilerdir. Optimum gelişim pH değeri yaklaşık 5.0- 6.5 pH’dır. Aynı zamanda 3-4 pH gibi düşük asit değerlerinde de gelişme gösterebilmektedir (Sievers ve Swings, 2005).

Meyvelerden, çiçeklerden ve fermente gıdalardan izole edilen AAB türleri arasında farklı kültür ortamlarındaki besinlere bağlı olarak gelişim farklılıkları bildirilmiştir. Sonuçlar incelendiğine tüm besiyeri ortamların AAB'nin gelişimini eşit şekilde

desteklemediği ve hatta suşlar arasında seçici olabildiğinden uygun bir sentetik ortamın olmaması nedeniyle sentetik kültür ortamında zayıf bir geri kazanım olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte çeşitli kültür ortamlarının geliştirilmesiyle AAB izolasyonunda önemli ilerleme kaydedilmiştir (Gullo vd., 2014). Yamada ve Yukphan (2008), AAB'nin genellikle şeker ve/veya etanol içeren substratlarda bulunduğunu ve bu substratların meyve suları, şarap, elma şarabı, bira, kakao ve sirke gibi meyveler, çiçekler, yiyecekler ve fermente içeceklerde yer aldığını bildirmiştir.

Fermantasyon sırasında şekerin etil alkole dönüştürülmesinde mayalar rol oynamaktadır. Mayalar arasında en öne çıkan tür *Saccharomyces cerevisiae* olmakla birlikte 700'den fazla maya türü olduğu bilinmektedir. Sirke çeşidine bağlı olarak farklı maya türleri izole edilmiştir (Giudici vd., 2017). Farklı maya izolatlarının maya fermantasyon hızını, şarap aromasını ve sirke kalitesini etkiledikleri ortaya koyulmuştur. Mayaların asitliğe karşı yüksek tolerans gösterdiği bilinmektedir (Rainieri ve Zambonelli, 2009).

Sirke üretiminde kesikli (Basit yavaş yöntem, Orleans yöntemi, Pastör yöntemi ve Çabuk yöntemler), yarı sürekli ve sürekli yöntemler uygulanmaktadır (Akçiçek vd., 2020). Bunlar içinde başlıca 3 ana yöntem kullanılmaktadır. Bunlar yavaş (yüzey kültür), hızlı (Alman) yöntemi ve derin kültür (daldırma-submers) yöntemi olarak bilinmektedir. Geleneksel nar sirkesi üretimi için yavaş (yüzey kültür) yöntem kullanılırken; endüstriyel nar sirkesi üretimi için ise diğer sirke üretim metotları tercih edilmektedir (Nanda vd., 2001).

Ev tipi geleneksel nar sirkesi üretiminde, öncelikle nar meyvesinin temin edilip kabuk kısmından ayrılması ve yıkanması ile nar sirkesi üretimine başlanmaktadır. Ardından cam kavanoz içerisine alınan nar tanelerinin parçalanması amacıyla tahta bir kaşık ile ezilerek nar suyunun çıkması sağlanarak üzerine kaynatılıp soğutulmuş su ile bir yemek kaşığı doğal tuz ilave edilir. Yüzey kültür yönteminde fermantasyon için sirke anası ya da çeşitli meyve sirkeleri eklenip fermantasyon için cam kavanozun üzeri uygun bir bez ile örtülmektedir (Budak, 2010).

Bütün yöntemler kullanılabilirlik açısından elverişlidir fakat hızlı, ekonomik ve nitelik açısından derin kültür yöntemi daha sık kullanım alanına sahiptir (Tesfaye vd., 2002). Sirke üretimine dair akış şeması Şekil 2.2'de verilmiştir (Yetiman, 2012).



Şekil 2.2. Sirke üretim akış şeması.

Geleneksel yöntem olarak bilinen yavaş yöntemde basit, orleans (Fransız usulü) ve pastör (geliştirilmiş orleans yöntemi) yöntemleri öne çıkmaktadır. Basit yöntemde bağcılar tarafından uzun yıllardan beri süregelen bir yöntemle fıçı, tahta kap ve cam damacana ile nar sirkesi üretilmektedir. Zaman açısından biraz uzun sürdüğü için dezavantajlıdır fakat kalite olarak yüksek bir avantaj sağlamaktadır. Orleans yönteminde ise özel sirkeleştirme kaplarından (220-230 litrelik fıçılar) yararlanılmaktadır. Belirli delikler ile havalanma sağlanmaktadır. Üretim yöntemi basit yöntemle benzemektedir. Son olarak pastör yöntemi eskiden kullanılan fakat günümüzde kullanımını yitirmiş olan bir yöntemdir. Teneke ve fıçıların üst üste konumlanması ve birbirlerine bağlanılarak bir akış hattı oluşturulmasıyla elde edilir. Nar sirkesinin en üst kaptan belirli bir akış ile alt kaba doğru akmasıyla sirke üretimi gerçekleştirilmiş olur (Bamforth ve Singleton, 2005; Nanda vd., 2001). Pastör yönteminde kullanılan fıçılar Şekil 2.3'te verilmiştir (URL-2). Geleneksel yöntem olan yavaş yöntem ile sirke üretimi, alkol ile muamele edilmiş pastörize sirkenin (%25-30 etil alkol) 6-8 hafta boyunca yaklaşık 28-30°C sıcaklıkta olgunlaştırılması ile elde edilmesi şeklindedir (Bamforth ve Singleton, 2005; Nanda vd., 2001).



Şekil 2.3. Pastör yönteminde kullanılan fiçılar.

Nar sirkesi üretiminde seri üretim yapılan fabrikaların çoğunun tercih ettiği yöntem olan hızlı (Alman) yöntemi zaman ve kalite avantajı ile nitelikli ürünlerin çıkarılmasında tercih edilen bir yöntemdir. Sirke bakterilerinin geniş bir alanda muamele görmesini sağlamak amacı ile büyük fiçılar ile geniş bir yüzey alanı sağlanmıştır. Yüzey alanının bakterilerin tutunması amacı ile kayın odunu, meşe, köknar, selvi, cibre, çalı demeti, söğüt, yonga, daneleri alınmış mısır koçanı parçaları vb. malzemelerle kaplanarak 3 ila 7 gün aralığında sirke üretimi gerçekleştirilmeye çalışılmaktadır. Asetik asetik bakterilerinin hava ile teması minimuma düşürülerek zaman açısından avantaj sağlanılmaktadır. Yüzey alanını genişletmek adına jeneratör tankları kullanılmaktadır. Bu yüzden aynı zamanda bu yöntem jeneratör yöntemi de denilmektedir. Jeneratör yöntemi, O. Hromatka ve H. Ebner tarafından 1949 yılında geliştirilmiş olup diğer metotların aksine dolgu malzemesi olmadan asetik asit bakterilerinin yüzey yerine mayşede çoğalması ile sirke üretiminin gerçekleştiği bir yöntemdir (Bamforth ve Singleton, 2005; Nanda vd., 2001; Ünal, 2007).

Derin kültür yöntemi aynı zamanda en çok kullanılan yöntem olarak öne çıkmaktadır. Zaman açısından 24-48 saat aralığında gelişme göstermesi bu yöntemin avantajlarından biridir. %12'den fazla asit üretimi bu metotla mümkün olabilmektedir. Bu durum daha hızlı ve daha verimli bir sürekli sistem olarak sirke üretiminde diğer metotların önüne geçmiştir (Akbaş, 2008; Budak, 2010; Yetiman, 2012).

2.1.2 Nar sirkesi bileşimi ve özellikleri

Nar; *Punicaceae* familyasına ait *Punica granatum* Linnaeus türünde olan, ülkemizde yaygın olarak üretilen ve nar ekşisi, nar suyu, nar sirkesi, nar çekirdeği yağı gibi yan ürünleriyle son yıllarda çok öne çıkan bir meyvedir (Sarkhosh vd., 2006). Dünya üzerinde nar üretimi yaklaşık 2 milyon ton olup ithalatı ve ihracatı yaygın olan bir üründür (Yıldız Turgut ve Seydim, 2013). Hindistan, ABD, Afrika, Çin, Peru, Şili ve Türkiye gibi ülkeler nar ihracatında ön plana çıkmaktadır. Nar taze meyve olarak tüketildiği gibi, nardan meydana getirilen mamüllerin tüketimi de yaygındır (Kurt ve Şahin, 2013). Nar suyu, nar suyu konsantresi, nar sirkesi, nar şarabı, nar ekşisi nardan meydana getirilen ürünlerden bazılarıdır. Ayrıca nar çiçeği, nar kabuğu, nar çekirdeği ve nar çekirdeği yağı da terapötik etkileriyle bilinen yan ürünlerdir (Gil vd., 2000). Narın yenilebilir kısmı önemli miktarda şeker, vitamin, polisakkarit, fenolik bileşikler ve mineral maddeler içermektedir. Nar meyvesi fizyolojik olarak; nar tanelerinden, kabuktan ve tanelerin içerisinde yer alan çekirdekten oluşmaktadır. Yenilebilir kısmında ise nar tanelerinin %20'lik kısmını çekirdek oluşturmaktadır. Çekirdek kısmı dışında kalan tanelerin %85'lik kısmını su, %10 şeker ve %1.5 pektin, askorbik asit, polifenolik flavonoidler oluşturmaktadır (El-Nemr vd., 2006). Nar meyvesinin antioksidan kapasitesi diğer meyvelerden (ayva %60.4, üzüm %26.6, elma %25.7 ve armut %13.7) daha yüksek olup %62.7 olarak belirlenmiştir (Aviram vd., 2000).

Nar sirkesi içerisinde yer alan polifenoller, organik asitler ve mineraller sayesinde antioksidan kapasitesi yüksek gıdalar arasında yer almaktadır. Aynı zamanda nar sirkesinin antibakteriyel, antihipertansif, antitümör ve kan şekerini düzenleyen çeşitli terapötik etkileri vardır (Fadavi vd., 2005). Nar suyunun asetik asit bakterileri ile fermante edilmesiyle oluşan nar sirkesinde bazı biyoaktif maddeler artarken bazılarının azaldığı ve buna bağlı olarak antioksidan kapasitesinde değişiklikler meydana geldiği belirlenmiştir (Kalaycıoğlu ve Erim, 2017). Narın fermante olmasıyla birlikte toplam fenolik madde, antosiyanin, glukoz, fruktoz, malik asit, punikalajin (tanen), elajik asit miktarlarının azaldığı; gallik asit miktarının ise arttığı tespit edilmiştir (Kalaycıoğlu ve Erim, 2017). Narın asetik asit bakterileri ile fermante olması ile üretilen nar sirkesinin antioksidan aktivitesinde azalmalar olsa da besin değeri kaybolmamaktadır. Ayrıca diğer meyve sirke/şaraplarına göre daha güçlü antioksidan özellik göstermektedir (Ergin, 2019).

Fermante bir ürün olan sirke, yüksek asitli gıdalar arasında değerlendirilmekte olup nar sirkesinin asitliği 3.0-3.6 pH arasında değişmektedir (Öztürk vd., 2015). Günümüzde nar sirkesi yalnızca yemeklerde ve salatalarda değil aynı zamanda antioksidan su, mayonez, turşu, hardal, salça vb. gıdaların hazırlanmasında da kullanılmaktadır. Nar sirkesi, B₁, B₂ vitaminleri ile kalsiyum ve fosfor minerallerini içeren güçlü bir antioksidan gıda maddesidir (Akan, 2016). Şekil 2.4'te nar sirkesine ait bir görsel bulunmaktadır (URL-1).



Şekil 2.4. Nar sirkesi.

2.1.3 Nar sirkesinin insan sağlığına olan etkileri

Nar sirkesinin antioksidan, antitümör, antimutajenik ve antikarsinojenik özellikleri nedeniyle insan sağlığına olan faydaları oldukça fazladır (Samanidou vd., 2001). Aşağıda verilen maddeler ile bu faydalı etkiler belirtilmiştir.

- Nar sirkesi B₁, B₂ vitaminleri, kalsiyum ve fosfor mineralleri ile polisakkarit ve fenolik bileşikler bakımından zengindir (Akan, 2016).
- Nar sirkesi diğer sirkelere göre içerdiği fenolik maddeler nedeniyle antioksidan kapasitesi diğer sirkelere göre oldukça yüksektir. Bu nedenle nar sirkesi antienflamatuar ve antiaterosklerotik etkilidir (Balasundram vd., 2006).
- Sirke, kan şekeri seviyesini de olumlu yönde etkilediği için son yıllarda diyabetik hastaların tedavisine yardımcı olarak kullanılmaktadır. Sirkenin antidiyabetik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada insülin-dirençli bireylerde kan şeker düzeyini plasebo değerlerine kıyasla %64 oranında düşürdüğü

belirlenmiştir. Bununla birlikte %0.3 ve % 2 asetik asit çözeltisinin tüketiminin diyabetli deneklerde açlık kan glukoz seviyelerini %34 oranında düşürdüğü tespit edilmiştir (Johnston vd., 2004).

- Sirkede bulunan fenolik maddelerin antioksidan, antitümör, antimutajenik ve antikarsinojenik özellikleri bulunmaktadır. Sirkenin içerdiği fenolik maddelerden salisilik asidin enfeksiyon önleyici etkisi nedeniyle antibakteriyel etkisi de mevcuttur (Samanidou vd., 2001).
- Sirke bağışıklık sistemini desteklemekte ve anti bakteriyel etki göstermektedir (Choi vd., 2015). Sirkenin gıda kaynaklı patojenler üzerinde etkisinin incelendiği bir çalışmada *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmaları inhibe ettiği belirlenmiştir (Hindi ve Chabuck, 2013; Şengün vd., 2004). Sirkenin antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise en yüksek antimikrobiyal etkinin *Yersinia enterocolitica* üzerine olduğu görülmüştür (Choi vd., 2015).
- Sirkenin kardiyovasküler hastalıklar üzerinde koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiştir (Johnston vd., 2004). Sirkenin kolesterol seviyesini düşürdüğü, LDL oksidasyonunu inhibe ettiği ve kardiyovasküler hastalıkları önlediği kanıtlanmıştır (Ademoğlu vd., 2006).
- Sirke yara ve egzamalarda tedavi edici özelliği yanı sıra soğuk su ile karıştırılarak ateşli rahatsızlıklarda ateş düşürücü etkisi olduğu bilinmektedir (Samanidou vd., 2001).

2.2 *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii probiyotik mayası Fransız mikrobiyolog Henri Boulard tarafından 1920'de Hindistan'da bir kolera salgını sırasında koleraya yakalanmayan bazı insanların içtikleri özel bir çaydan izole edilmiştir. Tropik bir meyve olan liçi ve mango meyvesinin dış kabuğundan yapılan bu çaydan izole edilen mayaya bilim insanı Boulard tarafından "*Saccharomyces boulardii*" adı verilmiştir. Araştırma ve üretim protokollerini başlatan Laboratories Biocodex tarafından *S. boulardii* patenti 1947'de satın alınmıştır. Şu anda bu probiyotik maya Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Orta Doğu ve Asya'yı kapsayan 80'den fazla ülkede kullanılmaktadır (McFarland, 2015).

2.2.1 Taksonomi ve etki mekanizması

S. boulardii, *Saccharomyces* cinsinden olup *S. cerevisiae* türünün bir alt türüdür. *S. cerevisiae* suşları ile akrabalık gösterse de genetik ve metabolik özellikleri analiz edildiğinde farklı genetik bileşime ve enzim profillerine sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Lazo-Velez vd., 2018). *S. boulardii* optimum gelişim sıcaklığının 37 °C olması, yüksek asitliğe dirençli olması ve safra asitlerine toleranslı olması bakımından fizyolojik ve metabolik olarak diğer *Saccharomyces* türlerinden farklılık göstermektedir. Diğer *S. cerevisiae* suşları daha düşük sıcaklıklarda (30-33°C) gelişme gösterirken yüksek asitli ortamda inhibe olma eğilimindedir (Fietto vd., 2004). *S. boulardii*'nin hücre duvarı diğer mayalara göre daha kalın olduğu için gastrointestinal pH koşullarında mide ve safra asidine karşı direnç göstererek gastrointestinal sisteme tutunmakta ve yüksek canlılık göstermektedir. *S. boulardii* diğer bakteriyel probiyotikler ile karşılaştırıldığında antibiyotiklerden etkilenmemeleri, fizyolojik olarak daha büyük boyutlarda olmaları gibi birçok farklılık ortaya koyulmaktadır (McFarland, 2010; Pennacchia vd., 2008).

S. boulardii, insanlara oral olarak verildiğinde, gastrointestinal sistemde optimum konsantrasyonuna 3 gün içinde ulaşmakta ve ilaç kesildikten sonra 3-5 gün içinde gastrointestinal sistemden atılmaktadır. *S. boulardii* probiyotik mayasının yedi farklı etki mekanizması olduğu ve bunların sırasıyla antitoksin etki, antimikrobiyal aktivite, bağırsak florasının modülasyonu, metabolik aktivite, enzimatik aktivite ve antienflamatuar etki olduğu belirlenmiştir (McFarland, 2010; Garcia-Vilela vd., 2008).

Antitoksin etkisi, *S. boulardii*'nin kolera toksinlerini, *Clostridium difficile* toksinlerini ve *E. coli* endotoksinlerinin etkilerini azaltabileceğini ve hücre yüzeyindeki reseptör bölgelerini parçalayabilen bir proteaz ürettiği çalışmalarla belirlenmiştir. *S. boulardii* tarafından üretilen *Clostridium difficile* toksin A ve B'yi doğrudan parçalayabilen 54 kDa'lık bir proteaz, kolera toksinlerini parçalayabilen 120 kDa'lık bir protein ve *E. coli* endotoksinini yok eden 63 kDa'lık bir fosfataz bulunmuştur (Buts vd., 2006; Castagliuolo vd., 1996).

Antimikrobiyal aktivite, *S. boulardii*'nin bağırsaktaki enterositler arasındaki sıkı bağlantıları koruyarak sıvı kaybını (ishal) azalttığı gösterilmiştir. Crohn hastalığı olan

hastalara *S. boulardii* (4 ay boyunca günde 1.6×10^9 kob/mL) verildiğinde bağırsak geçirgenliğinin azaldığı belirlenmiştir (Garcia-Vilela vd., 2008).

Bağırsak florasının modülasyonu, bir insanın bağırsak mikrobiyomunda 40.000'den fazla bakteri türü taşıyabileceği çalışmalarla belirlenmiştir. Normal mikroflora, besin maddelerini veya bağlanma yerlerini rekabetçi bir şekilde dışlayarak hareket edebilir, bakteriyosinler üretebilir veya patojenik büyümeye zararlı enzimler üretebilir. Bu koruyuculuğu bozan faktörler örneğin antibiyotik kullanımı veya cerrahi müdahaleler normal mikroflora yeniden oluşana kadar konakçının patojen kolonizasyonunda duyarlılığına neden olur. Antibiyotik maruziyetinden veya hastalık düzelmesinden sonra normal mikrobiyotanın yeniden oluşması yaklaşık 6-8 hafta sürer. *S. boulardii*'nin antibiyotik alan veya ameliyat olan hastalarda bozulan normal mikroflorayı düzeltmeye yardımcı olduğu aynı zamanda daha kısa sürede normal mikrobiyotaya dönüşmesine yardımcı olduğu da gösterilmiştir (Dethlefsen vd., 2008; McFarland, 2014).

Metabolik aktivite, *S. boulardii*'nin hastalık sırasında baskılanan kısa zincirli yağ asitlerini artırabildiği gösterilmiştir. Kısa zincirli yağ asitleri, kalın bağırsaktaki bakterilerin karbonhidrat ve lifleri fermente ederek ürettikleri biyoaktif moleküllerdir. Gastrointestinal sistemle ilgili hastalıkların (Ülseratif kolit, Crohn hastalığı, diyabet, ishal) korunulmasında ve önlenmesinde karşımıza çıkmaktadır (Girard vd., 2002).

Enzimatik aktivite, *S. boulardii* mayasının ürettiği enzimler ve kısa zincirli yağ asitleri gibi bileşikler sayesinde faydalı bağırsak florasının ve bağırsak epitel hücrelerinin güçlenmesini sağlamaktadır. *S. boulardii* mukoziti (ağız içi yaralar) azaltabilir, sıvı taşıma yollarını geri getirebilir, protein ve enerji üretimini uyarır veya enterositlerin (ince bağırsak mukozasının epitelinde bulunan ve emilimden sorumlu hücreler) olgunlaşmasına yardımcı olan enzimleri aktifleştirebilir (Czerucka ve Rampal, 1999).

Bağışıklık mekanizması, *S. boulardii* ya bir bağışıklık uyarıcısı olarak hareket ederek ya da proinflamatuvar yanıtları azaltarak bağışıklık yanıtlarını düzenleyebilir. Bağırsakta salgısal IgA düzeylerinde artışa neden olabilir. *S. boulardii*'nin *Clostridium difficile* toksinleri A ve B'ye karşı daha yüksek serum IgG seviyeleri ile ilişkili olduğu da bulunmuştur (Kyne vd., 2001).

Antimikrobiyal etki mekanizması, *S. boulardii* bağırsak patojenlerine doğrudan veya dolaylı olarak müdahale etme yeteneğine sahiptir. Bazı patojenlerin (*Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitum*, *Aeromonas hemolysin* gibi) gelişmesini doğrudan inhibe edebilir (Altwegg vd., 1995; McFarland, 2010).

2.2.2 *S. boulardii*'nin sağlık üzerine etkileri

S. boulardii çocuklarda ve yetişkinlerde diyare tedavisinde kullanılmakta olup *Clostridium difficile*, rota virüs ya da antibiyotiğe bağlı akut ve kronik diyare tedavisinde başarılı sonuçlar vermiştir (McFarland, 2017). *S. boulardii*'nin diyare üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ishal başlangıcında 1.2×10^{11} kob/g tek doz alındığında ishali azalttığı, 5 gün günde iki kez 1.2×10^{10} kob/g alımda ise önemli ölçüde ishali azalttığı ve tekrarlayan tedavilerde ise daha güçlü bir koruma sağladığı bildirilmiştir (Girard vd., 2003). *S. boulardii*'nin turist ishali ve çocuklarda görülen akut gastroenterit ile *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* ve diğer patojenik enterobakterilerin neden olduğu kronik ishal tedavisindeki etkileri ortaya koyulmuştur (Czerucka vd., 2007; Ryan vd., 2011).

S. boulardii takviyesinin *Helicobacter pylori* tedavisinin yan etkilerinden olan kusma ve diyareyi azalttığı ve *H. pylori* bakteri inhibisyonunu ise hızlandırdığı görülmüştür (McFarland, 2017).

S. boulardii'nin ülseratif kolit hastalığının önlenmesinde ve Crohn hastalığının (sindirim kanalında özellikle ince bağırsağın son kısmında görülen iltihabi bir hastalık) tedavisinde etkili olabileceği bildirilmiştir (Guslandi vd., 2000). Ayrıca huzursuz bağırsak sendromu (IBS), tedavisinde de etkileri ortaya koyulmuştur (Czerucka vd., 2007; Ryan vd., 2011).

2.2.3 Fermante gıdalarda *S. boulardii* kullanımı

S. boulardii yaygın olarak klinik çalışmalarda preparat olarak kullanılmakta olup gıdalar yoluyla vücuda alınması konusunda az sayıda literatür bilgisi mevcuttur. Son yıllarda sağlık üzerine olumlu etkileri olan yeni ürünler geliştirmek amacıyla probiyotikler gıdalara daha fazla eklenmektedir. *S. boulardii* süt ürünleri (yoğurt, peynir altı suyu, dondurma), tahıl bazlı ürünler (bira, boza, mısır gevreği), meyve

suları (kaju suyu, havuç suyu, elma suyu vb.) ve diğer gıdaları kapsayan (çikolata, kahve ve çay) çok çeşitli gıda gruplarına dahil edilmiştir (Chan ve Liu, 2022).

Probiyotik gıdalarda *S. boulardii* kullanımının gün geçtikçe artış göstermesinin temel nedeni, bu mayanın bazı gıda matrislerinde probiyotik bakterilere kıyasla üstün teknolojik özellikler sunmasıdır. Bu özellikler arasında asit direnci, antibiyotiklerden etkilenmemesi, gıda bileşenleriyle etkileşiminin sınırlı olması ve gastrointestinal kanal geçişinde canlılığını koruması başta gelmektedir. Örneğin kahve ve çaya eklenen *S. boulardii* mayasının canlılığını (6-7 log kob/mL) *Lactobacillus* spp. bakterilerine göre en az birkaç ay daha uzun süre koruyabildiği belirlenmiştir (Wang vd., 2022). Bu nedenle tez çalışmasında nar sirkesine *S. boulardii* probiyotik mayası eklenerek yeni bir fonksiyonel gıda olarak probiyotik nar sirkesi üretilmi gerçekleştirilmiştir.

S. boulardii'nin meyve bazlı fermante gıdalarda kullanımına dair literatür bilgileri şu şekildedir:

Santana vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, *S. boulardii* mayası ve farklı tatlandırıcılar kaju suyuna ilave edilmiş ve kaju suyunun 7 °C'de 28 gün boyunca pH, titrasyon asitliği ve probiyotik özellikleri belirlenmiştir. Başlangıçta 10⁸ kob/mL *S. boulardii* ilave edilmiş Kaju suyunun 28. gün sonunda maya sayısı 8.24 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile *S. boulardii* mayasının asitli bir meyve içeceğinde 28 gün boyunca canlılığını koruyabildiği görülmektedir. pH değeri ise ilk gün kontrol ve *S. boulardii* mayalı örneklerde sırasıyla 3.24 pH ve 3.26 pH iken 28. gün sonunda 3.68 pH ve 3.59 pH bulunmuştur. Kaju suyunda *S. boulardii* maya ilavesi sonucunda asitlik artışı görülmemiştir. Titre edilir asitlik değeri kontrol örneğinde 1.95 g/100 mL laktik asit olup 28 gün içinde değişmemiştir. *S. boulardii* mayalı örneklerde ise 0. gün 2.04 g/100 mL laktik asit iken 28. gün sonunda asitliğin 1.95 g/100 mL laktik asit değerine düştüğü bulunmuştur.

S. boulardii kullanılarak fermante edilmiş karpuz, kırmızı pancar ve siyah havuç suyunun 20°C'de 16 gün boyunca depolandığı bir çalışmada fermante ürünün pH, titrasyon asitliği ve *S. boulardii* canlılığı araştırılmıştır. *S. boulardii* mayası ilave edilen karpuz, kırmızı pancar ve siyah havuç suyu için pH değerleri ilk gün sırasıyla 4.27 pH, 4.80 pH ve 5.6 pH iken depolamanın 16. günü sonunda 3.35 pH, 3.20 pH ve 3.41 pH olarak bulunmuştur. Depolamanın 16. günü sonunda sırasıyla toplam asitlik

miktarı karpuz, kırmızı pancar ve siyah havuç suyu için ilk gün sırasıyla %0.01 laktik asit, %0.03 laktik asit ve %0.47 laktik asit miktarında iken, depolamanın 16. günü sonunda sırasıyla %0.46 laktik asit, %0.47 laktik asit ve %0.90 laktik asit olarak tespit edilmiştir. Başlangıçta karpuz, kırmızı pancar ve siyah havuç sularına 10^8 - 10^9 kob/mL *S. boulardii* ilave edilmiş olup depolamanın 1. günün sonunda *S. boulardii* sayısı sırasıyla 7.90 - 8.76 - 8.98 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Depolamanın 16. günü sonunda sırasıyla *S. boulardii* sayısı 7.78 - 8.30 - 8.65 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Fermante karpuz, kırmızı pancar, siyah havuç suyularında 16 gün depolama süresi sonunda asitliğin artışıyla beraber *S. boulardii* sayısında sırasıyla 0.12 log, 0.46 log ve 0.33 log birimlik bir azalma olduğu belirlenmiştir. Fermante ürünlerin asitlik miktarındaki değişim çok yüksek olmadığı için *S. boulardii* sayısında da önemli bir değişim olmamıştır (Değirmencioğlu vd., 2016).

Sivudu vd. (2016), domates ve havuç sularına *S. boulardii* ilave etmiş ve 6 hafta boyunca depolanan bu probiyotik içeceklerdeki *S. boulardii* sayısını belirlemiştir. Bu amaçla 63 °C'de 20 dakika pastörize edilen probiyotik örneklerle *S. boulardii* inoküle edilmiş ve ardından 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Araştırmada domates ve havuç suyuna enkapsüle edilmiş ve serbest *Saccharomyces boulardii* ilave edilmiş ve 4°C'de 6 hafta süresince depolanan ürünlerdeki hücrelerin canlılıkları belirlenmiştir. Domates suyunda serbest hücre formundaki *S. boulardii* sayısı başlangıçta 3.8×10^6 kob/mL iken depolamanın 5. haftasının sonunda 4×10^5 kob/mL olarak belirlenmiştir. Enkapsüle edilmiş *S. boulardii* ilaveli domates suyunda ise *S. boulardii* sayısı başlangıçta 3.8×10^6 kob/mL iken depolamanın 6. haftasının sonunda 4×10^5 kob/mL olarak belirlenmiştir. Havuç suyunda serbest hücre formundaki *S. boulardii* sayısı başlangıçta 3.8×10^6 kob/mL iken depolamanın 5. haftasının sonunda 4×10^5 kob/mL olarak belirlenmiştir. Enkapsüle edilmiş *S. boulardii* ilaveli havuç suyunda ise *S. boulardii* sayısı depolamanın 6. haftasının sonunda 3×10^5 kob/mL belirlenmiştir. Depolama süresi sonunda fermante domates ve havuç sularındaki *S. boulardii* sayısında yaklaşık 1 log birimlik azalma tespit edilmiş olup bu değişim *S. boulardii* ilave ediliş şekline (serbest hücre ve mikroenkapsilasyon) bağımsız olarak gerçekleşmiştir.

Organik ya da endüstriyel yöntemlerle elde edilmiş elmanın *S. boulardii* mayası ile fermante edildiği bir çalışmada, başlangıç canlı hücre sayısı 8.7 log kob/g iken 27.5 °C'de 14 saat inkübasyon sonunda organik ve endüstriyel elma pulpları için *S.*

boulardii sayısı sırasıyla 8.27 log kob/ mL ve 8.25 log kob/ mL olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçlarına göre, fermante elma pulpundaki *S. boulardii* sayısında başlangıca göre 0.43-0.45 log birimlik bir azalma olduğu ancak bu azalmanın hammaddenin organik ya da endüstriyel olması ile bir ilişkisinin olmadığı anlaşılmıştır (Farinazzo vd., 2020).

Yeşil çaya *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 ve *Lactiplantibacillus plantarum* 299V probiyotik mikroorganizmalarının ilave edilerek 25 °C'de 85 gün boyunca depolandığı bir çalışmada, yeşil çaydaki başlangıç *S. boulardii* sayısı 6 log kob/ mL olup depolamanın 85. günün sonunda 8 log kob/mL olarak belirlenmiştir. *S. boulardii* hücresi sayısı depolamanın ilk günü içinde 2 log kob/mL artmış ve sonraki 85 gün boyunca değişmemiştir. *Lactobacillus plantarum* sayısı depolamanın 1. gününde 8 log kob /mL iken 3. gününde 2.5 log kob /mL'lik bir artış elde edilmiş olup 17. günün sonundan itibaren keskin bir düşüş göstermiş ve 31. gün sonunda bakteri ölümü gerçekleşmiştir. *Lactobacillus plantarum* ile *S. boulardii* kültürleri birlikte kullanıldığında ise mikroorganizma sayısı depolamanın 85. günü sonuna kadar yaklaşık 7 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre yeşil çayın probiyotiklerle fermantasyonunu sonucunda yeni bir fonksiyonel gıda elde edildiği ve LAB'nin *S. boulardii* mayası tarafından korunduğu anlaşılmıştır (Wang vd., 2022).

Üzümsü meyvelerden elde edilen meyve suyuna enkapsüle edilmiş (aljinat, ksantan gum ve inülin) *S. boulardii* mayasının ilave edildiği ve 4 °C'de 4 hafta boyunca depolandığı bir çalışmada, serbest hücre formundaki *S. boulardii* 'nin hücre sayısı depolamanın 24. saatinin sonunda 6.98 log kob/mL iken 1. haftanın sonunda 5.98 log kob/mL, 2. haftanın sonunda 4 log kob/mL ve 4. haftanın sonunda *S. boulardii* mayası inhibe olmuştur. Serbest hücre formundaki *S. boulardii* depolamanın 2. haftasına kadar kademeli olarak bir düşüş göstermiş ve 4. haftanın sonunda canlılığını yitirmiştir. Enkapsüle formdaki *S. boulardii* 'nin hücre sayısı depolamanın 24. saatinin sonunda 7.59 log kob/mL iken depolamanın 4. haftasının sonunda 7 log kob/mL canlılık göstermiştir. Üzümsü meyvelerden elde edilen meyve suyuna *S. boulardii* mayasının enkapsüle edilerek ilave edilmesi, serbest formda ilave edilmesine kıyasla büyük oranda başarı göstermiştir. Bu çalışma probiyotik fonksiyonel bir içecek üretiminde mikroenkapsülasyon tekniğinin etkinliğini ortaya koymuştur (Fratianni vd., 2014).

Elma parçalarına aljinat matriksi ile enkapsüle edilmiş *S. boulardii* mayasının ilave edilerek 4 °C'de 77 gün boyunca depolandığı bir çalışmada, başlangıçtaki *S. boulardii* sayısı 7.84 log kob/mL olup depolamanın 56. gününde 7.58 log kob/mL ve 77. günde ise 7.88 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Depolamanın başlangıç ve son günü arasında *S. boulardii* sayısında önemli bir değişim gözlemlenmemiştir. Bu alışma ile *S. boulardii* mayasının aljinat ile enkapsüle edildiğinde elma parçalarında 77 gün boyunca canlılığını koruyabildiği ve böylece probiyotik elma parçalarının üretilbildiği tespit edilmiştir (Gallo vd., 2014).

Süte %4 (v/v) oranında kivi suyu ile *S. boulardii*, *Lactobacillus plantarum* RS, *Lactobacillus casei* LCS ve *Lactobacillus fermentum* kültürleri eklenerek 37 °C'de 12 saat fermante edildiği bir çalışmada, *S. boulardii* içeren sütte kivi suyunun laktik asit ve asetik asit üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Kivi suyu içermeyen *S. boulardii* ilaveli sütte ise laktik ve asetik asit miktarında fermentasyonun 10. saatine kadar artış görülmüş ancak sonrasında azalma olduğu tespit edilmiştir. Sütteki laktik asit bakterileri asit üretimini olumlu yönde etkilemekle beraber fermentasyonun 6. saatinden itibaren asit üretiminde azalmalara neden olmuştur (Mousa vd., 2019).

S. boulardii mayası ile probiyotik bira üretimi üzerine olan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda şerbetçi otu (10, 20 ve 40 g) kullanılarak üretilen biranın 20 °C'de 28 gün boyunca depolanması sonucunda *S. boulardii* sayısı belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, eklenen şerbetçi otu miktarı arttıkça *S. boulardii* sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak son üründe *S. boulardii* sayısı 6 log kob/mL üzerinde olduğu için üretilen biranın probiyotik nitelikte olduğu belirtilmiştir (Emirlerog lu, 2021).

Sodyum aljinat matriksi ile enkapsüle *S. boulardii* probiyotik mayası ve kefir starteri ile üretilen ve 4°C'de 28 gün boyunca depolanan kefirin bazı özelliklerinin belirlendiği bir çalışmada, başlangıç *S. boulardii* sayısı 9 log kob/mL iken depolamanın 28. gününde 8.55 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Kefire *S. boulardii* maya ilavesi sonucunda asitlik artışı görülmemiştir. Kefire eklenen mikroenkapsüle *S. boulardii* sayısının depolamanın 28. gününde 6 log kob/mL üzerinde olması nedeniyle *S. boulardii* mayasının kefire ekstra probiyotik özellik kazandırabileceği anlaşılmıştır (Kalkan, 2019).

Fu vd. (2022) ise *S. boulardii* 'nin farklı zayıf asitlere (laktik asit, asetik asit, bütirik asit) karşı toleranslarını araştırmışlardır. Bu çalışmada *S. boulardii* mayası logaritmik fazda iken 10 mL alınarak santrüfjü edilmiş ve Kontrol örneği (Yeast Extract Peptone Dextrose-YPD Besiyeri), %0.5, %1, %2 asetik asit, %0.5, %1, %2 laktik asit, %0.5, %1, %2 bütirik asit içeren YPD besiyerine ilave edilmiştir. Elde edilen toplam 10 fermantasyon sıvısı 2 saat ara ile analize alınıp canlı maya sayıları kontrol edilmiştir. İnkübasyonun 16. saati sonunda zayıf asit koşullarına maruz kalmayan kontrol örneğinde *S. boulardii* sayısı 1.83×10^8 kob/mL iken %0.5 asetik asitli ortam koşullarında 1.77×10^8 kob/mL canlılık göstermiş olup %1 ve %2 asetik asitli ortamda *S. boulardii* inhibe olmuştur. YPD besiyeri ortamında asetik asidin *S. boulardii* mayasının canlılığına etkisi %1 asetik asit konsantrasyonundan itibaren kritik olduğu görülmektedir. Ancak mikroorganizmaların doğal ortamları olan gıdalarda farklı davranışlar sergilediği bilinmektedir. Bu nedenle sirke gibi yüksek asitli bir gıdada *S. boulardii* mayasının ne kadar süre canlı kalacağı henüz bilinmemektedir. Bu nedenle bu çalışmada *S. boulardii* mayasının asitliğe dirençli bir polimer kombinasyonu ile enkapsülasyonu yapılarak sirke ortamında daha uzun süre canlı kalması hedeflenmektedir.

2.3 Mikroenkapsülasyon

Probiyotik mikroorganizmaların gıda işleme, muhafaza ve gastrointestinal sisteme ulaşma basamaklarında canlılıklarını sürdürebilmelerini sağlamak için mikroenkapsülasyon (Mek) tekniği uygulanmaktadır. Mikroenkapsülasyon yöntemi ile probiyotik bakterilere yüksek asitlik gibi olumsuz çevre koşullarına karşı koruyucu bir fiziksel bariyer oluşturur. Enkapsülasyon üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde probiyotiklerin stabilitesini geliştirmek için en yaygın kullanılan polimerin aljinat olduğu görülmektedir (Ding ve Shah, 2008).

Laktik asit bakterileri, piyasada bulunan yoğurt, peynir ve kefir gibi fermante süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (De Prisco ve Mauriello, 2016). Ancak son zamanlarda mikrokapsülleme tekniklerinin yaygınlaşmasıyla probiyotiklerin meyve suyu, tahıl bazlı ürünler, çikolata ürünleri ve kurabiyelerde başarıyla kullanılması mümkün olmuştur. Probiyotiklerin meyve sularına ve tahıl ürünlerine ilavesi ürün matrisiyle etkileşim, yüksek asitlik ve ısı işlem vb. nedenlerle gerçek bir zorluk oluşturmaktadır. Probiyotik meyve sularının formüle edilmesi, probiyotik

mikroorganizmaların gelişmesini ve stabilitesini kısıtlayan 3-4.5 pH gibi düşük pH nedeniyle süt ürünlerinden daha karmaşıktır (Krasaekoopt vd., 2004). Bu sorunun giderilmesine yönelik yapılan çalışmalarda probiyotik mikroorganizmaların aljinat-kitosan polimerleri ile enkapsüle edilerek yüksek asitli gıdalara (nar suyu, elma suyu, havuç suyu vb.) ilave edildiği görülmektedir (Nualkaekul vd., 2012; Nazzaro vd., 2008; Gandomi vd., 2016).

Nualkaekul vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada kaplanmamış, tek ve çift kitosan kaplı aljinat boncuklarının *Lactobacillus plantarum* suşunun simüle mide solüsyonunda (pH 1.5) ve yüksek asitli bir meyve suyu olan nar suyunda (pH 3.21) hayatta kalmasına olan etkisi belirlenmiştir. Araştırmada *L. plantarum* suşu 37 °C'de 4 saat simüle mide solüsyonunda (pH 1.5) serbest hücre (SH), tek tabaka (ALG) tek tabaka (ALG-CTS) aljinat ve kitosan ve çift tabaka (ALG-CTS-ALG-CTS) aljinat ve kitosan kaplı mikro boncukları halinde bekletilmiş ve bakteri canlılığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda simüle mide solüsyonunda *L. plantarum* sayısı başlangıçta 8.3 log kob/mL iken 1. saatin sonunda SH, ALG, ALG-CTS, ALG-CTS-ALG-CTS için sırasıyla 6.3;3.8;7.1 log kob/mL olup 4. saatin sonunda ise sırasıyla 4.0;7.1;5.2 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Mide solüsyonunun (pH 1.5) pH derecesi dördüncü saatin sonunda SH, ALG-CTS, ALG-CTS-ALG-CTS için sırasıyla 1.58 pH, 1.68 pH ve 1.78 pH olarak ölçülmüştür. Çalışmanın ikinci aşamasında nar suyuna (3.21pH) başlangıçta 8.6 log kob/mL olarak eklenen *L. plantarum* sayısı 4 °C'de 6 hafta depolama süresi boyunca takip edilmiştir. Çalışma sonucunda, SH ve ALG örneklerinde depolamanın dördüncü haftasında *L. plantarum* inhibe olurken depolamanın altıncı haftası sonunda ALG-CTS ve ALG-CTS-ALG-CTS örneklerinde ise sırasıyla 5.7 ve 6.6 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Aynı örneklerin pH sonuçları incelendiğinde ise; ALG örneği için depolamanın dördüncü haftası sonunda 3.19 pH iken ALG-CTS ve ALG-CTS-ALG-CTS örneklerinde 3.45 pH ve 3.63 pH olduğu belirlenmiştir. Genel olarak bu çalışma, çok katmanlı kitosan kaplamanın aljinat polimeri tarafından sağlanan korumayı arttırdığını ve nar suyu gibi oldukça asidik bir gıdada probiyotik hücrelerin hayatta kalma şansını arttırmak için uygulanabilecek bir yöntem olduğunu göstermiştir. Tek ve çift kaplamalı boncukların daha yüksek koruyucu etkisi, büyük olasılıkla oluşan kalın aljinat-kitosan ve aljinat-kitosan-aljinat-kitosan zarlarından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte boncukların sertlik, boyut ve stabilite gibi fiziksel özellikleri, ürünün organoleptik özelliklerini etkilemektedir.

Nazzaro vd. (2008) tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise havuç suyuna (5.79 pH) eklenen aljinat-inülin-ksantan sakızı ile enkapsüle edilen *Lactobacillus acidophilus* probiyotığının 4°C'de 8 hafta depolama süresi boyunca canlılığı belirlenmiştir. Kapsülleme işlemi fermentasyon ve depolama aşamalarında hücre canlılığını önemli ölçüde artırmıştır. Havuç suyunda *L. acidophilus* sayısı serbest hücre ve enkapsüle edilmiş form için sırasıyla başlangıçta 1.2×10^7 kob/mL ve 1.3×10^7 kob/mL iken depolamanın sekizinci haftası sonunda 2.08×10^8 kob/mL ve 4.35×10^{10} kob/mL olarak tespit edilmiştir. Aynı havuç suyu örneklerinin pH değerleri ise serbest hücre ve enkapsüle edilmiş form için sırasıyla başlangıçta 5.79 pH ve 5.68 pH iken depolamanın sekizinci haftası sonunda 3.37 pH ve 3.74 pH olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda da kapsülleme işlemi probiyotik bakteri canlılığını ve aktivitesini korumuştur. Ayrıca bu çalışma ile, mikroenkapsülasyonda kullanılan polimer kombinasyonlarına prebiyotik bir bileşen olarak inülinin eklenmesinin gıdanın fonksiyonel özelliklerini geliştirebildiği anlaşılmıştır.

Elma suyuna (3.82 pH) *Lactobacillus rhamnosus* GG probiyotik suşunun aljinat ve kitosan ile enkapsüle formu ilave edilerek 4 ve 25°C'de 90 gün depolandığı bir çalışmada başlangıçta %95 olşan *Lactobacillus rhamnosus* GG bakteri canlılığı depolama sonunda serbest hücre ve kapsüllenmiş hücre için sırasıyla %15 ve %79 olduğu belirlenmiştir. Aynı örneklere inülin ilave edildiği zaman *Lactobacillus rhamnosus* GG canlılığında serbest hücrede %5 artış olurken enkapsüle formda ise %1 oranında artış olduğu ve bu farkın önemli ($p < 0.05$) olduğu anlaşılmıştır. Depolama sırasında probiyotik canlı sayısı bir probiyotik ürün için gerekli olan seviyeyi (10^6 kob/mL) geçmiştir. Elma suyu örneklerinin 4 °C'de 90 gün depolama sonunda pH değeri serbest hücre için 3.46 pH ve enkapsüle form için 3.37 pH 'ya düşmüş ve oluşan farkın önemli ($p < 0.05$) olduğu saptanmıştır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre probiyotik bakteri enkapsülasyonunun herhangi bir olumsuz organoleptik etki oluşturmadan hem elma suyunun depolanması sırasında hem de gastrointestinal kanalda bakteri sağkalımını iyileştirmek için etkili bir yöntem olduğu anlaşılmıştır (Gandomi vd., 2016).

Krasaekoopt vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, yoğurt ve portakal suyuna aljinat ve kitosan polimerleriyle mikrokapsüle edilmiş *Lactobacillus acidophilus* 5 ve *Lactobacillus casei* 01 suşları ilave edilmiş ve 4 °C'de dört hafta süreyle depolanmıştır.

Kitosan ile kaplanmış aljinat mikroenkapsüllerine inülin ve galaktooligosakkarit (GOS) %0, 0.5, 1.0 ve 1.5 oranında eklenmiş ve bu prebiyotiklerin probiyotiklerin hayatta kalmasına etkisi araştırılmıştır. *L. acidophilus* 5 ve *L. casei* 01 sayısında, %1.5 GOS içeren yoğurt örneklerinde GOS içermeyen örneklere göre sırasıyla 1.1 ve 0.4 log kob/mL kadar artış olduğu tespit edilmiş olup portakal suyunda da sırasıyla 0.5 ve 0.4 log kob/mL kadar artış olduğu tespit edilmiştir. Probiyotik bakteri sayısı, her iki üründe de depolama boyunca önerilen terapötik miktarın (7 log kob/g) üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Mikroenkapsülasyonda GOS (%0.3) varlığı simüle mide sıvısında (pH 1.55) sırasıyla *L. acidophilus* 5 ve *L. casei* 01 için 3.1 ve 2.9 log azalma ile en iyi korumayı sağlamıştır.

Literatürde yüksek asitli gıdalara ilave edilen probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu üzerine yapılmış çalışmalar Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Yüksek asitli gıdalarda probiyotik mikroorganizmaların enkapsülasyonu üzerine yapılmış çalışmalar.

Gıda Maddesi	Enkapsüle Mikroorganizma	Kapsülasyon Tekniği	Enkapsülasyon Polimeri	Polimer Oranları	Kaynak
Nar Suyu (pH 3.21)	<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826	Ekstrüzyon	Aljinat/Kitosan	%3 Sodyum Aljinat, %4 Kitosan	(Nualkaekul vd., 2012)
Havuç Suyu (pH 5.79)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079	Ekstrüzyon	Aljinat/İnülin/Ksantan Sakızı	%2 Sodyum Aljinat, %1 İnülin, %0.15 Ksantan Sakızı	(Nazzaro vd., 2008)
Elma Suyu (pH 3.82)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Ekstrüzyon	Aljinat/Kitosan	%2 Sodyum Aljinat, %4 Kitosan	(Gandomi vd., 2016)
Meyve Suyu	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Ekstrüzyon	Aljinat/İnülin/Ksantan Sakızı	%2 Sodyum Aljinat, %1 İnülin, %0.15 Ksantan Sakızı	(Fратиanni vd., 2014)
Meyve Suyu ve Yoğurt	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La 5- <i>Lactobacillus casei</i> Lc 01	Ekstrüzyon	Aljinat/Kitosan Galaktooligosak karit (GOS)/ İnülin	%2 Sodyum Aljinat, %1 İnülin, %4 Kitosan	(Krasaekoopt ve Watcharapoka, 2014)
Elma Parçaları	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Ekstrüzyon	Aljinat	%2 Aljinat	(Gallo vd., 2014)
Kızılçık Suyu (pH 2.46) ve Nar Suyu (pH 2.61)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Ekstrüzyon	Peynir Altı Suyu Proteini (WPI), Elma Pektini, Aljinat, k-karragenan, i-karragenan, İnülin	%1 WPI, %1 Elma Pektini, %1 Aljinat, %1 K - KC, %1 I - KC, %1 İnülin	(Doherty vd., 2012)
Dut Suyu	<i>Lactobacillus casei</i> 01, <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5, <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Ekstrüzyon	Aljinat, Tayland Bitkisel Özleri Karışımı	%2 Aljinat %2 Tayland Bitkisel Özleri Karışımı	(Chaikhram, 2015)
Kavun Suyu	<i>Lactobacillus casei</i> 01, <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5, <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Ekstrüzyon	Aljinat, Tayland Bitkisel Özleri Karışımı	%2 Aljinat %2 Tayland Bitkisel Özleri Karışımı	(Chaikhram, 2015)

2.3.1 Mikroenkapsülasyon yöntemleri

Mikrokapsülleme teknolojisi, doğal içeriklere özel faydalı özellikler kazandırabilmekte ve gıda endüstrisinde birçok farklı amaç için kullanılabilir. Bu amaçlar şu şekildedir:

- Kaplanan maddeyi dış etkenlere (nem, sıcaklık, hava ve ışık gibi) karşı korumak
- Depolama sırasında tat ve koku kaybını önlemek
- Fiziksel özelliklerinin daha iyi korunması
- Kaplanmış malzemeler arasında oluşabilecek istenmeyen etkileşimleri ve olası oksidasyonu önlemek
- Probiyotik mikroorganizmaların etrafında fiziksel bir bariyer oluşturarak olumsuz çevre koşullarına karşı canlılığı korumak olarak ifade edilebilir (Desai ve Park, 2005).

Mikroenkapsülasyon yönteminin belirlenmesi kadar kaplama yapılacak olan materyal de oldukça önemlidir. Kaplanacak materyal türü karbonhidratlar, gamlar, lipidler, selülozlar veya protein sınıfından olmaktadır (Peker ve Arslan, 2011). Çizelge 2.2’de mikroenkapsülasyon teknolojisinde kullanılan kaplama materyalleri, uygulama yöntem ve uygulama alanları verilmiştir (Peker ve Arslan, 2011).

Çizelge 2.2. Mikroenkapsülasyon teknolojisinde kullanılan kaplama materyalleri, uygulama yöntem ve alanları.

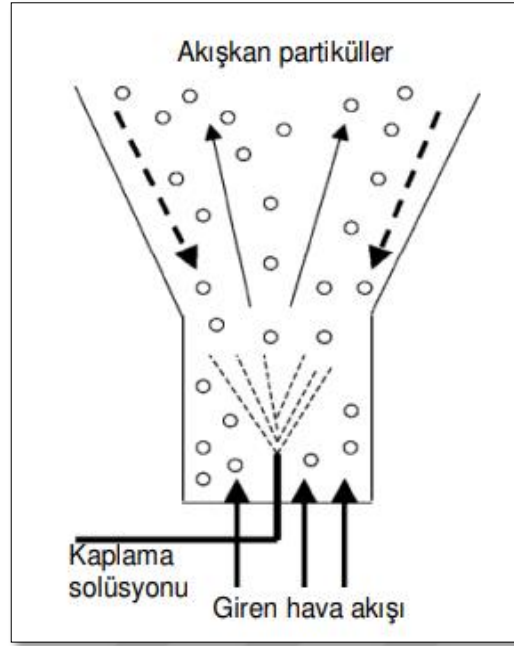
Kategori	Kaplama Materyali	Mikroenkapsülasyon Yöntemi	Uygulama Alanı
Karbonhidrat	Nişasta, Maltodekstrin, Mısır şurubu tozu, Modifiye nişasta, Siklodekstrin, Kitosan	Dondurarak kurutma, Ekstrüzyon yöntemi, Koaservasyon yöntemi	Aroma bileşenleri, Yağlar, Probiyotikler
Selüloz	Karboksi metil selüloz, Metil selüloz, Etil selüloz, Selüloz asetat-bütilat-fitalat	Koaservasyon yöntemi, Püskürterek kurutma	Tatlandırıcılar, Lezzet vericiler, Vitaminler
Gamlar	Gam akasya, Agar, Sodyum aljinat, Karregen	Püskürterek kurutma	Yağlar, Probiyotikler
Lipidler	Vaks, Parafin, Diaçilgliserol	Emülsiyon, Lipozom, Film oluşturma	Vitaminler, Enzimler
Protein	Gluten, Kazein, Jelatin, Albümin, Peptitler	Emülsiyon, Püskürterek kurutma	Probiyotik bakteriler, Balık yağı

Püskürterek kurutma yöntemi, 1950’li yıllardan beri uygulana gelen bir kurutma işlemi prosesi olmakla birlikte kaplaması yapılacak olan materyalin polimer bir matriks içinde kalması şeklinde uygulanan bir mikroenkapsülasyon tekniği olarak kabul edilmektedir (Gharsalloui vd., 2007). Uygulanacak olan proses üç aşamadan oluşmaktadır. Polimer maddenin emülsiyonunun hazırlanması ve kaplanacak materyal ile homojenizasyonunun ardından homojen kitlenin kurutma hücresindeki atomizasyonu ile proses son bulmaktadır. Kurutma işleminde taşıyıcı gaz olarak oksijen veya azot gazı tercih edilmektedir (Kınık vd., 2003).

Dondurarak kurutma yöntemi, ürünün dondurulması ve süblimasyon yoluyla buz kristallerinin üründen uzaklaştırılması esasına dayanır. Dondurarak kurutma iki aşamada gerçekleşir. Dondurma, gıdanın içindeki suyun hızlı dondurma veya derin dondurma yoluyla buz kristallerine dönüştürüldüğü bir işlemdir. Ana kurutma, süblimleşme yoluyla buz kristallerinin üründen uzaklaştırılmasıdır, ikinci kurutma ise gıdadaki bağlı suyun uzaklaştırılmasıdır. Dondurma yönteminin avantajları arasında; aroma kaybının oldukça az oluşu, elde edilen ürünün geri kazanım özelliklerinin çok iyi olması ve gıdadaki çözünmüş maddelerin hareketinden kaynaklanan kayıpların minimum olması yer almaktadır. Ancak bu yöntemin yüksek maliyet ve uzun işlem süresi gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Peker ve Arslan, 2011).

Koaservasyon yöntemi, kaplama malzemesinin sıvı fazının polimer çözeltisinden ayrılmasını ve bu fazın çekirdek parçacıkları çevresinde tekdüze bir tabaka halinde tutulmasını içermektedir (Desai ve Park, 2005). Yöntemde sistemin yüzey enerjisi, sıcaklık ve pH değiştirilerek, çekirdek ve kaplama materyalinin kümeleşmesi sağlanmaktadır. İşlem tamamlandıktan sonra mikrokapsüller, filtreleme ve santrifüjleme gibi bir dizi ayırma yöntemiyle ortamdan ayrılır ve ardından tek tek parçacıklar, standart bir teknik kullanılarak kurutulur (Kınık vd., 2003).

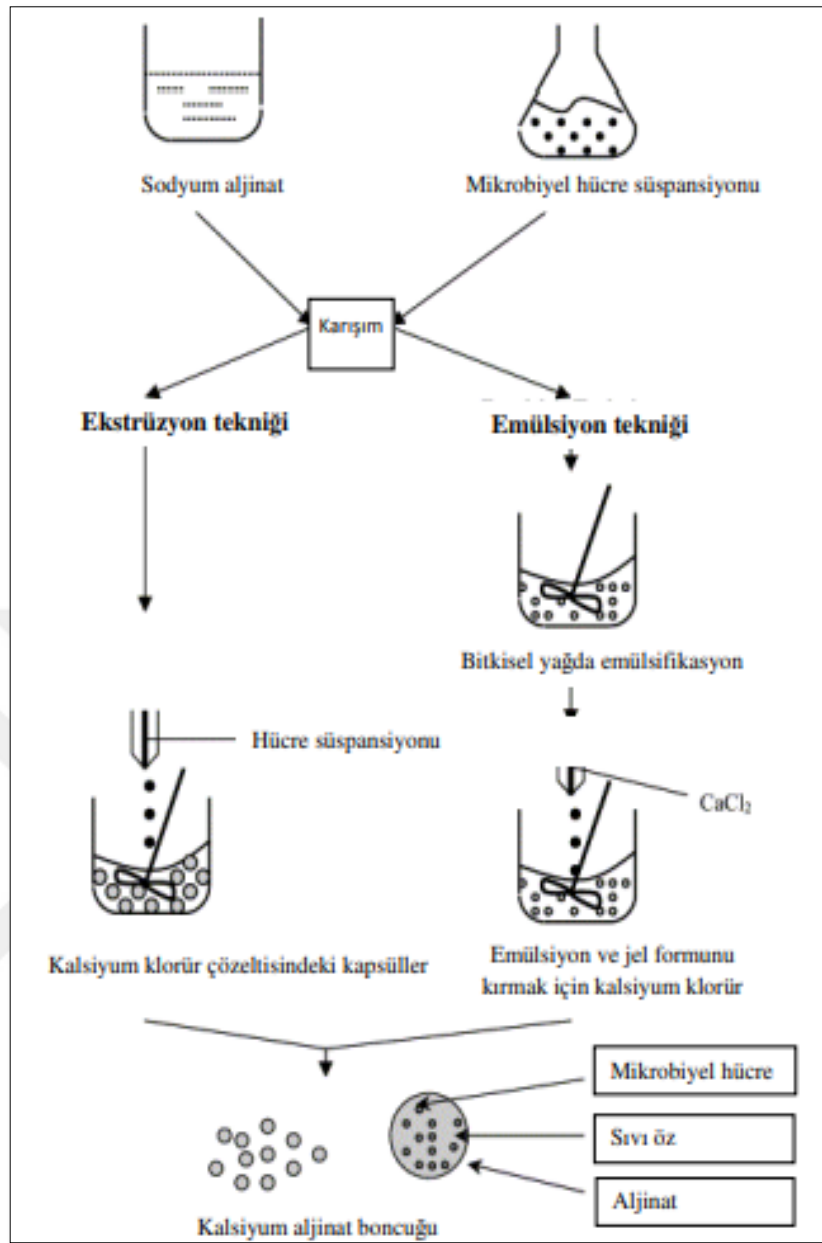
Akışkan yatak yöntemi, çekirdeğin yukarı doğru hareketle ısıtılan veya soğutulan bir hava akımı içerisinde tutulmasına dayanmaktadır. Bu yöntemde erimiş veya uçucu bir solvent içerisinde çözünmüş kaplama malzemeleri genellikle selüloz türevleri, dekstrinler, emülgatörler, lipitler, proteinler ve nişasta türevleridir (Kınık vd., 2003). Şekil 2.5’te akışkan yatak kaplama yöntemine ait bir görsel verilmiştir (Desai ve Park, 2005).



Şekil 2.5. Akışkan yatak püskürterek kaplama.

Emülsiyon yönteminde ise hedef çekirdek malzemesi öncelikle başka bir solvent içerisinde emülsifiye edilir ve daha sonra arayüzde oluşturulan kabuk tarafından sarılır. Suda yağ emülsiyonları kullanılarak çeşitli lipofilik maddeler, farklı kabuk oluşturu malzemelerle mikrokapsüllenebilmektedir. Emülsiyon tekniği kullanılarak çekirdek-kabuk yapısına ve nano ölçekten mikro ölçeğe kadar ayarlanabilir boyuta sahip kuru ve akışsız mikrokapsüller elde edilebilmektedir. Emülsiyon tekniği, yağ içinde su emülsiyonları kullanılarak hidrofilik maddelerin mikrokapsüllenmesi için de uyarlanabilmektedir (Zhang vd., 2022). Emülsiyon tekniği işlem basamakları Şekil 2.6’da verilmiştir (Krasaekoopt vd., 2004).

Ekstrüzyon yöntemi, kaplama materyali ve çekirdek içeren çözeltinin yüksek basınçla küçük açıklıklardan geçirilmesi esasına dayanır. Çoğunlukla düşük sıcaklıkta kapsülleme yöntemi olarak bilinen bu yöntem, uçucu ve düşük ısıya dayanıklı aromaların kapsüllenmesi için kullanılır (Kınık vd., 2003). Ucuz, basit ve verimli bir yöntem olmasına karşın mikro boncuk oluşumunun yavaş olması nedeniyle büyük ölçekli üretimlerde kullanım zorluğu yaşatmaktadır (Özcan ve Altun, 2013). Ekstrüzyon tekniği işlem basamakları Şekil 2.6’da verilmiştir (Krasaekoopt vd., 2004).



Şekil 2.6. Ekstrüzyon ve emülsiyon tekniği.

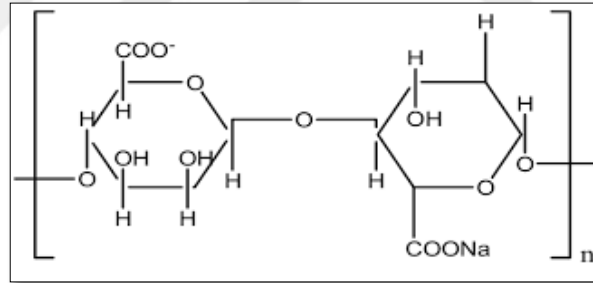
2.3.2 Mikroenkapsülasyonda kullanılan bazı polimerlerin özellikleri

Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonunda kullanılacak olan kaplama materyali büyük öneme sahiptir. Literatüre göre, biyo-polimerler (aljinat, kitosan, pektin, nişasta, gellan sakızı, ksantan sakızı, karragenan, keçiyoynuzu sakızı ve süt proteinleri gibi) gıda sınıfı kaplamalar probiyotik mikrokapsülasyonu için en uygun malzemelerdir. Belirli stres koşullarına (örneğin mide asitliği, safra tuzları ve enzimler) karşı etkili fiziksel bariyerler oluşturarak koruma sağladıkları saptanmıştır (Cook vd., 2012; Calinoiu vd., 2019).

Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu için çeşitli polimer maddeler kullanılmaktadır. İstenen koruma özellikleri ve enkapsülasyon veriminin tek bir polimer ile karşılanması mümkün olmadığı için çeşitli polimer kombinasyonları ile kullanılmaktadır. Bu nedenle tez çalışmasında, asit direnci yüksek olan kitosan ve aljinat polimerleri kombine kullanılarak enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.3.2.1 Sodyum aljinat

Sodyum aljinat, farklı alg türlerinden elde edilen bir deniz yosunudur. Kimyasal olarak, β -D-mannuronik asit ve α -L-guluronik asitten oluşmaktadır. Şekil 2.7’de sodyum aljinatın kimyasal yapısı yer almaktadır. Sodyum aljinat kıvam artırıcı, serbest suyu bağlayıcı, stabilizatör, film oluşturucu ve jelleştirici özelliktedir. Aljinat, probiyotik suşların ısı, pH gibi proses faktörlerine karşı korunması için çok yönlü, biyouyumlu ve toksik olmayan bir matris olmakla birlikte düşük pH değerlerine karşı hassastır. Ayrıca sodyum aljinattan hazırlanan mikrokapsüller yüksek gözenekliliğe sahiptir (Ding ve Shah, 2008). Bu nedenle yüksek asitli gıdalarda tek başına aljinat kullanılması etkisiz olabilmektedir.



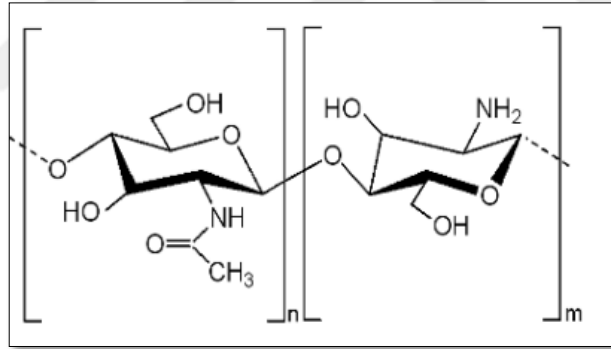
Şekil 2.7. Sodyum aljinatın kimyasal yapısı.

Aljinat mikrokapsüllere ek bir kitosan kaplaması yapılmasının, aljinat kapsüllerin yoğunluğu ve mukavemeti üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Gandomi vd., 2016). Kitosan/aljinat kombinasyonu zıt yüklü polimerler olduğu için polimer zincir sarmalları arasındaki etkileşimler ile güçlü hidrojeller oluşturabilme kabiliyetindedir. Kitosan kaplı aljinat kapsüller, aljinat mikrokapsüllerin gözenekliliğini azaltır ve sadece aljinattan oluşan kapsüllere göre daha iyi bir fizikokimyasal stabilite sağlar. Asidik koşullara maruz kalma sırasında özellikle aljinat-kitosan kombinasyonu kitosanın anyonik aljinata göre güçlü katyonik doğası nedeniyle etkili koruma sağladığı saptanmıştır (Krasaekoopt vd., 2004). Yüksek asitli

gıdalarda tek başına aljinat kullanılması etkisiz olabildiği için asit direnci olduğu bilinen kitosan polimeri ile çift tabaka enkapsülasyon yapılması gerekmektedir. Bu amaçla kitosan polimerinin en umut verici kaplama malzemelerinden biri olduğu görülmektedir (Cook vd., 2012; Calinoiu vd., 2019).

2.3.2.2 Kitosan

Kitosan, kitinin kısmen veya tamamen deasetilasyonu sonucu elde edildiği için farklı oran ve sayıda 2-amino-2-deoksi-β-D-glukopiranoz (D-glukozamin, deasetile form, yaklaşık % 80) ve 2-asetamido-2-deoksi-β-D-glukopiranoz (N-asetil-D-glukozamin, asetile form, yaklaşık % 20) moleküllerinin β-(1,4) bağı ile bağlanması sonucu oluşan düz zincirli bir kopolimerdir (Yıldırım vd., 2016). Şekil 2.8’de kitosanın kimyasal yapısı yer almaktadır (Berger vd, 2004). Kökeni yengeç, karides ve kerevitlerin kabuk atıklarıdır (Anal ve Singh, 2007). Kitosan, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip aynı zamanda selüloza benzeyen ve doğada bulunabilirliği açısından selülozdan sonra ikinci sırayı alan biyopolimerdir (Casettaria vd., 2012).



Şekil 2.8. Kitosanın kimyasal yapısı.

Kitosanın fizikokimyasal özellikleri deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı ile değişmektedir. Deasetilasyon derecesi %40-98, molekül ağırlığı ise 50.000–2.000.000 Da arasında değişmektedir (Aranaz vd., 2009; Kristi vd., 1993). Kitosan beyaz renkte, kokusuz, yarı şeffaf toz veya partikül halinde sindirim enzimlerine dayanıklı ancak bazı bakteriler tarafından bozulan bir biyopolimerdir (Erkan Koç ve Özkan, 2011; Yıldız ve Yangılar, 2014). Sadece asidik çözeltilerde (asetik asit, formik asit, laktik asit) çözünmesinin sebebi pH 6.3’te primer amin grupları taşınması sebebiyle alkali yapıda sayılmaktadır. En yaygın kullanılan çözücü, pH 4-5 aralığındaki %1-2’lik asetik asittir. Ayrıca kitosan solüsyonlarının bazı şartlar altında stabilitesi

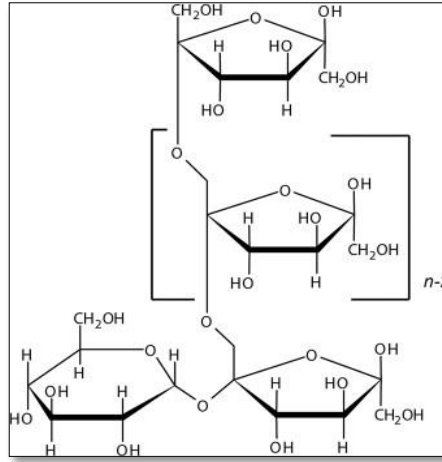
bozunabilmektedir (Bostan vd., 2007; Yıldız ve Yangılar, 2014). Bunlardan bazıları pH 7.0 ve üzerinde olması, oda sıcaklığında uzun süre muhafaza edilmesi gibi koşullardır. Kitosan asidik pH'larda polikasyonik özellik (pK= 6.2-6.8) taşımaktadır (Jeon vd., 2002). Bu sayede birçok metal iyonu ile etkileşebilmektedir ve ağır metallerin ayrıştırılmasında kullanılabilir (Duman ve Şenel, 2004).

Kitosanın antimikrobiyal etkisi, mikroorganizmaların hücre duvarını bozarak veya metabolik aktivitelerini engelleyerek mikrobiyal gelişmeyi önlemek şeklindedir (Berger vd., 2004; Kurtuluş ve Vardar, 2020). Kitosanın Gram pozitif (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) ve Gram negatif (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*) bakterilere karşı mantar ve algelere kıyasla daha yüksek bir inhibisyon verimliliği bulunmaktadır. Bu nedenle endüstriyel ve tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır (Kurtuluş ve Vardar, 2020).

Kitosan kaplamanın ana avantajları benzersiz kasyonik karakter, yüksek biyouyumluluk, toksik olmama ve biyolojik olarak parçalanabilirliktir. Bu nedenle gıda ve ilaç endüstrisinde kullanımı oldukça uygundur. Ayrıca kitosan yüksek asitliğe karşı koruma sağlayan ve su emme kapasitesi yüksek olan bir polimerdir (Kurtuluş ve Vardar, 2020). Bu nedenle tez çalışmasında yüksek asitli bir gıda olan nar sirkesine *S. boulardii* mayası eklenirken enkapsülasyon polimeri olarak asidik koşullarda güçlü kasyonik özellik gösteren kitosan polimeri tercih edilmiştir.

2.3.2.3 İnülin

Prebiyotik olarak inülin, gastrointestinal sistem ve bağışıklık sistemine olumlu etkiye bulunan soğan, sarımsak, pırasa, hindiba ve enginar gibi birçok sebze de bulunan bir fruktoz oligomeridir. İnülin, çok basit bir kimyasal yapıya sahip değildir. Fruktoz ünitelerinin β -2-1 bağları ile bağlanması ile oluşur. Şekil 2. 9'da inülinin kimyasal yapısı yer almaktadır (Delzenne ve Kok, 2001).



Şekil 2.9. İnülinin kimyasal yapısı.

Son yıllarda inülin jelleştirici, kıvam verici, tatlandırıcı ve prebiyotik özelliklerinden dolayı gıda sanayisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Yabancı, 2010). Kolondaki yararlı bakterilerin gelişimini teşvik ederken istenmeyen bakterilerin gelişimini baskılamaktadır. İnülin üzerine yapılan çalışmalarda, yüksek fruktanli beslenme sonucunda inülinin, kandaki insülin, kolesterol ve triaçilgliserol konsantrasyonunu düşürmeye yardımcı olduğu ve sağlığı olumlu yönde etkileyen fonksiyonel bir bileşik olduğu vurgulanmıştır (Delzenne ve Kok, 2001).

Prebiyotikler bağırsaklarda bulunan probiyotik mikroorganizmaların gelişmesini stimüle eden, gastrointestinal sistemin üst bölümlerinde sindirime uğramadan (ince bağırsakta sindirilmeyen) kolona geçebilen, kalın bağırsakta fermente olabilen ve patojen bakterilerin sayısını sınırlayan oligosakkaritlerdir. Probiyotik ve prebiyotik aynı üründe sinbiyotik olarak bulunması her ikisinin de olumlu fonksiyonel etkilerinden faydalanılmasını sağlar (Holzapfel ve Schillinger, 2002). Yapılan araştırmalar ile probiyotik mikroorganizma ve prebiyotik bileşiği birlikte içeren gıdalarda probiyotiklerin daha uzun süre canlı kaldığı ve sinerjistik bir etki ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Gandomi vd., 2016; Krasaekoopt vd., 2004).

Literatüre bakıldığında probiyotik mikroorganizmaların gıdalara inoküle edildiği çalışmalarda prebiyotiklerin de ilave edildiği ve en çok kullanılan prebiyotik bileşiğin inülin olduğu tespit edilmiştir (Gandomi vd., 2016; Krasaekoopt vd., 2004). Bu nedenle tez çalışmasında enkapsüle *S. boulardii* mayasının nar sirkesi gibi yüksek asitli bir gıdada uzun süre canlı kalabilmesini sağlamak için prebiyotik olarak inülin kullanılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Nar sirkesi

Tez çalışmasında kullanılan nar sirkesi ev tipi olup yüzey kültür yöntemiyle üretilmiş olup Ankara'dan temin edilmiştir. Şekil 3.1'de nar sirkesine ait görsel verilmiştir.



Şekil 3.1. Nar sirkesi (ev tipi üretim).

3.1.2 *Saccharomyces boulardii* kültürü

Saccharomyces boulardii CNCM I-745 (Biocodex, Fransa) probiyotik mayası liyofilize formda Reflor markasıyla eczaneden temin edilmiştir.

3.1.3 Besiyerleri, polimerler ve kimyasallar

S. boulardii CNCM I-745 suşunun canlandırılmasında Yeast Ekstrakt Peptone Broth (YEPD Broth-Merck) (maya ekstraktı 5 g/L, et peptonu 10 g/L, glukoz 20 g/L) besiyeri, tek koloni elde edilmesinde ise Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YEPD Agar-Merck) (maya ekstraktı 5 g/L, et peptonu 10 g/L, glukoz 20 g/L, agar 15 g/L) besiyeri kullanılmıştır. Sirke örneklerinde *S. boulardii* maya sayısı Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC; Merck-Almanya) besiyerinde belirlenmiştir.

Maya sayımlarında seyreltme çözeltisi olarak %0.85 NaCl fizyolojik tuzlu su (Merck) kullanılarak dilüsyonlar yapılmıştır. Santrifüj sonrası hücrelerin yıkanmasında tamponlanmış peptonlu su (TPS) (Buffered Peptone Water) (pepton 10 g/L, NaCl 5 g/L, Na₂HPO₄.12H₂O 9 g/L, K₂HPO₄ 1.5 g/L) kullanılmıştır.

S. boulardii mayasının mikroenkapsülasyonu için sodyum aljinat (Alfasol, Türkiye), kitosan (Sigma-Aldrich, 448877, ABD) ve inülin (Fibrelle, Belçika) polimerleri temin edilmiştir. Kitosanın çözünmesinde asetik asit (CH₃COOH) (Merck, Almanya) ve kapsüllerin sertleştirilmesinde kalsiyum klorür (CaCl₂) (Beyanlab, Türkiye) kullanılmıştır.

Enkapsülasyon veriminin belirlenmesi amacıyla mikrokapsüllerin salınımlarında fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.2 PBS (Phosphate Buffer Saline) (NaCl 8.5g/L, K₂HPO₄ 1.2g/L, Na₂HPO₄ 0.22g/L) (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

Potansiyometrik yöntemle asetik asit tayininde kesin Normaliteli 0.1 N NaOH (Merck, Almanya) ve fenolftalein (Merck, Almanya) indikatörü kullanılmıştır. Ayrıca tüm çözeltilerin hazırlanmasında distile su (Merck-Millipore) temin edilmiştir.

3.2 Metot

Bu tez çalışmasında, *S. boulardii* probiyotik mayası serbest hücre formunda (SH), inülin prebiyotigi içeren tek tabaka aljinat (ALG-INU) ve çift tabaka aljinat ile kitosan (CTS-ALG-INU) polimerleriyle ekstrüzyon yöntemiyle simbiyotik mikroenkapsüle edilerek nar sirkesine eklenmiştir. Nar sirkesi örneklerinin 4±1 °C’de depolama süresinin 0, 1, 2, 3 ve 4. haftalarında bazı kimyasal özellikleri (titrasyon asitliği değeri, pH değeri, suda çözünür kuru madde miktarı) ile *S. boulardii* maya sayısı belirlenmiştir.

3.2.1 *S. boulardii* kültür aktivasyonu

S. boulardii kültürünün aktivasyonu amacıyla 2 g liyofilize probiyotik maya, 5 mL sterilize distile suya aseptik koşullarda eklenerek karıştırılmış ve oluşturulan süspansiyondan YEPD Agar besiyerine sürme yapılarak 25 °C’de 2 gün inkübe edilmiştir.

3.2.2 Polimer çözeltilerin hazırlanması

Mikroenkapsülasyon işleminde polimer çözeltileri sodyum aljinat %3 (m/v), kitosan %0.4 (m/v) ve inülin %1 (m/v) olarak kullanılmıştır (Nualkaekul vd., 2012; Gandomi vd., 2016; Krasaekoopt vd., 2004).

Sodyum aljinat çözeltisi %3 (w/v), 3 gram sodyum aljinatın 100 mL distile suda 50°C’de kontrollü olarak tamamen homojenize bir kıvam elde edilinceye kadar 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda (Shin Saeng, SHPM-10, Kore) çözünmesi ile hazırlanmıştır. Daha sonra sodyum aljinat çözeltisi otoklavda (Nüve, OT40L, Türkiye) 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Mikroenkapsülasyonda sodyum aljinat kullanım oranı 1 mL hücre süspansiyonuna %3 (m/v) sodyum aljinat çözeltisinden 9 mL olacak şekilde uygulanmıştır (Nualkaekul vd., 2012).

Kitosan çözeltisi %0.4 (w/v), 4 gram kitosanın 950 mL distile su ile 0.1 M asetik asit içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcıda 2 gün süreyle kontrollü olarak karıştırılmıştır. Mikroenkapsülasyonda kitosan kullanım oranı 1 mL hücre süspansiyonuna %0.4 (m/v) kitosan çözeltisinden 7 mL olacak şekilde uygulanmıştır (Nualkaekul vd., 2012).

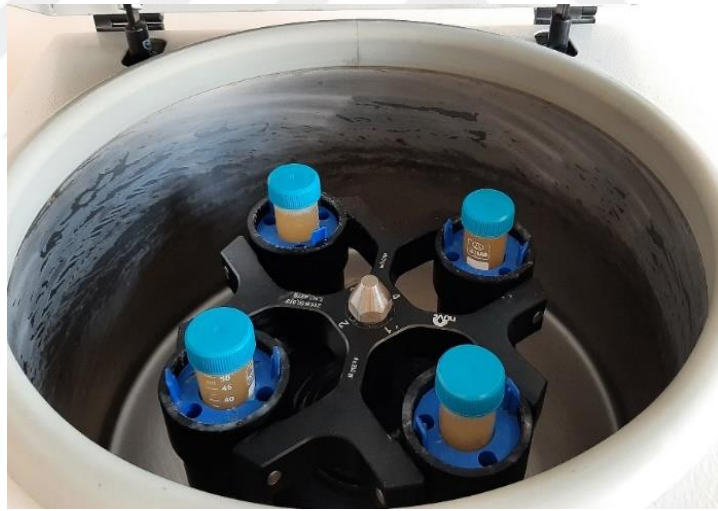
İnülin çözeltisi %1 (m/v), 1 gram inülinin 100 mL distile suda çözünmesi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan inülin çözeltisi otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Mikroenkapsülasyonda inülin kullanım oranı 1 mL hücre süspansiyonuna %1 (m/v) inülin çözeltisinden 5 mL olacak şekilde uygulanmıştır (Nualkaekul vd., 2012).

Mikroenkapsülasyonda hücrelerin katılaştırılması amacıyla kullanılan 0.15 M kalsiyum klorür (CaCl_2) çözeltisi, 1.67 gram CaCl_2 tartılarak 100 mL distile suda çözündürülerek hazırlanmış ve 25°C’de 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra kalsiyum klorür (CaCl_2) çözeltisi otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir.

ALG-INU mikro boncukları; 1 mL maya hücre süspansiyonu, 9 mL %3 (m/v) sodyum aljinat çözeltisi ve 5 mL %1 (m/v) inülin çözeltisi ile karıştırılarak hazırlanmış ve 10 mL 0.15 M CaCl_2 çözeltisinde sertleştirilmiştir. Bu kapsüller 7 mL %0.4 (m/v) kitosan çözeltisine ilave edilerek CTS-ALG-INU hazırlanmıştır (Nualkaekul vd., 2012).

3.2.3 *S. boulardii* maya çözeltisinin hazırlanması

S. boulardii kültürü aktivasyonundan sonra elde edilen tek maya kolonilerinden alınarak, YEPD Broth besiyerine inoküle edilmiş ve 30 °C’de 1 gün çalkalamalı su banyosunda (N-Biotek, NB-303, Kore) inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültür, 50 mL steril santrifüj tüplerine aktararak 4 °C’de 4100 rpm döndürme hızında 10 dakika santrifüj (Nüve, NF 800R, Türkiye) edilmiştir (Şekil 3.2). Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti 2 kez tamponlanmış peptonlu su ve 2 kez de steril distile su olmak üzere dört kez yıkanarak aynı koşullarda santrifüj edilmiştir (Karaolis vd., 2013). Santrifüj sonrası hücre peleti steril, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS 7.2 pH) ile tekrar süspanse edilerek mikroenkapsülasyon işleminde kullanılmıştır. Bu işlemler aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen probiyotik maya çözeltisindeki canlı hücre sayısının belirlenmesi amacıyla YEPD Agar besiyerine yayma kültürel sayım yöntemiyle ekim yapılarak 25 °C’de 2 gün inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2. *S. boulardii* kültürünün santrifüj işlemi.

3.2.4 *S. boulardii*’nin ekstrüzyon yöntemiyle mikroenkapsülasyonu

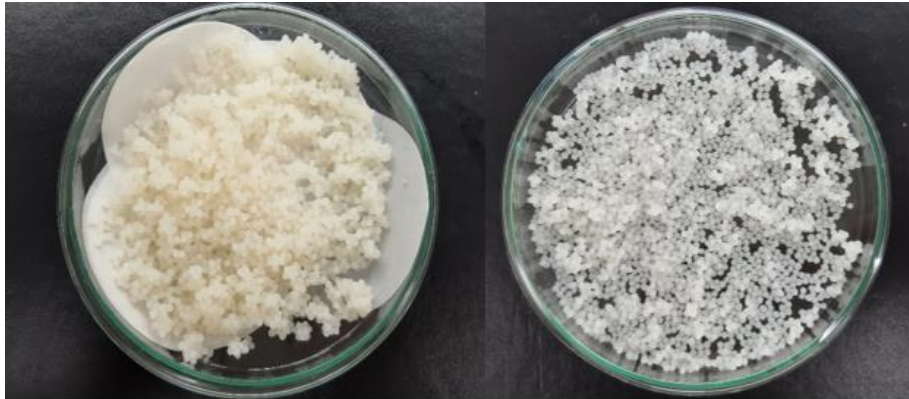
S. boulardii mayasının mikroenkapsülasyonu için ekstrüzyon yöntemi uygulanmıştır. Enkapsülasyon işlemi için Gandomi vd. (2016), Krasaekoopt vd. (2004) ve Nualkaekul vd. (2012) yöntemleri modifiye edilerek uygulanmıştır. *S. boulardii* sayısı ~9 log kob/mL olan 1 mL hücre süspansiyonu, 9 mL %3 (m/v) sodyum aljinat çözeltisi ve 5 mL %1 (m/v) inülin çözeltisi bek alevi yanında steril bir beherde manyetik

karıştırıcıda 500 rpm’de 30 dk karıştırılmıştır. Elde edilen polimer-prebiyotik-kültür karışımı steril 21G şırınga (iç çapı 0.8 mm) ile yaklaşık 10 cm yükseklikten manyetik karıştırıcıda 300 rpm’de karıştırılan 0.15 M CaCl_2 çözeltisine peristaltik pompa vasıtasıyla damlacıklar halinde enjekte edilmiştir (Şekil 3.3). Oluşan mikrokapsüllerin sağlam ve sert bir yapı kazanması için oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 300 rpm de 20 dk karıştırma işlemine devam edilmiştir.



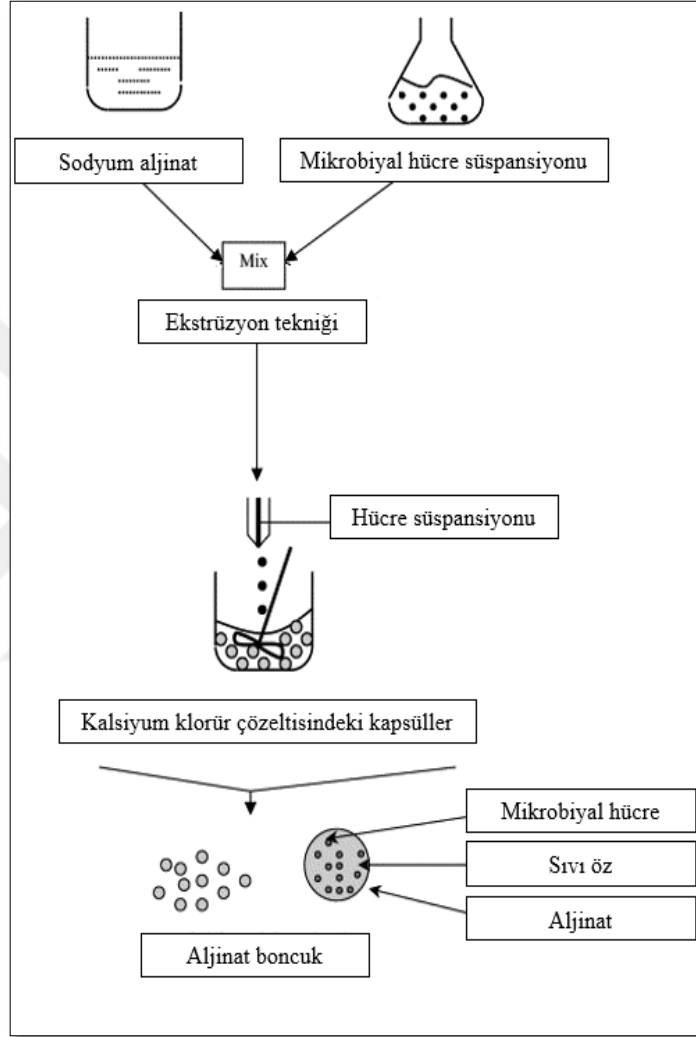
Şekil 3.3. Steril şırınga ile mikrokapsül eldesi.

Karıştırma işlemi sonunda oluşan mikrokapsüller steril çelik süzgeç ile süzülüp steril distile su ile yıkandıktan sonra steril Whatman 4 kağıdından süzölmüştür (Şekil 3.4). Süzülen mikrokapsüller steril falkon tüplerine alınmıştır. Bu yöntemle 1 mL kültür için yaklaşık 46-50 adet mikrokapsül elde edilmiştir.



Şekil 3.4. Aljinat, inülin ve kitosan kaplı mikrokapsüller.

Kitosan ile ikinci tabaka kaplanacak olan aljinat mikrokapsülleri 7 mL %0.4 (m/v) kitosan çözeltisine ilave edilerek steril bir beherde manyetik karıştırıcıda 100 rpm’de 10 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi sonunda oluşan mikrokapsüller steril çelik süzgeç ile süzülüp steril distile su ile yıkandıktan sonra steril Whatman 4 kağıdından süzümüştür (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Ekstrüzyon yöntemi (Krasaekoopt vd., 2004).

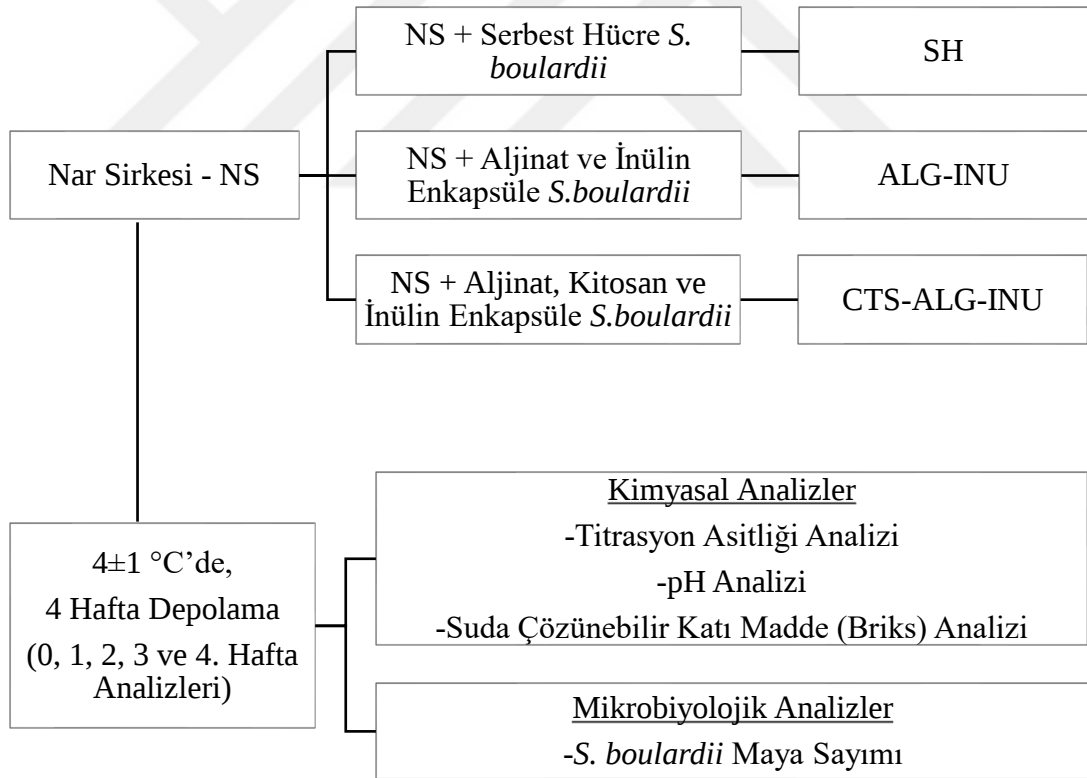
3.2.5 *S. boulardii* mayasının nar sirkesine ilavesi

Sirkenin Pastörizasyonu: Sirkelerde olabilecek kontamine bakteri ve maya varlığına karşı sirkeler 70°C’de 15 dakika pastörize edilmiştir. Pastörizasyon sonrası nar sirkelerinin maya sayısı YGC Agar (Merck, Almanya) besiyerinde 25 °C’de 48 saat inkübe edilerek belirlenmiştir.

S. boulardii mayası serbest hücre (SH), tek kaplama (ALG-INU) ve çift kaplama (CTS-ALG-INU) mikroenkapsüle formunda nar sirketine yaklaşık 8 log kob/mL oranında inoküle edilerek sirkeler 4 hafta süreyle 4 ± 1 °C’de depolanmıştır. Depolamanın 0, 1, 2, 3 ve 4. haftalarında, sirkelerde maya sayısı yayma kültürel ekim yöntemi ile YGC Agar (Merck, Almanya) besiyerinde 25 °C’de 48 saat inkübe edilerek belirlenmiştir. Tez deneme planı Çizelge 3.1’de verilmiştir. *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi üretim akış şeması Şekil 3.6’da verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez deneme planı.

SH	Serbest hücre formunda <i>S. boulardii</i> ilave edilmiş Nar Sirkesi
ALG-INU	Aljinat ve İnülin ile mikroenkapsüle edilmiş <i>S. boulardii</i> ilave edilmiş Nar Sirkesi
CTS-ALG-INU	Aljinat, Kitosan ve İnülin ile mikroenkapsüle edilmiş <i>S. boulardii</i> ilave edilmiş Nar Sirkesi



Şekil 3.6. *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi üretim akış şeması.

Nar sirkesi örneği kaçınıcı gün analiz edileceği kodlanarak aynı günde hazırlanmış ve 4 ± 1 °C’de analiz gününe kadar depolanmıştır. Şekil 3.7’de tek seferde hazırlanan *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi örnekleri görölmektedir.



Şekil 3.7. *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi örnekleri.

3.2.6 *S. boulardii* mayasının mikrokapsüllerden salınımı

Mikrokapsüllerdeki probiyotik canlılığın belirlenebilmesi için *S. boulardii* mayasının mikrokapsüllerden salınımının gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu durumda mikrokapsüllerin parçalaması için *S. boulardii* mayasının mikrokapsüllerinin dış çeperindeki Ca moleküllerine çapraz bağ oluşturacak olan pH 7.2 PBS (Phosphate Buffer Saline) (Merck, Almanya) çözeltisi kullanılmıştır. Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi hem mikrokapsülleri parçaladığı hem de mikroorganizma canlılığını olumsuz yönde etkilemediği için tercih edilmiştir. *S. boulardii* mayasının mikrokapsüllerden salınımında ilk dilüsyon 10:90 steril PBS pH 7.2 çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. (Chandramouli vd., 2004). Mikrokapsüllerin salınımı için karışım, manyetik karıştırıcıda 300 rpm’de 12 saat tutulduktan sonra FTS (%0.85 NaCl) kullanılarak örneklerin seri dilüsyonları yapılmıştır. Ardından *S. boulardii* maya sayısı, YGC Agar (Merck) besiyerine ilgili dilüsyonlardan yayma kültürel sayım yöntemi ile ekim yapılarak belirlenmiştir. Kapsüllerdeki canlı probiyotik mikroorganizma sayısı, koloni oluşturan birim (kob) cinsinden tespit edilmiştir (Nualkaekul vd., 2012).

3.2.7 Mikroenkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Enkapsülasyon etkinliği mikroorganizmaların ne kadarının başarılı şekilde enkapsüle edildiğini ifade eden oransal bir göstergedir. Enkapsülasyon işleminin maya canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla, enkapsülasyon öncesi ve sonrası YEPD Agar (Merck) besiyerinde canlı maya sayımı yapılmış ve Denklem 3.1 kullanılarak enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır (Chandramouli vd., 2004; Chen vd., 2012).

$$EE = \left(\frac{\log N}{\log N_0} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

EE: Enkapsülasyon etkinliği

N_0 : Başlangıçta ilave edilen mikroorganizma sayısı

N: Enkapsülasyon işlemi sonrası kapsüllerin parçalanması sonucu açığa çıkan mikroorganizma sayısı

3.3 Nar Sirkesine Uygulanan Kimyasal Analizler

3.3.1 pH tayini

Homojen duruma getirilen nar sirkesinde pH analizi, sıcaklık problu kombine elektrot Inolab 720 marka (WTW, Almanya) pH metre kullanılarak yapılmıştır.

3.3.2 Titrasyon asitliği değeri tayini

Homojen duruma getirilen nar sirkesinden 10 mL alınarak üzerine 20 mL distile su eklenmiş ve %1'lik fenolftalein indikatöründen 0.5 mL ilave edilerek 0.1 N NaOH ile 30 saniye kalıcı açık pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir (AOAC, 2000). Titrasyon asitliği Denklem 3.2 kullanılarak asetik asit cinsinden mL/100mL olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Titration Asitliği \%} = [V \times F \times E \times 100] / M \quad (3.2)$$

V: Harcanan 0.1 N NaOH miktarı (mL)

F: NaOH Faktörü (Kesin Normalite 0.1 N ise bu değer 1 olarak alınır)

E: 1 mL 0.1 N NaOH'e eşdeğer asit miktarı (g) (0.006005 asetik asit cinsinden)

M: Titre edilen örneğin gerçek miktarı (mL)

3.3.3 Suda çözünür kuru madde miktarı tayini

Suda çözünür kuru madde analizi, örneğin refraktometre ile kırılma indisi (refraktif indeks) okunarak yapılmıştır. Homojen duruma getirilen nar sirkesinin sıcaklığı (Isolab, dijital termometre) ve refraktometre derecesi (Atago, Japonya) belirlendikten sonra sıcaklık ve asit düzeltmeleri yapılmıştır (Cemeroğlu, 2013).

3.3.4 Organik asit tayini

Organik asitlerin analizi (asetik asit, sitrik asit, formik asit) yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, HPLC (Shimadzu, LC-20AD, Scientific Instruments, Inc., Tokyo, Japonya) kullanılarak Tormo ve Izco (2004) metoduna göre Selçuk İltekin-İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinden hizmet alımı şeklinde belirlenmiştir. Organik asitlerin analizinde Inertsil ODS-3V-5 µm, 4.6 x 250 mm kolon (GL Sciences Inc.) ve UV/VIS detektörlü (SPD-20A) HPLC sisteminin birlikte kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Okumalar 210 nm dalga boyunda yapılmıştır. Analiz sırasında kolon fırını sıcaklığı 25 °C olarak ayarlanmıştır. Sistemde mobil faz olarak 1 mL/dk akış hızında 0.45 µm membran filtreden geçirilmiş 0.1 N H₂SO₄ (pH 2.08) kullanılmıştır.

Numune Hazırlığı; Nar sirkesi numunesinden bir miktar alınarak 0.45 µm PTFE filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçirilen numuneden 200 µL alınarak üzerine 800 µL distile su ilave edilmiştir. Sonuçlar seyreltime faktörüyle çarpılarak hesaplanmıştır. HPLC cihaz bilgileri ve metot Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. HPLC cihaz bilgileri ve metot.

CİHAZ BİLGİLERİ	Cihaz Adı	HPLC-Shimadzu; LC-20AD
	Çalışma Modu	Isocratic Flow
	Akış Hızı	1.0 mL/dk
	Kullanılan Dedektör	UV/VIS Detector (SPD-20A)
	Kolon	Inertsil ODS-3V Column (5µm, 4.6 x 250mm) GL Sciences Inc.
	Fırın Sıcaklığı	25 °C
	Auto Sampler Sıcaklığı	15 °C
	Dedektör UV	210 nm
	Dedektör Sıcaklığı	35 °C
	Hareketli Faz	0.1 N H ₂ SO ₄ (pH=2.08)
	İnjesiyon Miktarı	10 µl
	Toplam Süre	20 dakika
	Standartlar	Organik Asitler
	1. Formik Asit	Dr. Ehrenstorfer / %99.4
	2. Asetik Asit	Sigma Aldrich / 99.7%
	3. Sitrik Asit	Sigma Aldrich / 99.5%

3.4 *S. bouldarii* İlaveli Nar Sirkelerine Uygulanan Kimyasal Analizler

3.4.1 pH tayini

Homojen duruma getirilen nar sirkesinde pH analizi, sıcaklık problu kombine elektrot Inolab 720 marka (WTW, Almanya) pH metre kullanılarak yapılmıştır.

3.4.2 Titrasyon asitliği değeri tayini

Homojen duruma getirilen nar sirkesinden 10 mL alınarak üzerine 20 mL distile su eklenmiş ve %1'lik fenolftalein indikatöründen 0.5 mL ilave edilerek 0.1 N NaOH ile 30 saniye kalıcı açık pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir (AOAC, 2000). Titrasyon asitliği Denklem 3.3 kullanılarak asetik asit cinsinden mL/100mL olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Titrasyon Asitliği \%} = [V \times F \times E \times 100] / M \quad (3.3)$$

V: Harcanan 0.1 N NaOH miktarı (mL)

F: NaOH Faktörü (Kesin Normalite 0.1 N ise bu değer 1 olarak alınır)

E: 1 mL 0.1 N NaOH'e eşdeğer asit miktarı (g) (0.006005 asetik asit cinsinden)

M: Titre edilen örneğin gerçek miktarı (mL)

3.4.3 Suda çözünür kuru madde miktarı tayini

Homojen duruma getirilen nar sirkesinin sıcaklığı (Isolab, dijital termometre) ve refraktometre derecesi (Atago, Japonya) belirlendikten sonra sıcaklık ve asit düzeltmeleri yapılmıştır (Cemeroğlu, 2013).

3.5 *S. bouldarii* Maya Sayısı

S. bouldarii ilaveli nar sirkesinde maya sayımı için homojen duruma getirilen nar sirkesi örnekleri 10:90 steril FTS (%0.85 NaCl) içinde karıştırılmış ve seri dilüsyonları yapılmıştır. İlgili dilüsyonlardan YGC Agar (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar) (Merck, Almanya) besiyerine yayma kültürel sayım yöntemiyle ekim yapılmış ve Petriler 25°C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Harrigan, 1998). İnkübasyon sonrası koloniler sayılmış ve Denklem 3.3 ile maya sayısı hesaplanmıştır (Halkman, 2019). Mikroenkapsüle *S. bouldarii* ilaveli sirke örneklerinden ise 10:90 steril pH 7.2 PBS (Merck, Almanya) içinde homojenize edilmiş ve FTS (%0.85 NaCl) kullanılarak örneklerin seri dilüsyonları yapılmıştır. İlgili dilüsyonlardan YGC Agar (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar) (Merck, Almanya) besiyerine yayma kültürel sayım yöntemiyle ekim yapılmış ve Petriler 25°C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Harrigan, 1998). İnkübasyon sonrası koloniler sayılmış ve Denklem 3.4 ile maya sayısı hesaplanmıştır (Halkman, 2019).

$$N = c / [V \times (n_1 + 0.1 \times n_2) \times d] \quad (3.4)$$

N: Örneğin 1 gram ya da 1 mL'sindeki mikroorganizma sayısı

V: Sayımı yapılan Petri kutularına aktarılan hacim (mL)

c: Sayımı yapılan tüm Petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

n₁: İlk seyreltide yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

n₂: İkinci seyreltide yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

d: Sayım yapılan ardışık 2 seyreltiden en konsantre olanın seyreltme oranı

3.6 İstatiksel Analizler

Araştırma iki tekerrürlü yapılmış olup tüm analizler her tekerrür için iki paralel olarak gerçekleştirilmiştir. İstatiksel analizler SPSS 26 (IBM SPSS, IBM Corporation, USA) paket programı ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar arasındaki farkların karşılaştırmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Ana varyasyon kaynakları ortalamaları arasında $p < 0.05$ düzeyinde farklılık önemli çıkan gruplar arasındaki farkları karşılaştırmak için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (Düzgüneş vd., 1987).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Nar Sirkesinin Kimyasal Analiz Sonuçları

S. boulardii CNCM I-745 (Biocodex, Fransa) probiyotik mayası eklenecek olan ve 70°C’de 15 dakika pastörize edilen nar sirkesinin bazı kimyasal özelliklerine dair sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Nar sirkesinin kimyasal analiz sonuçları.

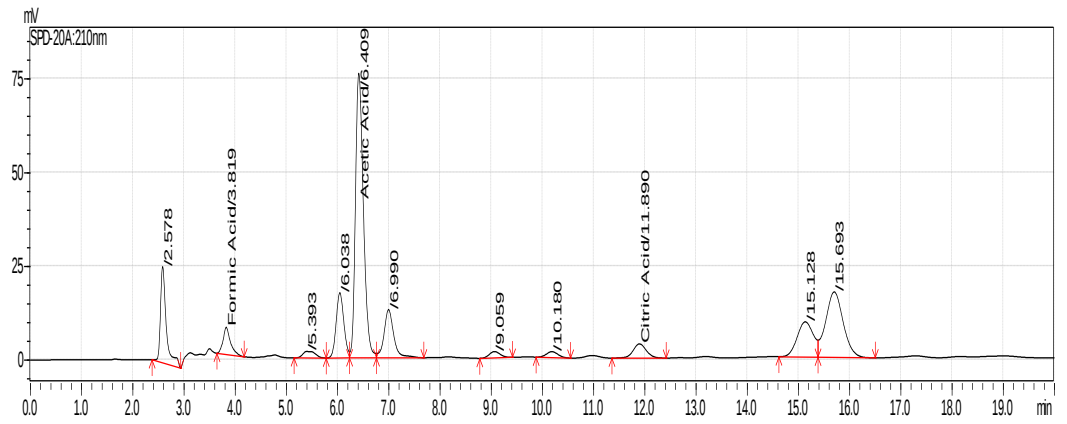
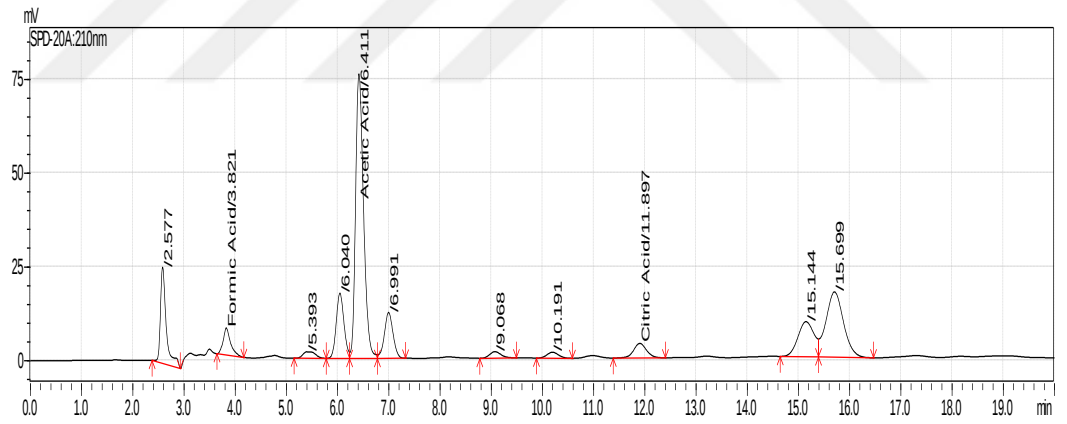
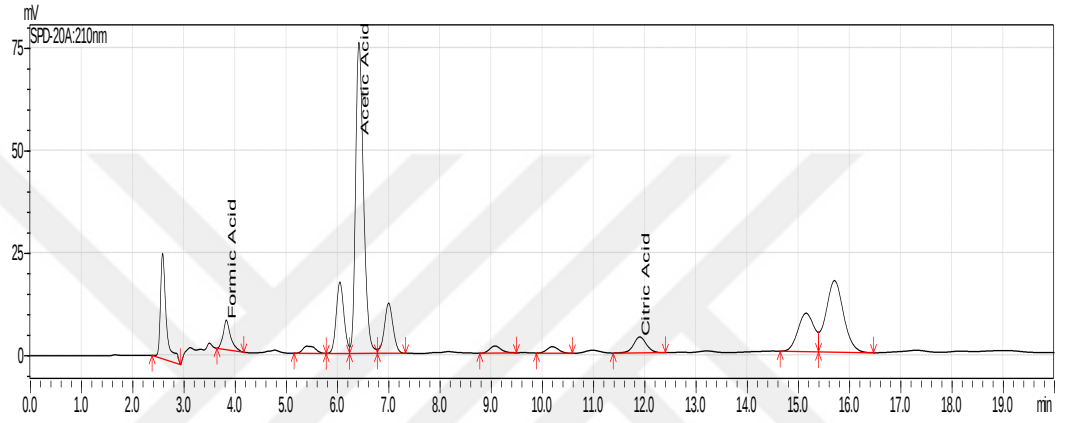
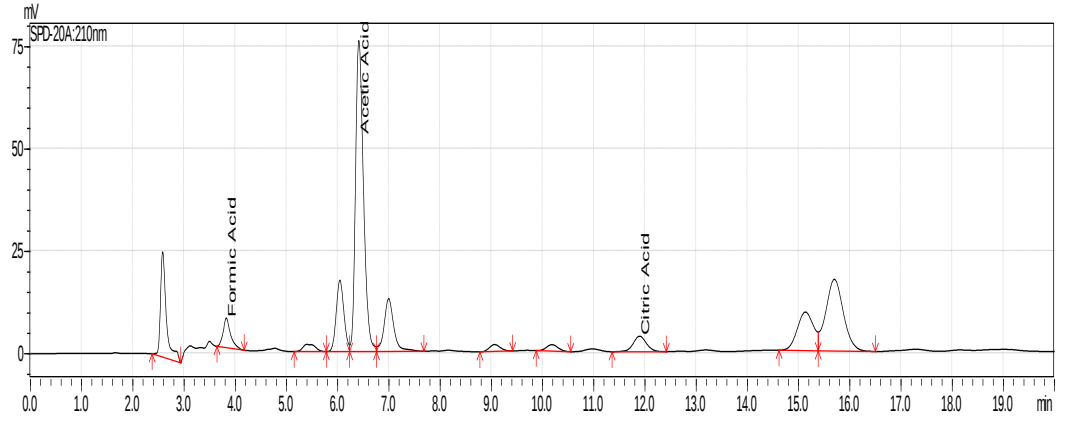
Analizler	Sonuçlar
pH değeri	3.60±0.00
Titrasyon asitliği (% asetik asit) (m/v)	1.08±0.02
Organik asit (formik asit) (ppm)	536.95±0.14
Organik asit (asetik asit) (ppm)	8686.33±0.29
Organik asit (sitrik asit) (ppm)	403.87±0.11
Suda çözünür kuru madde (Briks)	1.50±0.00

Tez çalışmasında kullanılan nar sirkesinin pH değeri 3.6±0.00 ve titrasyon asitliği değeri 1.08±0.02 g/100 mL asetik asit olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, farklı şehirlerden toplanan geleneksel üretim meyve sirkelerinin fizikokimyasal ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlendiği bir çalışmada Niğde iline ait olan geleneksel üretim nar sirkesinin pH değeri 3.69±0.09 ve titrasyon asitliği değeri ise 1.04±0.03 g/100 mL asetik asit olarak tespit edilmiştir (Öztürk vd., 2015).

Tez deneme planının oluşturulmasında ön deneme aşamasında, ev tipi nar sirkesi ve Tarım Kredi Kooperatifi (TKK) tarafından üretilen endüstriyel nar sirkesi (3.15 Briks) materyal olarak kullanılmıştır. TKK nar sirkesinin pH değeri 2.97 ve titrasyon asitliği değeri 4.01 g/100 mL asetik asit olarak belirlenmiştir. Ön deneme aşamasında TKK nar sirkesine ~8 log kob/mL düzeyinde eklenen *S. boulardii* mayasının SH; ALG-INU ve CTS-ALG-INU formlarının 4±1°C’de 24 saat depolanması sonunda inhibe olduğu belirlenmiştir. Ön deneme iki tekerrür olarak gerçekleştirilmiş olup sonuçlar aynı çıkmıştır. Ön denemenin ikinci aşamasında koruyucu madde olma olasılığına karşı TKK nar sirkesinin asitliği 0.1 N NaOH ile 3.6 pH değerine getirilerek sadece SH denemesi yapılmıştır. Deneme sonucunda 4±1°C’de 24 saat depolama sonrası mayanın canlı kaldığı görüldüğü için 2.97 pH olan TKK nar sirkesinde *S. boulardii* gelişememe nedeninin sirkenin pH değeri olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle çalışmaya ev tipi nar sirkesi ile devam edilmiştir.

TSE1880 EN 13188 (2024) sirke standardına göre ülkemizde üretilen sirkelerde toplam asit miktarı 4 g/100 mL'den (suda serbest asetik asit cinsinden) az olmaması gerektiği bildirilmektedir. Bu standartta göre çalışmada kullanılan ev tipi nar sirkesi örneğinin titrasyon asitliği değerinin, TS 1880 EN 13188 standart değerine uygun olmadığı görülmektedir. Literatüre bakıldığında da benzer olarak Öztürk vd. (2015), Satıcı vd. (2021), Chang vd. (2005), Ousaaïd vd. (2021) yaptığı çalışmalarda kullanılan meyve sirkesi örneklerinin %90 oranında titrasyon asitliği değerlerinin TS 1880 EN 13188 standart değerine uygun olmadığına rastlanılmıştır.

Çalışmada kullanılan nar sirkesinin organik asit değerleri; formik asit için 536.95 ± 0.14 ppm, asetik asit için 8686.33 ± 0.29 ppm, sitrik asit için 403.87 ± 0.11 ppm olarak bulunmuştur. Şekil 4.1'de nar sirkesine ait kromatogram verileri bulunmaktadır. Nar sirkesinin organik asit analiz sonuçlarına göre; %0.87 (m/v) asetik asit, %0.05 (m/v) formik asit ve %0.04 (m/v) sitrik asit olup hâkim asit asetik asittir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak zivzik narından üretilmiş nar sirkesinde asetik asit değeri 9553.8308 ± 29.25 ppm olarak belirlenmiş ve asetik asidin hâkim asit olduğu saptanmıştır (Aybek, 2019).



Şekil 4.1. Nar sirkesi organik asit kromatogramı.

TSE 1880 EN 13188 (2024) sirke standardına göre ülkemizde üretilen sirkelerin suda çözünür kuru madde miktarı ile ilgili herhangi bir sınır belirtilmemiştir. Tez çalışmasında *S. boulardii* mayası eklenecek olan nar sirkesinin suda çözünür kuru madde miktarı 1.50 Briks olarak belirlenmiştir.

4.2 Mikroenkapsülasyon Etkinliği Sonuçları

Mikrokapsüllerden salınan canlı probiyotik hücre sayısının, enkapsülasyonda kullanılmak üzere hazırlanan probiyotik çözeltilisinde bulunan canlı mikroorganizma sayısına oranı enkapsülasyon etkinliğini belirtmektedir.

Bu tez çalışmasında, ekstrüzyon yönteminin kullanıldığı, aljinat ve kitosan polimerleriyle gerçekleştirilen enkapsülasyonlar sonucunda, %80 enkapsülasyon veriminin sağlandığı Çizelge 4.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.2. Mikrokapsüllerin enkapsülasyon etkinliği sonuçları.

Örnekler	N (log kob/mL)	N ₀ (log kob/mL)	% EE
ALG-INU	8.37±0.05	10.37±0.04	80.66±0.22
CTS-ALG-INU	8.38±0.08	10.37±0.04	80.81±1.08

ALG-INU: Aljinat inülin kaplı mikrokapsüle *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

CTS-ALG-INU: Aljinat inülin ve kitosan kaplı mikrokapsüle *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

N: Mikrokapsüllerden salınan canlı mikroorganizma sayısı

N₀: Başlangıçta ilave edilen mikroorganizma sayısı

%EE: Enkapsülasyon etkinliği yüzdesi

Bu tez çalışmasında, literatürdeki ekstrüzyon yönteminin kullanıldığı enkapsülasyon işlemlerinde sağlanan %80’in üzerindeki enkapsülasyon verimiyle uyumlu sonuçlar alınmıştır (Nuallkaekul vd., 2012; Nazzaro vd., 2008). Elde edilen enkapsülasyon etkinliği sonuçları enkapsülasyon işleminin başarıyla gerçekleştirildiğinin bir göstergesidir.

4.3 *S. boulardii* İlaveli Nar Sirkesinin Kimyasal Analiz Sonuçları

S. boulardii probiyotik mayası, serbest hücre formunda (SH), inülin prebiyotiği içeren tek tabaka aljinat (ALG-INU) ve çift tabaka aljinat ile kitosan (CTS-ALG-INU) polimerleriyle mikrokapsüle edilerek ~8 log kob/mL düzeyinde nar sirkesine eklenmiştir. Nar sirkesi örneklerinin 4±1 °C’de depolama süresinin 0, 1, 2, 3 ve 4. haftalarındaki bazı kimyasal değişimlerinin istatistiksel olarak analiz sonuçları bu bölümde değerlendirilmiştir. Kimyasal analizler ile nar sirkesine eklenen aljinat ve

kitosan polimerleri ve inülin prebiyotiği ile *S. boulardii* mayasının 4±1 °C’de depolama süresi boyunca nar sirkesinin kimyasal özelliklerine etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

4.3.1 pH değeri

Gıdaların değerlendirilmesinde oldukça önemli bir kalite kriteri olan pH değeri, gıdanın asitlik ve alkalilik seviyesini ortaya koyan hidrojen iyonu aktivitesini göstererek asitliğin gücünü tanımlamaktadır (Cemeroğlu, 2013).

S. boulardii mayasının farklı formlarda ilave edildiği SH, ALG-INU ve CTS-ALG-INU nar sirkesi örneklerinin 4±1 °C’de depolama süresinin 0, 1, 2, 3 ve 4. haftalarındaki pH değerleri Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.3. *S. boulardii* ilaveli nar sirkesinin pH değerleri, ($\bar{x} \pm SD$), (n=2).

Örnekler	Hafta					
	0	1	2	3	4	Ortalama
SH	3.62±0.01	3.62±0.01	3.65±0.03	3.63±0.01	3.67±0.00	3.64±0.03 ^a
ALG-INU	3.57±0.00	3.61±0.00	3.63±0.02	3.61±0.01	3.62±0.01	3.61±0.02 ^b
CTS-ALG-INU	3.54±0.01	3.56±0.00	3.59±0.02	3.57±0.01	3.60±0.00	3.57±0.02 ^c
Genel Ortalama	3.58±0.03 ^A	3.60±0.03 ^{AB}	3.62±0.04 ^{CD}	3.60±0.03 ^{BC}	3.63±0.03 ^D	

SH: Serbest *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

ALG-INU: Aljinat, inülin kaplı mikroenkapsüle *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

CTS-ALG-INU: Aljinat, inülin ve kitosan kaplı mikroenkapsüle *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

$\bar{x}$: İki tekerrür ortalaması, SD: Standart sapma, n: Tekerrür sayısı

Aynı sütundaki farklı küçük harfler örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir (p<0.001).

Aynı satırdaki farklı büyük harfler depolama günleri arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir (p<0.001).

Çalışmada SH, ALG-INU ve CTS-ALG-INU nar sirkesi örneklerinin dört hafta depolama süresi sonunda pH değerleri ortalamaları sırasıyla 3.64; 3.61 ve 3.57 pH olarak tespit edilmiştir. Bütün nar sirkesi örneklerinin en düşük pH değeri 0. gün ölçümlerinde belirlenmiş olup dört haftalık depolama süresi boyunca üçüncü hafta hariç pH değerlerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda örneklerin pH değerleri arasındaki fark önemli bulunmuş (p<0.001) olsa da bütün nar sirkesi örneklerinin pH değeri yaklaşık 3.6 pH’dır. Bu sonuçlarla uyumlu olarak nar suyuna (pH 3.21) aljinat (ALG), tek tabaka kitosanla kaplı aljinat (CTS-

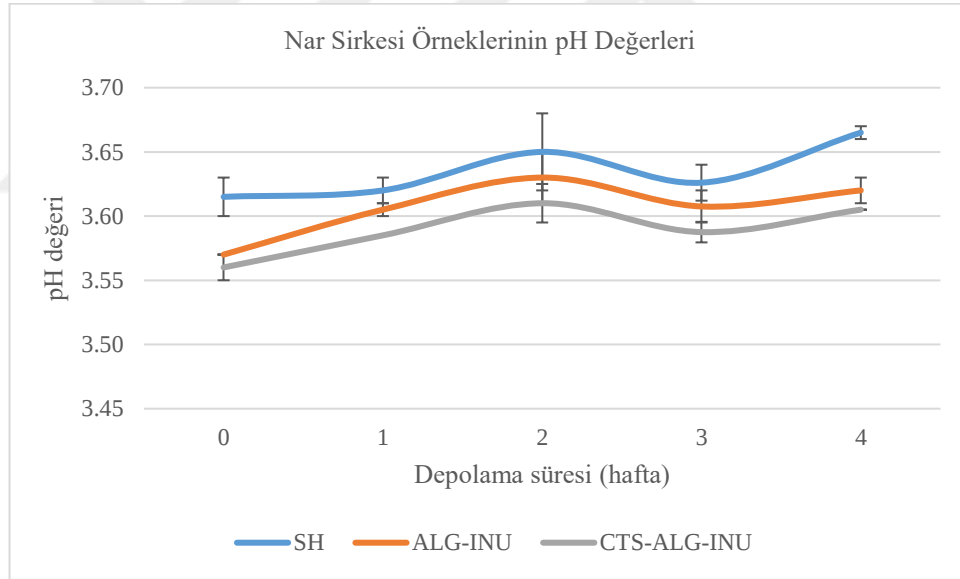
ALG) ve çift tabaka kitosanla kaplı aljinat (CTS+CTS-ALG) mikroenkapsüle *Lactobacillus plantarum* suşunun ilave edildiği ve 4 °C'de 6 hafta depolandığı çalışma sonucunda 0. hafta için pH değerleri ALG, CTS-ALG ve CTS+CTS-ALG örneklerinde sırasıyla 3.21 pH, 3.46 pH ve 3.62 pH olarak tespit edilmiş olup aynı değerler depolamanın 6. haftasının sonunda 3.20 pH, 3.45 pH ve 3.63 pH olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan kitosan polimerinin nar suyunda bulunan organik asitlerde (sitrik asit, malik asit ve süksinik asit vb.) çözünbildiği ve bu nedenle örneklerin pH değerlerinin değiştiği bildirilmiştir. Depolama süresi boyunca örneklerin pH değerlerinde önemli bir değişim olmadığı belirtilmiştir (Nualkaekul vd., 2012).

Meyve sirkeleri, birçok faydalı özelliğinin yanında biyoaktif bileşikler açısından da zengin olup son yıllarda popüleritesi artan bir gıda olmuştur. Farklı ülkelerden (ABD, Romanya, Malezya, İtalya, Tunus, Fas, Cezayir) elde edilen 18 meyve sirkesinin (elma, nar, hurma, üzüm, narenciye, sebze, sarımsak, yaban mersini) incelendiği bir çalışmada sirke örneklerinin pH değerlerinin 2.40 ile 3.83 pH arasında değiştiği belirlenmiştir (Ousaaïd vd., 2021). Türkiye'nin farklı illerinden toplanan ev yapımı sirke (elma, üzüm, enginar, nar, alıç, limon) örneklerinin antimikrobiyal ve fizikokimyasal özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, tüm sirkelerin fizikokimyasal özelliklerinin son derece değişken olduğu saptanmıştır. Niğde iline ait olan nar sirkesinin 3.69 pH ile Tokat iline ait olan üzüm sirkesine 3.90 pH yakın bir pH derecesinde olduğu saptanmıştır (Öztürk vd., 2015). Geleneksel yöntemlerle üretilmiş Trabzon hurması, çam kozalağı ve alıç sirke örneklerinin pH değerleri 3.60 - 3.91 pH arasında değişiklik göstermiştir (Satıcı, 2021). Konsantre meyve sirkelerinin kalite kriterlerinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda, Tayvan yerel pazarlarından toplanan 66 meyve sirkesinin (Mei-Japon kayısı, ananas, yaban mersini, greyfurt, tutku meyvesi, yıldız meyvesi, elma şarabı, dut, portakal, limon) pH değerlerinin 2.59 ile 3.79 pH arasında değiştiği belirtilmiştir (Chang vd., 2005). Nar sirkesine *S. boulardii* ilave edildiğinde örneklerin pH değerleri 3.54-3.67 pH arasında değişmiş olup diğer meyve sirkelerinin pH değerlerine yakın sonuçlar vermiştir.

Nar sirkesinin başlangıç pH değeri 3.6 pH iken mikroenkapsüle edilmiş maya içeren örneklerin başlangıç pH değerlerinin ALG-INU için 3.57 pH ve CTS-ALG-INU için de 3.54 pH olarak belirlenmiştir. Polimer içeren nar sirkesi örneklerinin pH

değerlerinde ihmal edilebilecek kadar küçük bir düşüş gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara benzer olarak portakal suyu (3.66 pH) ve elma+şeftali (3.66 pH) suyuna serbest hücre formu, sodyum aljinat ve selüloz asetat fitalat ile mikroenkapsüle edilmiş *Lb. rhamnosus* GG ve *E. coli* Nissle ilave edildiği bir çalışma sonucunda mikroenkapsüle edilmiş hücre ilave edilen portakal suyu (3.65 pH), elma+şeftali suyu (3.38 pH) örneklerinin başlangıç pH değerlerinde az da olsa bir düşüş olduğu belirlenmiştir (Çakır, 2021).

Depolama süresi boyunca nar sirkesi örneklerinin pH değerinde küçük artışlar gerçekleşerek pH değerleri 3.5-3.6 pH arasında değişim göstermiştir. SH; ALG-INU ve CTS-ALG-INU nar sirkesi örneklerinin 4 hafta depolama süresi boyunca genel ortalama pH değerleri arasındaki farkın önemli ($p<0.001$) olduğu bulunmuştur. Nar sirkesi örneklerinin 4 ± 1 °C’de dört hafta depolama süresi boyunca pH değerlerindeki değişim Şekil 4.2’de görülmektedir.



Şekil 4.2. Nar sirkesi örneklerinin pH değerlerinin depolama süresince değişimi. Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=2).

Depolama süresi boyunca sirke örneklerinin pH değerinin 2. haftaya kadar arttığı; 3. haftada azalış gösterip 4. haftada tekrar artış gösterdiği belirlenmiştir.

SH örneğinin pH değeri başlangıçta 3.62 pH iken dört haftalık depolama süresi sonunda 3.67 pH olduğu tespit edilmiştir. Santana vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, *S.boulardii* mayası ve farklı tatlandırıcılar kaju suyuna ilave edilmiş ve kaju suyunun 7 °C’de 28 gün boyunca pH, titrasyon asitliği ve probiyotik özellikleri

belirlenmiştir. Kontrol ve *S. boulardii* mayalı örneklerin pH değeri, depolamanın ilk günü sırasıyla 3.24 pH ve 3.26 pH iken 28. gün sonunda 3.68 pH ve 3.59 pH olarak tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasındaki nar sirkesinin pH sonuçlarıyla uyumlu olarak *S. boulardii* maya ilave edilen kaju suyunda da depolama boyunca pH değeri artış göstermiştir.

ALG-INU örneğinin pH değerlerindeki artışın sodyum aljinatın Ca^{+2} iki değerlikli kationlarla çapraz bağlanması yoluyla sirkeye geçmesiyle ilişkili olabileceği ve sodyum aljinat çözeltisinin pH değerinin 5-11 arasında değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Pawar ve Edgar, 2012). Bu sonuçlar ile uyumlu olarak portakal, elma+şeftali suyuna sodyum aljinat ve selüloz asetat fitalat ile mikroenkapsüle edilmiş *Lb. rhamnosus* GG ve *E. coli* Nissle mikroorganizmalarının ilave edildiği bir çalışma sonucunda serbest hücre ve mikroenkapsüle edilmiş hücre içeren meyve sularının pH değerinin 35 gün depolama süresi boyunca arttığı belirlenmiştir (Çakır, 2021).

CTS-ALG-INU örneğinin pH değerindeki artış ise kitosan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Kitosanın sadece asidik çözeltilerde (asetik asit, formik asit, laktik asit) çözünmesinin sebebi, pH 6.3'te primer amin grupları taşıması ve alkali yapıda olmasıdır (Wang vd, 2020). Kitosanın çözünmesinde kullanılan en yaygın çözücü, pH 4-5 değerinde olan %1-2'lik asetik asittir. Nar sirkesi de asetik asit (%0.87) bakımından zengin bir gıdadır. Kitosan zayıf bir baz olup asetik asit gibi zayıf asitlerle etkileşime girerek çeşitli reaksiyonlara neden olabilmektedir (Thirugnanasambandan ve Gopinath, 2023). Kitosanın nar sirkesindeki asetik asit ile etkileşimi sonucu kitosan polimeri ile kaplı mikrokapsüllerin çözünürlüğü artırabilmekte ve buna bağlı olarak pH değeri artmaktadır.

Kitosan ve asetik asit arasındaki etkileşim çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar arasında kitosanın molekül ağırlığı, asetik asit konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve reaksiyon koşulları bulunmaktadır. Bu etkileşimin bazı ana yönleri: Kitosanın asetik asit ile etkileşimiyle amino grupları ($-NH_2$) asetik asit tarafından protonlanmaktadır. Protonasyon derecesi ne kadar yüksekse çözünürlük o kadar artmaktadır (Wang vd, 2020). Kitosan polimerinin kullanıldığı çalışma sonuçları arasındaki farkların temel sebeplerinden biri de kullanılan kitosanın asetilasyon derecesinin farklı olmasıdır. Asetik asit, kitosanın kimyasal modifikasyonunda kullanılmaktadır. Asetilasyon işlemi, kitosanın hidroksil gruplarının asetilasyonu ile gerçekleşir ve bu durum

kitosanın çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilmektedir (Thirugnanasambandan ve Gopinath, 2023).

S. boulardii ile fermante edilmiş karpuz, kırmızı pancar ve siyah havuç suyunun pH, titrasyon asitliği ve *S. boulardii* canlılığının araştırıldığı bir çalışmada, pH değerleri ilk gün sırasıyla 4.27 pH, 4.80 pH ve 5.6 pH iken 20°C’de depolamanın 16. günü sonunda 3.35 pH, 3.20 pH ve 3.41 pH olarak bulunmuştur. Depolama süresi boyunca *S. boulardii* mayasının meyve sularını fermante etmesi nedeniyle pH değerleri düşüş göstermiştir (Değirmencioğlu vd., 2016). Tez çalışmasında *S. boulardii* mayası nar sirkesini fermante etmediği için pH değerlerinde azalma gerçekleşmemiştir.

Havuç suyuna (pH 5.79) aljinat-inülin-ksantan sakızı ile mikroenkapsüle *Lactobacillus acidophilus* probiyotik suşunun eklendiği ve probiyotik havuç suyunun 4°C’de 8 hafta depolandığı bir çalışmada, başlangıç pH değerleri serbest hücre ve mikroenkapsüle *L. acidophilus* ilaveli havuç suyu için sırasıyla 5.79 pH ve 5.68 pH iken depolamanın 8. haftası sonunda 3.37 pH ve 3.74 pH olarak belirlenmiştir (Nazzaro vd., 2008). Bu tez çalışmasındaki probiyotik nar sirkesinin pH değerindeki artıştan farklı olarak probiyotik havuç suyunun pH değerinde azalma olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni olarak, havuç suyuna eklenen *L. acidophilus* bakterisinin sekiz haftalık depolama süresi sonunda sayısını artırarak fermantasyonla asitliği artırması olduğu belirtilmiştir. Tez çalışmasında bu sonuçlardan farklı olarak nar sirkesine eklenen *S. boulardii* mayasının dört haftalık depolama süresi içinde nar sirkesini fermante etmediği ve asitlik artışına da neden olmadığı belirlenmiştir.

4.3.2 Titrasyon asitliği değeri

Titrasyon asitliği, gıdadaki asitliğin toplam miktarıdır. Sirkede bulunan organik asitlerin ve özellikle de asetik asidin önemli bir göstergesidir. Organik asitler doğal olarak veya fermantasyon yoluyla oluşabilmektedir. Aynı zamanda bazı gıdaların tadı, aroması, rengi, parlaklığı, stabilitesi ve kalitesinin korunmasında önemli rol oynamaktadır (Cemeroğlu, 2013).

Nar sirkesi örneklerinin 4±1 °C’de depolama süresinin 0, 1, 2, 3 ve 4. haftalarındaki titrasyon asitliği ortalamaları g/100mL asetik asit olarak Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.4. *S. boulardii* ilaveli nar sirkesinin titrasyon asitliği (% asetik asit) değerleri, ($\bar{x} \pm SD$), (n=2).

Örnekler	Hafta					Ortalama
	0	1	2	3	4	
SH	1.05±0.00	1.06±0.00	1.08±0.01	1.09±0.01	1.09±0.01	1.07±0.02 ^a
ALG-INU	0.94±0.02	0.91±0.01	0.91±0.00	0.90±0.01	0.89±0.01	0.91±0.02 ^b
CTS-ALG- INU	1.07±0.00	1.09±0.01	1.08±0.01	1.08±0.02	1.09±0.01	1.08±0.01 ^a
Genel Ortalama	1.02±0.06 ^A	1.02±0.08 ^A	1.02±0.08 ^A	1.02±0.08 ^A	1.02±0.09 ^A	

SH: Serbest *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

ALG-INU: Aljinat inülin kaplı mikroenkapsüle *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

CTS-ALG-INU: Aljinat inülin ve kitosan kaplı mikroenkapsüle *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

$\bar{x}$: İki tekerrür ortalaması, SD: Standart sapma, n: Tekerrür sayısı

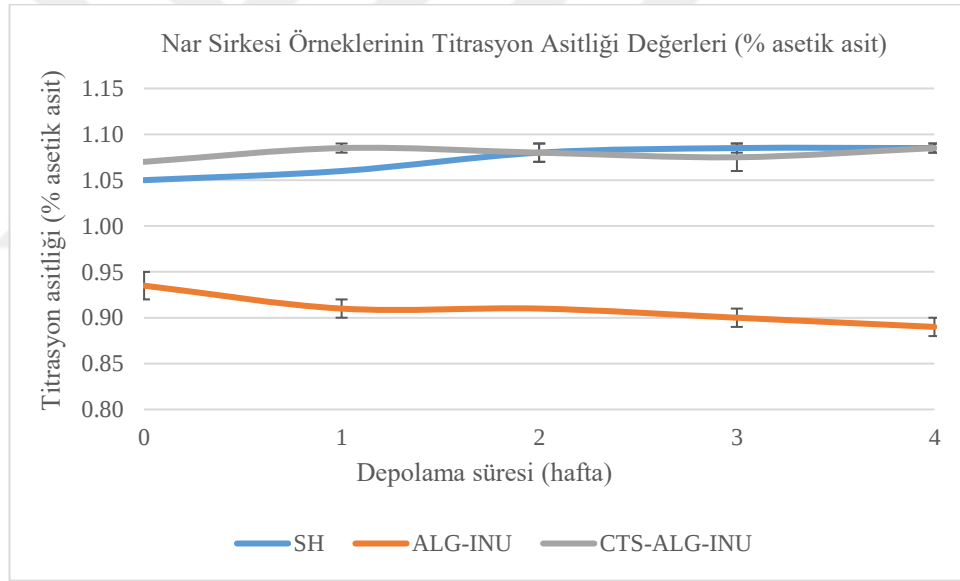
Aynı sütundaki farklı küçük harfler örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir (p<0.001).

Aynı satırdaki farklı büyük harfler depolama günleri arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir (p<0.001).

Çalışmada SH, ALG-INU ve CTS-ALG-INU nar sirkesi örneklerinin 4±1 °C’de dört hafta depolama süresi sonunda titrasyon asitliği ortalamaları sırasıyla 1.07; 0.91 ve 1.08 g/100mL asetik asit olarak tespit edilmiştir. Nar sirkesine (1.08±0.02 g/100mL asetik asit) aljinat ile mikroenkapsüle edilmiş *S. boulardii* ilave edildiğinde de sirkenin titrasyon asitliği değerinde (0.94±0.02 g/100mL asetik asit) azalma olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda titrasyon asitliği değeri bakımından ALG-INU örneği ile diğer örnekler arasındaki farkın önemli (p<0.001) olduğu bulunmuştur. ALG-INU örneğinin titrasyon asitliği değerinin diğer nar sirkesi örneklerinden farklı olarak başlangıçta ve depolama süresi boyunca azalmasının nedeni, sodyum aljinat kapsüllerini çevreleyen Ca⁺² iyonlarının zaman içerisinde sirkeye geçerek tamponlayıcı etkide bulunması ve sodyum aljinatın (5-11 pH) alkali karakterde olması ve sirkeye zaman içinde salınması olduğu düşünülmektedir (Pawar ve Edgar, 2012). Bu sonuçlara benzer olarak Çakır (2021) çalışmasında, çeşitli polimer maddeler (sodyum aljinat-selüloz asetat fitalat) ile mikroenkapsüle edilmiş probiyotik mikroorganizmaları (*Lb. rhamnosus* GG ve *E. coli* Nissle) elma+şeftali ve portakal suyuna ilave ederek 4 °C’de 35 gün depolama süresi içinde titre edilebilir asitlik miktarını belirlemiştir. Çalışma sonucunda, elma+şeftali suyunun titre edilebilir asitlik miktarının kontrol örneğinde 4.48 g/L sitrik asit iken aljinat ile mikrokapsüle *Lb. rhamnosus* GG ilaveli edildiğinde 4.42 g/L sitrik asit değerine düştüğü ve depolama süresince azalmanın devam ettiği, en düşük değerin ise depolamanın 35. gününde 3.46

g/L sitrik asit olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde aljinat ile mikrokapsüle *Lb. rhamnosus* GG ilaveli edilen portakal suyunun da titre edilebilir asitlik miktarı azalmış olup en düşük değer depolamanın 7. gününde 6.08 g/L sitrik asit olarak belirlenmiştir.

Nar sirkesi örneklerinin 4 ± 1 °C’de depolama süresi boyunca titrasyon asitliği değerlerindeki değişim Şekil 4.3’te görülmektedir. Nar sirkesi örneklerinin genel ortalama titrasyon asitliği değerlerine dört haftalık depolama süresinin etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Tez çalışmasında, SH ve CTS-ALG-INU örneklerinde dört haftalık depolama süresi boyunca titrasyon asitliği miktarında ihmal edilecek kadar küçük bir artış olduğu, ALG-INU örneğinde ise azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *S. boulardii* mayasının 4 ± 1 °C’de dört hafta depolama süresi içinde nar sirkesinde tespit edilebilir bir fermantasyona neden olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.3. Nar sirkesi örneklerinin titrasyon asitliği (% asetik asit) değerlerinin depolama süresince değişimi.

Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=2).

Bu sonuçlarla uyumlu olarak, *S. boulardii*, *L. plantarum* RS, *L. casei* LCS ve *L. fermentum* gibi probiyotik mikroorganizmalarını içeren kivi suyunun süte ilave edildiği ve 37 °C’de 12 saat fermante edildiği bir çalışmada, *S. boulardii* içeren kivi suyunun süte ilavesinin laktik ve asetik asit miktarını artırdığı; kivi suyu içermeyen *S. boulardii* ilaveli sütün ise fermantasyonun 10. saatine kadar laktik ve asetik asit miktarını artırdığı tespit edilmiştir (Mousa vd., 2018).

S. boulardii mayası ile fermente edilmiş karpuz, kırmızı pancar ve siyah havuç suyunun 20°C’de 16 gün boyunca depolandığı bir çalışmada, örneklerin titrasyon asitliği değerleri depolama süresi boyunca artış göstermiş olup 0. gün için sırasıyla %0.01 laktik asit, %0.03 laktik asit ve %0.47 laktik asit miktarında iken; depolamanın 16. günü sonunda sırasıyla %0.46 laktik asit, %0.47 laktik asit ve %0.90 laktik asit olarak belirlenmiştir (Değirmencioğlu vd., 2016). Bu çalışmadan farklı olarak tez sonuçlarında CTS-ALG-INU ve SH nar sirkesi örneklerinde depolama süresi boyunca titrasyon asitliği miktarı 0.02-0.04 g/100mL asetik asit gibi çok küçük bir artış göstermiş olup bu sonuç *S. boulardii* probiyotik mayasının nar sirkesinde herhangi bir fermentasyona neden olmadığını göstermiştir.

Kaju suyuna *S. boulardii* mayası ve farklı tatlandırıcıların ilave edildiği ve 7 °C’de 28 gün boyunca depolandığı bir çalışmada, depolama boyunca kaju suyunun titrasyon asitliği miktarı azalmış ve *S. boulardii* ilaveli kaju suyunda 0. gün 2.04 g/100 mL laktik asit iken 28. gün sonunda 1.95 g/100 mL laktik asit olarak belirlenmiştir (Santana vd., 2020). Bu çalışma sonucundan farklı olarak tez çalışmasında, *S. boulardii* serbest hücre içeren nar sirkesi örneğinin titrasyon asitliği miktarında 4±1 °C’de dört haftalık depolama süresi içinde 0.04 g/100mL asetik asit artış tespit edilmiştir.

4.3.3 Suda çözünür kuru madde miktarı

Meyve suyu ve sirkede bir kalite kriteri olan suda çözünür kuru madde, başta fruktoz, glikoz olmak üzere şekerler ve sitrik asit, malik asit, asetik asit ve tartarik asit gibi organik asitlerden oluşmakta olup Briks olarak ifade edilmektedir.

TS EN 13188 Sirke Standardında suda çözünür kuru madde ile ilgili herhangi bir referans değer belirtilmemiştir. Çalışmada SH, ALG-INU ve CTS-ALG-INU örneklerinin suda çözünür kuru madde miktarı 1.5±0.00 Briks olup 4±1 °C’de depolama süresi boyunca değişim göstermemiştir.

Geleneksel yöntemlerle üretilmiş Trabzon hurması, çam kozalağı ve alıç sirke örneklerinin suda çözünür kuru madde miktarının belirlendiği bir çalışmada, Trabzon hurması sirkesi için 1.44-2.85 Briks, çam kozalağı sirkesi 0.70-2.01 Briks ve alıç sirkesi için de 0.90-1.93 Briks tespit edilmiştir (Satıcı, 2021). Tayvan yerel pazarlarından toplanan 66 meyve sirkesinin (Mei-Japon kayısı, ananas, yaban mersini,

greyfurt, tutku meyvesi, yıldız meyvesi, elma şarabı, dut, portakal, limon) suda çözünür kuru madde miktarlarının oldukça değişken olduğu belirtilmiştir (Chang vd., 2005). Nar sirkesine *S. boulardii* ilave edilen örneklerin suda çözünür kuru madde miktarı diğer meyve sirkelerinin suda çözünür kuru madde miktarına yakın sonuçlar verdiği ve probiyotik maya ilavesinin nar sirkesinin suda çözünür kuru madde miktarında önemli bir değişim meydana getirmediği tespit edilmiştir.

4.4 *S. boulardii* Maya Sayısı

Yüksek asitli gıdalara eklenen probiyotikler depolama süresi içinde ortam koşullarından etkilenecek canlılıklarını kaybedebilmektedir. İnülin prebiyotigi içeren aljinat ve kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş *S. boulardii* mayasının nar sirkesindeki canlılığı bu bölümde incelenmiştir. SH, ALG-INU ve CTS-ALG-INU örneklerinin 4 ± 1 °C’de depolama süresinin 0, 1, 2, 3 ve 4. haftalarındaki *S. boulardii* maya sayısı log kob/mL olarak Çizelge 4.5’te verilmiştir.

Çizelge 4.5. *S. boulardii* ilaveli nar sirkesinin maya sayıları (log kob/mL), ($\bar{x} \pm SD$), (n=2).

Örnekler	Hafta					$\log N_{0.Hafta} - \log N_{4.Hafta}$
	0	1	2	3	4	
SH	8.39 ± 0.05^{Aa}	7.66 ± 0.09^{Ba}	6.69 ± 0.06^{Ca}	5.46 ± 0.07^{Da}	4.27 ± 0.05^{Ea}	4.12
ALG- INU	8.37 ± 0.05^{Ab}	8.34 ± 0.07^{Bb}	8.23 ± 0.12^{Cb}	7.35 ± 0.04^{Db}	7.24 ± 0.04^{Eb}	1.13
CTS-ALG- INU	8.38 ± 0.08^{Ac}	6.82 ± 0.08^{Bc}	6.04 ± 0.20^{Cc}	5.23 ± 0.16^{Dc}	5.02 ± 0.00^{Ec}	3.36

SH: Serbest *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

ALG-INU: Aljinat inülin kaplı mikroenkapsüle *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

CTS-ALG-INU: Aljinat inülin ve kitosan kaplı mikroenkapsüle *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi

$\bar{x}$: İki tekerrür ortalaması, SD: Standart sapma, n: Tekerrür sayısı

Aynı sütundaki farklı küçük harfler örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir ($p<0.001$).

Aynı satırdaki farklı büyük harfler depolama günleri arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir ($p<0.001$).

ALG-INU örneğinde başlangıçta 8.37 ± 0.05 düzeyinde eklenen *S. boulardii* mayasının 4 ± 1 °C’de 4 hafta depolama sonunda maya sayısının 7.24 log kob/mL olduğu belirlenmiştir. CTS-ALG-INU örneğinde *S. boulardii* sayısı, başlangıçta 8.38 log kob/mL iken depolama sonunda 5.02 log kob/mL olduğu tespit edilmiştir. SH örneğinin maya sayısı ise dört haftalık depolama süresi içinde 8.39 log kob/mL’den 4.27 log kob/mL’ye azalmıştır. SH, ALG-INU ve CTS-ALG-INU örneklerinin *S.*

boulardii sayısında dört haftalık depolama süresi sonunda sırasıyla 4.12 log, 1.13 log ve 3.36 log birimlik azalma meydana gelmiştir. *S. boulardii* ilaveli nar sirkesi örneklerinde, depolama süresi boyunca bütün formlar için canlılık düzeyinin korunduğu görülse de serbest hücre formuna kıyasla mikroenkapsüle formlarda canlılık seviyesinin daha stabil olduğu görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda nar sirkesine eklenen maya hücre formlarının maya sayısına olan etkisinin önemli ($p<0.001$) olduğu belirlenmiştir.

S. boulardii ilaveli nar sirkesi örneklerinin depolamanın dördüncü hafta maya sayısı sonuçlarına bakıldığında, ALG-INU örneği ile SH örneği arasındaki fark 3 log kob/mL'den daha fazla iken ALG-INU örneği ile CTS-ALG-INU örneği arasındaki farkın 2 log kob/mL'den fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, %3 (m/v) sodyum aljinat ile mikroenkapsülasyon işleminin nar sirkesinde *S. boulardii* probiyotik canlılığının korunmasında etkin bir yöntem olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında kullanılan simbiyotik ALG-INU mikrokapsüllerinin içindeki inülin prebiyotığının de *S. boulardii* canlılığının korunmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak *S. boulardii* probiyotik mayasının aljinat polimeri ile enkapsüle hücre formunda elma parçalarına ilave edildiği bir çalışmada başlangıç *S. boulardii* sayısı 7.84 log kob/mL iken; 4°C'de depolamanın 77. günü sonunda maya sayısı 7.78 log kob/mL olarak belirlenmiştir (Gallo vd., 2014). Benzer başka bir çalışmada ise, aljinat polimeri ile enkapsüle *S. boulardii* ile üretilen kefirin 4°C'de 28 gün depolanması sonunda *S. boulardii* sayısı 8.55 log kob/mL olarak belirlenerek probiyotik yeterlilik düzeyinin üzerinde olduğu belirtilmiştir (Kalkan, 2019). Mayaların mikroenkapsülasyonuna ilişkin az sayıda araştırma yayınlanmıştır ancak probiyotikleri çevresel streslerden koruma yetenekleri açısından çok sayıda mikrokapsülleme stratejisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda en yaygın kullanılan polimer aljinattır (Koyama ve Seki, 2004; Talebnia ve Taherzadeh, 2006).

Üzümsü meyvelerden elde edilen meyve suyuna *S. boulardii* mayasının serbest hücre ve inülin, aljinat ve ksantan gum ile enkapsüle edilerek ilave edildiği ve 4 °C'de 4 hafta boyunca depolandığı bir çalışma sonucunda, *S. boulardii* mayasının meyve suyuna enkapsüle edilerek eklenmesinin daha etkili olduğu belirtilmiştir. Depolamanın ikinci haftası sonunda serbest hücre formunda *S. boulardii* sayısında 3 log birimlik azalma meydana gelmiş ve maya sayısı 4 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Mikroenkapsüle

formda *S. boulardii* sayısı ise depolamanın dördüncü haftasının sonunda 7 log kob/mL kalarak probiyotik yeterlilik göstermiştir (Fратиanni vd., 2014). Çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olarak depolamanın dördüncü haftasının sonunda ALG-INU örneğinin *S. boulardii* sayısı 7.24 log kob/mL olarak belirlenmiştir.

Asetik asidin *S. boulardii* maya hücresi üzerindeki etkisini araştıran Fu vd. (2022) *S. boulardii*'nin %1 ve %2 asetik asit içeren YPD besiyerinde 16 saat inkübasyon sonunda inhibe olduğunu belirtmiştir. Aynı koşullarda besiyerinin %0.5 asetik asit içermesi durumunda ise *S. boulardii* maya hücresi canlılığını korumuş ve maya tomurcuklanma oranında artış meydana gelmiştir. Asetik asit stresi, *S. boulardii* maya plazma zarı bütünlüğünün kaybına ve geçirgen bir ortam oluşmasına neden olmaktadır. Asetik asit stresi altında maya hücre morfolojisinde yüzey buruşması gibi değişimler meydana gelirken asetik asit, maya hücre duvarını incelterek yağ globül birikimini yok etmekte, organelleri parçalamakta ve sitoplazmik vakuolleri artırarak hücreyi savunmasız duruma getirmektedir. Ancak mikroorganizmaların doğal ortamları olan gıdalarda farklı asit direnci davranışları sergilediği bilinmektedir. Maya hücreleri asidin fazlasını hücrelerinden atmak için büyük miktarda ATP harcarlar ve ortamda mayanın enerji ihtiyacını karşılayacak kadar besin bulunması gerekmektedir. Bu nedenle % 0.87 (v/m) asetik asit içeren nar sirkesinde serbest hücre formunda (SH) *S. boulardii* sayısı 4 ± 1 °C'de dört hafta depolama süresi boyunca azalmış ancak maya canlılığı devam etmiştir.

S. boulardii mayası ile fermante edilmiş karpuz (4.27 pH), kırmızı pancar (4.80 pH) ve siyah havuç suyunun (5.60 pH), 20°C'de 16 gün boyunca depolandığı bir çalışmada mayanın probiyotik özellikleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *S. boulardii* maya sayısında karpuz için 0.12 log, kırmızı pancar için 0.46 log ve siyah havuç suyu için de 0.33 log birimlik bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Depolamanın 16. günü sonunda *S. boulardii* maya sayısı karpuz, kırmızı pancar ve siyah havuç suyu için sırasıyla 7.78 – 8.30 – 8.65 log kob/mL olarak belirlenmiştir (Değirmencioğlu vd., 2016). Bu çalışmada olduğu gibi başlangıç pH değerinin yüksek olması zayıf asitlerin neden olduğu *S. boulardii* mayasındaki stres hasarının azalmasına yardımcı olmaktadır (Fu vd., 2022). Tez çalışmasında nar sirkesi başlangıçta 3.62 pH değerinde olmasına rağmen, SH örneği 14 günlük depolama süresi sonunda 6.69 log kob/mL maya sayısı ile probiyotik yeterlilik göstermiştir.

Benzer olarak başka bir çalışmada, kaju suyuna (3.24 pH) *S. boulardii* probiyotik mayası ilave edilerek 7 °C’de 28 gün depolanmış ve *S. boulardii* maya sayısı belirlenmiştir. Başlangıçta 8 log kob/mL düzeyinde ilave edilen *S. boulardii* sayısı 28. gün sonunda 8.24 log kob/mL olarak belirlenmiştir (Santana vd., 2020). Asit direncinin oluşumunda zayıf organik asidin çeşidi de etkili olmaktadır. Bu açıdan incelendiğinde, laktik asit asetik aside göre daha fazla iyonize olurken asetik asit moleküler formda kalmaktadır. Moleküler formda kalan asitler daha fazla hücre içinde serbest yayılarak dissosiye olurlar ve hücre içi asitlenmeyi artırır (Fu vd., 2022). Tez çalışmasında nar sirkesinin hâkim asidi asetik asit olması nedeniyle 4±1 °C’de 28 gün depolama süresi sonunda *S. boulardii* sayısı 4.27 log kob/mL’ye düşmüştür. Ancak asetik asit varlığına rağmen nar sirkesinin 14 günlük depolama süresi sonunda SH örneklerinde 6.69 log kob/mL *S. boulardii* sayısı ile probiyotik yeterliliği koruduğu görülmektedir.

Depolama süresi boyunca CTS-ALG-INU örneğinde *S. boulardii* canlılığı serbest hücre formundan daha iyi muhafaza edilirken ALG-INU örneğinin gerisinde kalmıştır. Bunun sebebinin kitosan polimerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kitosan asit direnci yüksek bir polimer olup mayaların mikroenkapsülasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Sivudu vd., 2016; Gallo vd., 2008). Ancak asetik asit bakımından zengin bir gıda olan sirkede kitosan polimeri ve kitosanla kaplanmış aljinat mikrokapsülü içinde *S. boulardii* mayası ilk defa kullanılmıştır.

Kitosanın sirke matrisinde mikrokapsüle mikroorganizmayı korumada yeterince etkili olamamasının sebebi araştırıldığında; yüksek asetik asit varlığında, kitosan moleküllerinin asit kataliziyle parçalanabildiği, asetik asidin kitosanın amino grubunu protonlayarak molekülün yapısını değiştirebildiği ve böylece koruma yeteneğini azaltabildiği görülmektedir (Wang vd, 2020). Kitosanın çözünürlüğü önemli parametrelerden biri olup polimerin molekül ağırlığına, üretimde kullanılan kitinin kaynağına, ortamda metal iyonlarının bulunup bulunmamasına, çözücü olarak kullanılan asidin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Kurita, 2006; Kumar, 2000). Kitosan zayıf bir baz olup asetik asit gibi zayıf asitlerle etkileşime girerek çeşitli reaksiyonlara neden olabilmektedir (Thirugnanasambandan ve Gopinath, 2023). Kitosanın nar sirkesindeki asetik asit ile etkileşimi sonucu kitosan polimeri ile kaplı mikrokapsüllerin çözünürlüğü artabilmektedir. Kitosan asetik asit,

formik asit, laktik asit gibi seyreltik organik asit çözeltilerinde ($\text{pH} < 6$) çözünebilmektedir. Asidik ortamlarda çözünen kitosanın amino grupları proton bağlayarak pozitif yüklü hale geçer (Kurita, 2006; Kumar, 2000). Pozitif yüklü kitosan molekülü hücrelerin yüzeyinde bulunan negatif yüklerle reaksiyona girerek hücre geçirgenliğinin değişmesine neden olabilmektedir. Polikasyonik formdaki kitosan ile mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan lipopolisakkaritler gibi anyonik bileşenler arasında elektrostatik etkileşim oluşmaktadır. Elektrostatik etkileşim sonucunda hücre yüzeyinde negatif ve pozitif yüklerin dağılımı farklılaşmakta ve böylece hücrenin membran stabilitesi bozularak geçirgenliği değişmektedir. Membran geçirgenliğinin değişmesi ile besin maddeleri hücre içerisine girememekte veya hücre içi bileşenleri hücre dışına sızmakta ve bunların sonucunda da hücre ölümü gerçekleşmektedir. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosanlar mikroorganizma hücre yüzeyi ile interaksiyona girip hücre geçirgenliğinin değişmesine neden olurken düşük moleküler ağırlıklı kitosanlar hücre duvarından geçerek hücre içine girmekte ve hayati önemli bileşiklere (DNA) adsorbe olarak mRNA ya da protein sentezinin yavaşlamasına veya durmasına ve sonuçta mikroorganizmanın inhibe olmasına neden olmaktadır. Kitosanın antifungal aktivitesinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (Yıldırım vd., 2016).

Tez çalışmasında kullanılan kitosan polimerinin orta moleküler ağırlıklı olduğu düşünüldüğünde kitosan ile kaplanmış aljinat mikrokürelerinden maya hücrelerinin nar sirkesine salınması sırasında pozitif yüklü kitosan molekülü ile hücrelerin yüzeyinde bulunan negatif yüklerin reaksiyona girerek hücre geçirgenliğinin değişmesine neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca ortam pH değerine göre düzeyi değişmekle beraber kitosan molekülü mikroorganizma hücre duvarında bulunan iz metalleri şelatlayabilmektedir. Kitosanın doğal olarak yüksek hidrofobik özelliklere sahip olması, bazı bileşenlerin kapsül içinde homojen bir şekilde dağılmasını da zorlaştırabilmektedir (Yarnpakdee vd, 2022).

Domates suyu ve havuç suyuna serbest hücre ve aljinat ile kitosan polimer kombinasyonu ile mikrokapsüle edilmiş *S. boulardii* probiyotik mayasının ilave edildiği bir çalışmada örnekler 37°C 'de 72 saat inkübe edildikten sonra 4°C 'de 6 hafta süreyle depolanmış ve probiyotik maya sayıları belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, bütün domates suyu ve havuç suyu örneklerine başlangıçta $6.58 \log \text{ kob/mL}$ olarak *S.*

boulardii eklenmiş olup serbest hücre maya eklenen örneklerde depolamanın beşinci haftası sonunda enkapsüle form maya eklenen örneklerde ise altıncı hafta sonunda maya sayısı 5.60 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Serbest hücre formunda maya eklenen örneklerde depolamanın beşinci haftasının sonunda maya sayısında 1 log birimlik azalma görülürken aynı miktarda azalma enkapsüle hücre eklenen örneklerin altıncı haftasının sonunda tespit edilmiştir (Sivudu vd., 2016). Tez çalışmasında bu sonuçlardan farklı olarak SH örneğinde depolamanın dördüncü haftası sonunda 4 log birimlik azalma görülürken aynı depolama süresinde ALG-INU örneği için 1 log ve CTS-ALG-INU örneği için ise 3 log birimlik azalma meydana gelmiştir. Bunun en önemli nedeni, nar sirkesi organik asit profilinin domates ve havuç suyundan çok farklı olmasıdır. Asetik asit moleküler formda kalarak *S. boulardii* hücresi içinde serbest yayılmakta ve diğer organik asitlerden daha fazla dissosiyasyon olarak hücre içi asitlenmeyi artırmaktadır.

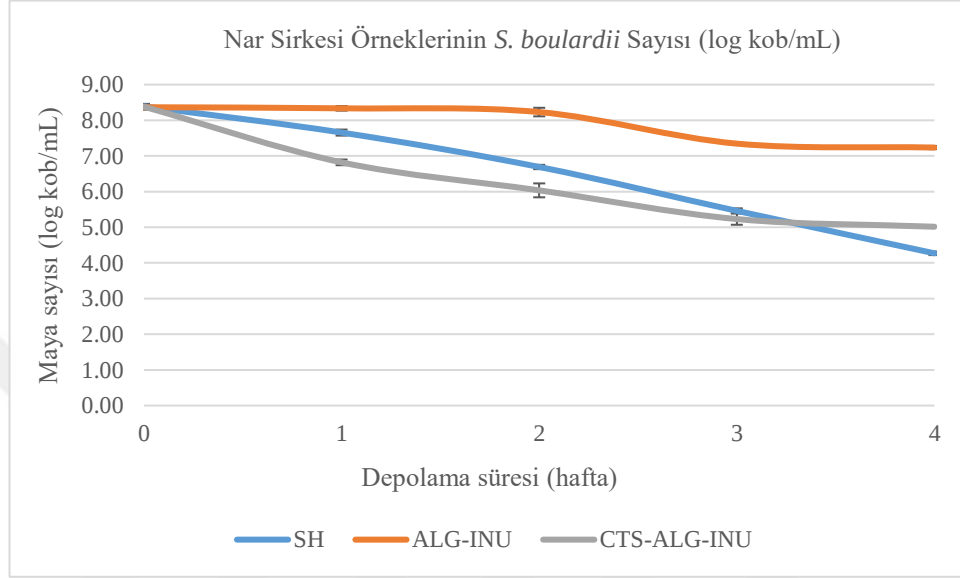
Nar suyuna (pH 3.21) serbest hücre (SH), aljinat (ALG), tek tabaka kitosanla kaplı aljinat (CTS-ALG) ve çift tabaka kitosanla kaplı aljinat (CTS+CTS-ALG) mikroenkapsüle *Lactobacillus plantarum* suşunun 8.6 log kob/mL olarak ilave edildiği ve 4 °C'de 6 hafta depolandığı bir çalışmada probiyotik bakteri sayısı tespit edilmiştir. Araştırmada depolamanın dördüncü haftası sonunda *L. plantarum* sayısı CTS-ALG örneğinde 6.1 log kob/mL iken CTS+CTS-ALG örneğinde ise 7.2 log kob/mL olduğu ve SH ile ALG örneklerinde probiyotik bakterinin tamamen inhibe olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda mikroenkapsülasyonda kitosan ve aljinat polimerlerinin kombine kullanılmasının nar suyunda *L. plantarum* probiyotiğinin korunmasında serbest hücreye ve aljinatın tek başına kullanılmasına kıyasla daha etkili olduğu anlaşılmıştır (Nualkaekul vd., 2012). Tez çalışmasında bu sonuçlara benzer olarak; ALG-INU ve CTS-ALG-INU örnekleri SH nar sirkesi örneğine kıyasla daha yüksek probiyotik canlılık göstermiştir. Ancak nar sirkesinde *S. boulardii* mayasının asit stresine karşı korunmasında kitosan ve aljinat kombinasyonu yeterince etkili olamamıştır. Bunun nedenlerinden biri nar suyu ile nar sirkesi organik asit profilinin farklılığıdır. Asetik asit stresi, *S. boulardii* maya plazma zarı bütünlüğünün kaybına ve geçirgen bir ortam oluşmasına neden olmaktadır. Bir diğer neden olarak ise kitosan ile kaplanmış aljinat mikrokürelerinden maya hücrelerinin nar sirkesine salınması sırasında pozitif yüklü kitosan molekülü ile hücrelerin yüzeyinde bulunan negatif

yüklerin reaksiyona girerek hücre geçirgenliğinin değişmesine neden olabileceği düşünülmektedir.

Kitosan mikroenkapsüllerinden mikroorganizmanın yeterince salınmaması da çalışmalarda sorun teşkil etmektedir (Gedik, 2022; Graff vd., 2008). Graff vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, *S. boulardii* mayasının gastrointestinal kanaldan bozunmadan geçip kolona ulaşması amacıyla aljinat ile mikroenkapsüle edilmiş mayanın ikinci tabaka olarak kitosanla kaplanıp kaplanmaması arasındaki fark belirlenmiştir. İn vitro olarak gerçekleştirilen çalışmada, pH 1.1'de 120 dakika sonunda kitosanla kapsüllenmemiş *S. boulardii* probiyotiğinin %1'den azı hayatta kalırken, kapsüllenmiş maya hücrelerinin çoğunluğu mikrokapsül içinde kalmıştır. pH 6.8'de, canlı mayaların yaklaşık %35'i salınmıştır. İn vivo olarak yürütülen çalışmanın ikinci aşamasında ise, sıçanlara 2×10^8 kob/100 g'lık tek oral doz probiyotik verilmesinin ardından 96 saat içinde gaita ile atılan canlı maya oranı belirlenmiştir. Sonuçta canlı maya düzeyi serbest hücre maya için %2.5, aljinat kaplı mikrokapsül için %13.3 ve kitosan kaplı aljinat mikrokapsüller için de %9.0 olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucuna göre aljinat mikroküreler içinde kapsüllenen *S. boulardii* maya hücreleri asidik bir ortama maruz kaldığında canlılığını önemli ölçüde korumuştur. Ayrıca mikrokürelerin kitosanla ikinci tabaka olarak kaplanmasının kolonda kapsüllerin yetersiz açılması sorunu nedeniyle canlı maya sayısının artmasına ek bir fayda sağlamadığı tespit edilmiştir.

Nar sirkesi örneklerinin 4 ± 1 °C'de dört hafta depolama süresince maya sayılarındaki değişim Şekil 4.4'te verilmiştir.

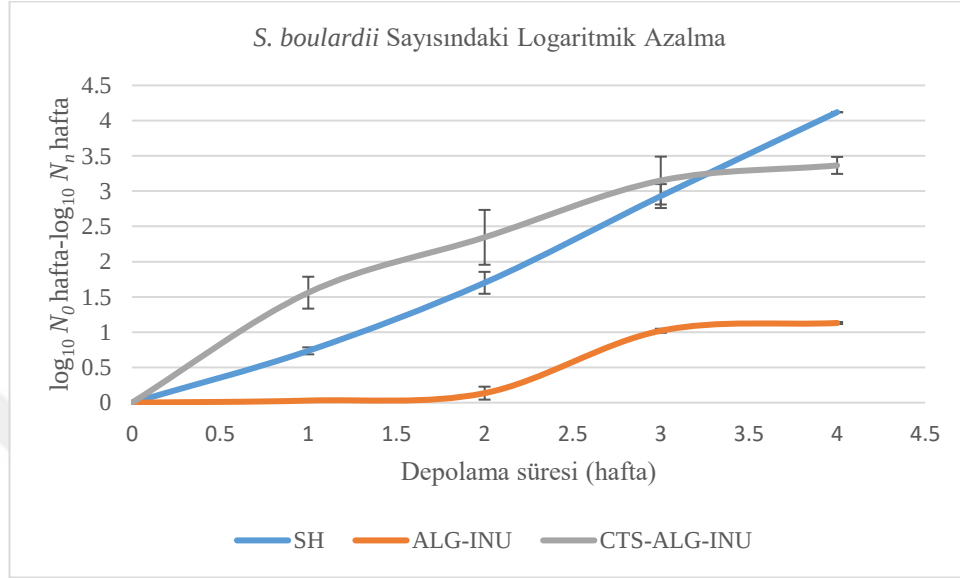
Grafikten takip edilebileceği gibi 4 ± 1 °C’de 4 haftalık depolama süresi boyunca nar sirkesi örneklerinde en yüksek *S. boulardii* maya sayısı ilk günde belirlenmiş olup depolama süresince SH; ALG-INU VE CTS-ALG-INU örneklerinde farklı oranlarda azalış göstermiştir. Depolama süresinin *S. boulardii* sayısına etkisi istatistiksel olarak önemli ($p<0.001$) bulunmuştur.



Şekil 4.4. Nar sirkesi örneklerinin maya sayılarının (log kob/mL) depolama süresince değişimi.
Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n=2).

Dört haftalık depolama süresi sonunda CTS-ALG-INU örneğinde *S. boulardii* canlılığı serbest hücre formundan daha iyi muhafaza edilirken ALG-INU örneğinin gerisinde kalmıştır. ALG-INU örneğinde *S. boulardii* sayısındaki azalmanın yaklaşık 1 log birimlik oluşu ve maya sayısının dört hafta boyunca 7 log kob/mL düzeyinde olması nedeniyle *S. boulardii* mayasının aljinat polimeriyle mikroenkapsüle formunun nar sirkesiyle iyi uyum sağladığı belirlenmiştir. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği’ne göre, bir yiyecek veya içeceğin probiyotik olarak tanımlanabilmesi için son kullanma tarihine kadar en az 1×10^6 kob/g canlı mikroorganizma içermesi gerekmektedir. Bu değer, probiyotiklerin olası sağlık etkilerini gösterebilmeleri için gerekli olan en düşük miktarı ifade etmektedir. Probiyotik yeterlilik bakımından SH ve CTS-ALG-INU örneklerinin depolama süresinin iki hafta olması gerektiği saptanmıştır. ALG-INU örneğinde ise depolama süresinin dört haftanın üzerine çıkarılmasıyla probiyotik yeterliliğin sonlandığı depolama süresinin belirlenmesi gerekmektedir.

S. boulardii ilave edilmiş nar sirkesi örneklerinin 4 ± 1 °C’de dört hafta depolama süresince maya sayılarının logaritmik azalmaları Şekil 4.5’te verilmiştir. Maya sayılarındaki logaritmik azalma $\log_{10} N_{0, \text{hafta}} - \log_{10} N_{n, \text{hafta}}$ ($n=1,2,3$ ve 4.hafta) şeklinde hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. Nar sirkesi örneklerinin maya sayılarındaki logaritmik azalma.
Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir ($n=2$).

Grafikten takip edilebileceği gibi; dört haftalık depolama süresi boyunca SH örneğinin maya sayısı, doğrusal bir logaritmik azalma göstermiştir. ALG-INU örneğinde ise, depolamanın ilk iki haftasında maya sayısındaki logaritmik azalma değeri ihmal edilecek kadar az iken depolamanın sonraki haftalarında SH ve CTS-ALG-INU örneklerine göre daha düşük bir azalma eğilimi olduğu görülmektedir. CTS-ALG-INU örneğinde ise *S. boulardii* ölüm hızı depolamanın üçüncü haftasına kadar SH örneğinden fazla olduğu görülmektedir. Ancak depolamanın üçüncü haftasından sonra CTS-ALG-INU örneğinde *S. boulardii* ölüm hızı yavaşlamış ve SH örneğindeki *S. boulardii* ölüm hızının altına düşmüştür. Bunun nedeni olarak; asetik asit ortamında kitosanın amino gruplarının proton bağlayarak pozitif yüklü hale geçmesi ve kitosan ile kaplanmış aljinat mikrokürelerinden maya hücrelerinin nar sirkesine salınması sırasında maya hücrelerinin yüzeyinde bulunan negatif yüklerle reaksiyona girerek hücre geçirgenliğinin değişmesi olabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (Biocodex, Fransa) probiyotik mayası, serbest hücre (SH) formunda, inülin prebiyotiği eklenmiş aljinat (ALG-INU) ve çift tabaka aljinat ve kitosan (CTS-ALG-INU) polimerleriyle simbiyotik mikroenkapsüle edilerek nar sirkesine (3.6 pH) eklenmiştir. Nar sirkesi örneklerinin $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 4 hafta depolama süresi boyunca 0, 1, 2, 3 ve 4. haftalarındaki bazı kimyasal özellikleri (titrasyon asitliği değeri, pH değeri, suda çözünür kuru madde miktarı) ve *S. boulardii* maya sayısı belirlenmiştir.

Tez deneme planının oluşturulmasında ön deneme aşamasında; 2.97 pH, titrasyon asitliği değeri 4.01 g/100 mL asetik asit ve suda çözünür kuru madde miktarı 3.15 Briks olan Tarım Kredi Kooperatifi (TKK) tarafından üretilen endüstriyel nar sirkesine $\sim 8 \log$ kob/mL düzeyinde *S. boulardii* mayası SH; ALG-INU ve CTS-ALG-INU formlarında eklenmiş ve nar sirkesi örnekleri $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat depolanarak maya sayısı için analize alınmıştır. Analiz sonuçlarında *S. boulardii* mayasının inhibe olduğu anlaşılmış ve çalışmaya ev tipi nar sirkesi ile devam edilmiştir. Ev tipi nar sirkesinin bazı kimyasal özellikleri; 3.6 pH, 1.08 g/100mL asetik asit titrasyon asitliği, 1.5 Briks, %0.87 asetik asit, %0.05 formik asit ve %0.04 sitrik asit olup hâkim asit asetik asit olarak belirlenmiştir.

S. boulardii ilave edilen nar sirkesi örneklerinin pH değeri incelendiğinde, başlangıçta 3.6 pH olan nar sirkesine serbest hücre veya mikroenkapsüle hücre formunda *S. boulardii* mayası ilave edildiğinde probiyotik nar sirkesi örneklerinin (3.57-3.63 pH) 3.6 pH değerinde olduğu ve *S. boulardii* ilavesinin ve kullanılan polimerlerin nar sirkesinin pH değerini önemli düzeyde değiştirmedeği belirlenmiştir.

Titrasyon asitliği miktarındaki değişim incelendiğinde ise tez çalışmasında, $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de dört hafta depolanan bütün nar sirkesi örneklerinin toplam asitlik miktarında artış olmamasına bakılarak *S. boulardii* mayasının nar sirkesinde herhangi bir fermantasyona neden olmadığı sonucuna varılmıştır. SH ve CTS-ALG-INU örneklerinde depolama süresi sonunda titrasyon asitliği miktarı ortalama değerlerinin başlangıç nar sirkesi titrasyon asitliği miktarı (1.08 g/100mL asetik asit) ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. ALG-INU örneğinde ise 0.91 g/100mL asetik asit ile titrasyon asitliği değerindeki azalmanın istatistik olarak önemli ($p<0.001$) olduğu tespit

edilmiştir. ALG-INU örneğinin titrasyon asitliği değerinin diğer nar sirkesi örneklerinden farklı olarak başlangıçta ve depolama süresi boyunca azalmasının nedeni, sodyum aljinat kapsüllerini çevreleyen Ca^{+2} iyonlarının zaman içerisinde sirkeye geçerek tamponlayıcı etkide bulunması ve sodyum aljinatın (5-11 pH) alkali karakterde olması ve sirkeye zaman içinde salınması olduğu düşünülmektedir.

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği'ne göre, bir yiyecek veya içeceğin probiyotik olarak tanımlanabilmesi için son kullanma tarihine kadar en az 6 log kob/g canlı mikroorganizma içermesi gerekmektedir. Bu açıdan nar sirkesi örneklerinin 4 ± 1 °C'de dört haftalık depolama süresi sonunda probiyotik yeterlilikleri değerlendirildiğinde; sadece ALG-INU örneği 7.24 log kob/mL *S. boulardii* maya sayısı ile limit değerin üzerinde kalmıştır. Başlangıçta bütün nar sirkesi örneklerine ~ 8 log kob/mL düzeyinde *S. boulardii* inoküle edilmiş olup dört haftalık depolama süresi sonunda SH için 4.27 log kob/mL; CTS-ALG-INU için ise 5.02 log kob/mL maya sayısı tespit edilmiştir. Araştırma sonunda probiyotik yeterlilik açısından SH ve CTS-ALG-INU örneklerinin 4 ± 1 °C'de 2 hafta depolanabileceği anlaşılmıştır.

Yüksek asitli gıdalara eklenen probiyotikler depolama süresi boyunca ortam koşullarından etkilenerek canlılıklarını kaybedebilmektedir. Bu nedenle tez çalışmasında maya, ilk tabaka olarak aljinat ile kaplanırken ikinci tabaka olarak asit direnci yüksek olan kitosan polimeri ile kaplanmış ve prebiyotik olarak inülin tercih edilerek probiyotiğin hassasiyetini azaltmak ve canlılığını en yüksek düzeyde tutmak amaçlanmıştır. Aljinat, CaCl_2 ile yumuşak bir matris oluşturur ancak asitli ortamlara karşı hassas bir polimerdir. Kitosan polimeri aljinatın jel gözenekliliğini azaltarak asit direncini artırmaktadır. Bu tez çalışmasında beklenenin aksine inülin prebiyotiği içeren aljinat polimeri ile gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işleminin nar sirkesi gibi yüksek asitli bir gıda matrisinde *S. boulardii* mayasının canlı kalma düzeyini önemli bir şekilde artırdığı belirlenmiştir. ALG-INU örneğinde *S. boulardii* sayısındaki azalmanın yaklaşık 1 log birimlik oluşu ve maya sayısının dört hafta boyunca 7 log kob/mL düzeyinde olması nedeniyle *S. boulardii* mayasının aljinat polimeriyle mikroenkapsüle formunun nar sirkesiyle iyi uyum sağladığı belirlenmiştir.

Aljinat kapsülünü çevreleyen kitosan zarının varlığı asitlerin gıdadan kapsüle geçişini azaltmaktadır. Ancak tez çalışmasında bu etkinin aksine depolamanın üçüncü

haftasına kadar CTS-ALG-INU örneğinde *S. boulardii* ölüm hızının SH örneğinden fazla olduğu tespit edilmiştir. Depolamanın üçüncü haftasından sonra ise CTS-ALG-INU örneğinde *S. boulardii* ölüm hızı yavaşlamış ve SH örneğindeki *S. boulardii* ölüm hızının altına düşmüştür. Dört haftalık depolamanın sonunda CTS-ALG-INU örneği ile SH örneği arasındaki *S. boulardii* canlılığı farkı 0.75 log olarak gerçekleşmiş ve kitosan kaplama ile maya serbest hücreden daha iyi korunmuştur. Kitosan asit direnci yüksek bir polimer olup mayaların mikroenkapsülasyonunda da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak asetik asit bakımından zengin bir gıda olan sirkede kitosan polimeri ve kitosanla kaplanmış aljinat mikrokapsülü içinde *S. boulardii* mayası ilk defa kullanılmıştır.

Probiyotik eklenen gıdanın organik asit profilinin de *S. boulardii* canlılığının korunmasında etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda kaju suyu, elma suyu ve parçaları, üzüm suyu, domates ve havuç suyu ile karpuz, kırmızı pancar ve siyah havuç suyuna probiyotik olarak *S. boulardii* mayası eklenmiş ve meyve sularının depolanması sürecinde mayanın canlılığını koruyabildiği belirlenmiştir. Bu açıdan incelendiğinde, sitrik asit ya da laktik asit asetik aside göre daha fazla iyonize olurken asetik asit moleküler formda kalmaktadır. Moleküler formda kalan asetik asit, iyonize forma göre hücre içinde daha fazla serbest yayılarak dissosiyasyon olmaktadır ve bunun sonucunda hücre içi asitlenmeyi artırmaktadır.

Kitosanın sirke matrisinde mikroenkapsüle mikroorganizmayı korumada yeterince etkili olamamasının nedenlerinden birinin, yüksek asetik asit ortamında kitosan moleküllerinin asit kataliziyle parçalanması sonucu kitosanın amino grubunun protonlanması ve molekül yapısının değişmesidir. Bir diğer neden ise tez çalışmasında kullanılan kitosan polimerinin orta moleküler ağırlıklı olduğu düşünüldüğünde, asetik asit miktarı yüksek bir ortamda kitosan ile kaplanmış aljinat mikrokürelerinden maya hücrelerinin nar sirkesine salınması sırasında pozitif yüklü kitosan molekülü ile hücrelerin yüzeyinde bulunan negatif yüklerin reaksiyona girerek hücre geçirgenliğinin değişmesi sonucu maya inhibisyonuna neden olabileceğidir. Asetik asit stresi, *S. boulardii* maya plazma zarı bütünlüğünün kaybına ve geçirgen bir ortam oluşmasına neden olmaktadır. Membran geçirgenliğinin değişmesi ile besin maddeleri hücre içerisine girememekte veya hücre içi bileşenleri hücre dışına sızmakta ve bunların sonucunda da hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Bu tez çalışmasında, ekstrüzyon yöntemiyle aljinat ve kitosan polimerleriyle gerçekleştirilen enkapsülasyon işleminin etkinliği %80 olarak hesaplanmıştır. Literatürle de uyumlu olan bu değer enkapsülasyon işlemlerinin başarıyla gerçekleştirildiğinin bir göstergesidir. Simbiyotik mikrokapsüllerin yüksek asitli bir gıda olan nar sirkesinde *S. boulardii* mayasının canlılığı üzerinde olumlu etki yaptığı düşünülmektedir. Serbest hücre formu ile kıyaslandığında simbiyotik mikrokapsüllerin maya canlılığını daha fazla korumasında kullanılan polimerle birlikte inülin prebiyotığının de etkisi olması muhtemeldir.

Dünya nüfustaki laktoz intoleransı (%65), süt alerjileri ve artan vejetaryenlik eğilimi göz önüne alındığında süt ürünü olmayan yeni probiyotik gıdalara olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Özellikle pandemiden sonra, bağışıklık sistemini destekleyen gıdalar üzerine olan çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda sindirim sistemi mikrobiyotası ile sağlıklı beslenme ve yaşam arasında doğrudan bir ilişki olduğu netlik kazanmıştır. Günümüzde probiyotikler sağlığın korunmasında ve birçok hastalığın tedavi edilmesinde tercih edilmektedir. Probiyotik nar sirkesinin antioksidan bakımından zengin fonksiyonel bir gıda olmasının yanında diyare tedavisinde ilaç almakta zorlanan bireyler için de alternatif bir yol olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca son yıllarda vegan beslenmenin artması ve süt kaynaklı intolerans problemlerinin toplumda yaygın olması nedeniyle bitkisel ve süt içermeyen bir gıda bilinçli beslenen bireyler tarafından tercih edilecektir.

Bu çalışma ile ilk defa nar sirkesi gibi asetik asit bakımından zengin fermante bir gıdaya *S. boulardii* mayası eklenerek dört hafta depolama süresi boyunca 7 log kob/mL üzerinde probiyotik içeren ve sağlık için ekstra faydalar sunan yeni bir fonksiyonel gıda üretimi gerçekleştirilmiştir. *S. boulardii* mayasının asitliğe dirençli olduğu bilinse de literatürde asetik asit bakımından zengin sirke gibi yüksek asitli bir gıdada uzun depolama süresi boyunca maya canlılığının nasıl değişeceğine dair yapılmış bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu çalışma sonuçları, bundan sonra üretilecek olan bitkisel fermante gıdalar gibi yüksek asitli gıdalara *S. boulardii* mayasının eklenmesi sırasında oluşabilecek sorunların çözümüne yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Ademoglu, F., Abacioglu, N., Baloglu, E. ve Gurdal, H., 2006. The characterization of the vascular effects of ghrelin on rat aorta, *Acta Pharmacologica Sinica*, 27.
- Akan, E., 2016. Ticari nar sirkesi üretiminde farklı konsantrasyonlarda baharat (tarçın, sarımsak, kekik ve karanfil) ekstraktı ve kesikli-TEA uygulamalarının mikrobiyolojik inaktivasyon etkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Akbaş, M., 2008. Ülkemizde üretilen üzüm sirkelerinin bileşimleri ve gıda mevzuatına uygunlukları üzerine bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Akçiçek, E., Ötleş, S. ve Kalkan Yıldırım, H., 2020. Sirke Kadim İksir, Gece Kitaplığı, Ankara.
- Alkan, R., 2012. Probiyotik maya: *Saccharomyces boulardii*, TÜBAV Bilim Dergisi, 5, 4, 13-16.
- Altwegg, M., Schnack, J. ve Zbinden, R., 1995. Influence of *Saccharomyces boulardii* on *Aeromonas hemolysin*, *Medical Microbiology Letters*, 4, 8, 417-425.
- Anal, A. K. ve Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends in Food Science & Technology*, 18,5, 240-251.
- AOAC, 2000. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 17th edition, Washington DC.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. ve Heras, A., 2009. Functional characterization of chitin and chitosan, *Current Chemical Biology*, 3, 203-230.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D. ve Fuhrman, B., 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1062-1076.
- Aybek, A., 2019. Geleneksel yöntemlerle zivzik narından sirke üretimi ve elde edilen sirkenin kalite parametrelerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Siirt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Siirt.
- Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99, 191-203.

- Bamforth, S. M. ve Singleton, I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 80, 7, 723-736.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O. ve Gurny, R., 2004. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 1, 35-52.
- Bostan, K., Aldemir, T. ve Aydın, A., 2007. Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi, *Türk Mikrobiyol Cem. Derg.*, 37, 2, 118-127.
- Budak, N.H., 2010. Elma ve üzümünden üretilen sirkelerin bileşenleri ve fonksiyonel özellikleri üzerine araştırma, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Buts, J.P., Dekeyser, N. ve Stilmant, C., 2006. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation, *Pediatric Research*, 60, 1, 24-9.
- Calinoiu, L. F., Ştefanescu, B. E., Pop, I. D., Muntean, L. ve Vodnar, D. C., 2019. Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation, *Coatings*, 9, 3, 194.
- Casettaria, L., Vllasaliu D., Castagnino E., Stolnik S., Howdle, S. ve Illum, L., 2012. Pegylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications, *Progress in Polymer Science* 37, 659-685.
- Castagliuolo, I., Lamont, J.T., Nikulasson, S.T. ve Pothoulakis, C., 1996. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum, *Infection and Immunity*, 64,12, 5225-32.
- Cemeroğlu, B., 2013. Gıda Analizleri, Bizim Grup Basımevi, Ankara.
- Chaikham, P., 2015. Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage, *Food Bioscience*, 12, 61-66.
- Chan, M. Z. A. ve Liu, S. Q., 2022. Fortifying foods with synbiotic and postbiotic preparations of the probiotic yeast, *Saccharomyces boulardii*, *Current Opinion in Food Science*, 43, 216-224.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P. ve Jones, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions, *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27-35.
- Chang, R. C., Lee, H. C. ve Ou, S. M., 2005. Investigation of the physicochemical properties of concentrated fruit vinegar, *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 4, 1.

- Chen, S., Zhao, Q., Ferguson, L. R., Shu, Q., Weir, I. ve Garg, S., 2012. Development of a novel probiotic delivery system based on microencapsulation with protectants, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1447-1457.
- Choi, HJ., Gwak, KJ., Choi, DB., Park, JY. ve Cheong, HS., 2015. Antimicrobial efficacy of fermented dark vinegar from unpolished rice, *Microbiology and Biotechnology Letters*, 43, 2, 97-104.
- Codex Alimentarius, 1987. Codex Regional Standard for vinegar, CodexStandard 162, Geneva, FAO/OMS.
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D. ve Khutoryanskiy, V.V., 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery, *J. Controlled Release*, 162, 56-67.
- Cruess, W.V., 1958. Commercial fruit and vegetable products: Vinegar manufacture, McGraw-Hill Book Company, 1st edition, 681-707.
- Czerucka, D., Piche, T. ve Rampal, P., 2007. Yeast as probiotics–*Saccharomyces boulardii*, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26, 6, 767-778.
- Czerucka, D. ve Rampal, P., 1999. Effect of *Saccharomyces boulardii* on camp and Ca^{+2} dependent Cl^{-} secretion in T84 cells, *Digestive Diseases and Sciences*, 44, 11, 2359-68.
- Çakır, S., 2021. Bazı probiyotik bakterilerin mikrokapsülasyonu ve meyve suyunda kullanımının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- De Prisco, A. ve Mauriello, G., 2016. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool, *Trends Food Science Technology*, 48, 27-39.
- Değirmencioglu, N., Gurbuz, O. ve Şahan, Y., 2016. The monitoring, via an in vitro digestion system, of the bioactive content of vegetable juice fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*, *Journal of Food Processing and Preservation*, 40, 4, 798-811.
- Delzenne, N. M. ve Kok, N. 2001. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 456-458.
- Desai, K. ve Park, H. J., 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients, *Drying Technology*, 23, 1361-1394.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L. ve Relman, D.A., 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing, *PLoS Biolgy*, 18, 11, 280.
- Ding, W. K. ve Shah, N. P., 2008. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage, *J. Food Science*, 74, 53-61.

- Doherty, S. B., Auty, M. A., Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. ve Brodtkorb, A. J. I. D. J., 2012. Survival of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit, *International Dairy Journal*, 22, 1, 31-43.
- Duman, S.S. ve Şenel, S., 2004. Kitosan ve veteriner alandaki uygulamaları, *Veteriner Cerrahi Dergisi*, 62-72.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O. ve Gürbüz, F., 1987. Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik II), Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, 381, Ankara.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2012. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-3799 and reducing gastro-intestinal discomfort pursuant to Article 13 of Regulation, No 1924/2006, *EFSA Journal*, 10, 7, 2801.
- El-Nemr, S.E., Ismail, I.A. ve Ragab, M., 2006. Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit, *Die Nahrung*, 34, 7, 601-606.
- Emirleroglu, E., 2021. *Saccharomyces boulardii* ve *Escherichia coli* nissle 1917 kullanılarak probiyotik bira üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ergin, S. Ö., 2019. Nar meyvesi (*Punica granatum* L.) ile farklı nar ürünlerinin antioksidan özellikleri, *Akademik Gıda*, 17, 2, 243-251.
- Erkan Koç, B. ve Özkan, M., 2011. Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı, *Gıda Dergisi*, 36, 3, 161-168.
- Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, H.M. ve Bayat, M., 2005. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran, *Food Science and Technology International*, 11, 113-119.
- FAO/WHO, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria; FAO: Rome, Italy; WHO: Geneva, Switzerland.
- Farinazzo, F. S., Madeira, T. B., Fernandes, M. T. C., Mauro, C. S. I., Tomal, A. A. B., Nixdorf, S. L. ve Garcia, S., 2020. Organic and conventional apple fermented by *Saccharomyces boulardii*-The effect of the antioxidant quercetin on cellular oxidative stress, *British Food Journal*.
- Fernandes, S.S., Coelho, M.S. ve de las Mercedes Salas-Mellado, M., 2019. Bioactive compounds as ingredients of functional foods, 129-142, Amsterdam, The Netherlands.

- Fietto, J.L., Araújo, R.S. ve Valadao, F.N., 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*, *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 8, 615-21.
- Fратиanni, F., Cardinale, F., Russo, I., Iuliano, C., Tremonte, P., Coppola, R. ve Nazzaro, F., 2014. Ability of synbiotic encapsulated *Saccharomyces cerevisiae* *boulardii* to grow in berry juice and to survive under simulated gastrointestinal conditions, *Journal of Microencapsulation*, 31, 3, 299-305.
- Fu, J., Liu, C., Li, L., Liu, J., Tie, Y., Wen, X. ve Zheng, J., 2022. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae* *boulardii*: a metabolomics approach, *International Journal of Food Science & Technology*, 57, 5, 2918-2931.
- Gallo, M., Bevilacqua, A., Speranza, B., Sinigaglia, M. ve Corbo, M. R., 2014. Alginate beads and apple pieces as carriers for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, as representative of yeast functional starter cultures, *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 9, 2092-2100.
- Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S. ve 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 Technology*.
- Garcia-Vilela, E., De Lourdes De Abreu Ferrari, M. ve Oswaldo Da Gama Torre, H., 2008. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43, 7, 842-8.
- Gedik, O., 2022. Mikroenkapsülasyon yoluyla sinbiyotik üretimi ve özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Gharsalloui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. ve Saurel, R., 2007. Application of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. ve Kader, A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4581-4589.
- Girard-Pipau, F., Pompei, A. ve Schneider, S., 2002. Intestinal microflora, short chain and cellular fatty acids, influence of a probiotic *S. boulardii*, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14, 4, 220-7.
- Giudici, P., De Vero, L. ve Gullo, M., 2017. Vinegars, In *Acetic Acid Bacteria: Fundamentals and Food Applications*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 261-287.

- Graff, S., Hussain, S., Chaumeil, J. C. ve Charrueau, C., 2008. Increased intestinal delivery of viable *Saccharomyces boulardii* by encapsulation in microspheres, *Pharmaceutical Research*, 25, 1290-1296.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. ve Giudici, P., 2006. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 209-212.
- Gullo, M., Verzelloni, E. ve Canonico, M., 2014. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects, *Process Biochemistry*, 49, 1571-1579.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M. ve Testoni, P. A., 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn’s disease, *Digestive Diseases and Sciences*, 45, 1462-1464.
- Halkman, A.K., 2019. *Gıda Mikrobiyolojisi*, Başak Matbacılık, Ankara.
- Harrigan, W.F., 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*, Third Edition, Academic Press, San Diego, California, USA.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Lorenzo Morelli, R.B.C., Flint, H.J., Salminen, S. ve Calder, P.C., 2014. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 8, 506-514.
- Hindi, N. K. K. ve Chabuck, Z. A. G., 2013. Antimicrobial activity of different aqueous lemon extracts, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3, 6, 074-078.
- Holzapfel, W.H. ve Schillinger, U., 2002. Introduction to prebiotics and probiotics, *Food Research Int.*, 35, 109-116.
- Jeon, Y.J., Kamil, J.Y.V.A. ve Shahidi, F., 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5167-5178.
- Johnston, C.S., Kim, C.M. ve Buller, A.J., 2004. Vinegar improves insulin sensitivity to a high carbohydrate meal in subjects with insulin resistance or type 2 diabetes, *Diabetes Care*, 27, 281-282.
- Kalaycıoğlu, Z. ve Erım, F.B., 2017. Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide, *Food Chemistry*, 221, 496-507.
- Kalkan, S., 2019. Mikroenkapsüle *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* kullanılarak üretilen kefirin bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 9, 1, 572-580.

- Karaolis, C., Botsaris, G., Pantelides, I. ve Tsaltas, D., 2013. Potential application of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in goat's yoghurt: survival and organoleptic effects, *International Journal of Food Science & Technology*.
- Khan, R.S., Grigor, J., Winger, R. ve Win, A., 2013. Functional food product development-Opportunities and challenges for food manufacturers, *Trends in Food Science & Technology*, 30, 27-37.
- Kılıç, E., 2022. Doğal kaynaklardan izole edilen yoğurt bakterilerinin starter kültür potansiyellerinin belirlenmesi ve mikroenkapsülasyon, Doktora Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Kınık, Ö., Kavas, G. ve Yılmaz, E., 2003. Mikroenkapsülasyon tekniği ve süt teknolojisindeki kullanım olanakları, *Gıda Dergisi*, 28, 4, 401-407.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. ve Deeth, H., 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, *International Dairy Journal*, 13, 1, 3-13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. ve Deeth, H., 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria, *International Dairy Journal*, 14, 8, 737-743.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. ve Deeth, H. C., 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT-and conventionally treated milk during storage, *LWT-Food Science and Technology*, 39, 2, 177-183.
- Krasaekoopt, W. ve Watcharapoka, S., 2014. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice, *LWT-Food Science and Technology*, 57, 2, 761-766.
- Kristi, J., Smid-Korbac, J., Struc, E., Schara, M. ve Rupprecht, H., 1993. Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers, *Int. J. Pharm.*, 99, 13-19.
- Kumar, M.N.V.R., 2000. A Review of Chitin and Chitosan Application, *React. Funct. Polym.*, 46, 1-27,
- Kurita, K., 2006. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans, *Marine Biotechnology*, 8, 203-226.
- Kurt, H. ve Şahin, G., 2013. Bir ziraat coğrafyası çalışması: Türkiye’de (*Punica granatum L.*) nar tarımı, *Marmara Coğrafya Dergisi*, 27, 551-574.
- Kurtuluş, G. ve Vardar, F., 2020. Kitosanın özellikleri, uygulama alanları, bitki sistemlerine etkileri, *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 32, 3, 258-269.

- Koyama, K. ve Seki, M., 2004. Evaluation of mass-transfer characteristics in alginate-membrane liquid-core capsules prepared using polyethylene glycol, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 2, 114-121.
- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A. ve Kelly, C.P., 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhea, *Lancet*, 357, 189-93.
- Lazo-Velez, M. A., Serna-Saldivar, S. O., Rosales-Medina, M. F., Tinoco-Alvear, M. ve Briones-Garcia, M., 2018. Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review, *Journal of Applied Microbiology*, 125, 4, 943-951.
- Lillo-Perez, S., Guerra-Valle, M., Orellana-Palma, P. ve Petzold, G., 2021. Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers, *LWT*, 151, 112106.
- Mantzourani, I., Kazakos, S., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Bekatorou, A. ve Plessas, S., 2019. Potential of the probiotic *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 strain to produce functional fermented pomegranate juice, 8, 4.
- McFarland, L.V., 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients, *World Journal of Gastroenterology*, 16, 18, 2202-2222.
- McFarland, L.V., 2014. Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review, *BMJ Open* 4, 8, e005047.
- McFarland L.V., 2015. From yaks to yogurt: the history, development and current use of probiotics, *Clinical Infectious Diseases*, 60, 2, 85-90.
- Mousa, A. H., Wang, G. ve Zhang, H., 2019. Production of lactic and acetic acids during fermentation of milk fortified with kiwi juice using *Saccharomyces boulardii* and *Lactobacilli*, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18, 4, 681-687.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H. ve Murooka, Y., 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2, 986-990.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Sada, A. ve Orlando, P., 2008. Synbiotic potential of carrot juice supplemented with *Lactobacillus* spp. and inulin or fructooligosaccharides, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 13, 2271-2276.

- Nuallkaekul, S., Lenton, D., Cook, M.T., Khutoryanskiy, V.V. ve Charalampopoulos, D., 2012. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice, *Carbohydrate Polymers*, 90, 3, 1281-1287.
- Ohland, C. ve Macnaughton, W., 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298, 807-819.
- Ousaaïd, D., Mechchate, H., Laaroussi, H., Hano, C., Bakour, M., El Ghouizi, A. ve El Arabi, I., 2021. Fruits vinegar: Quality characteristics, phytochemistry, and functionality, *Molecules*, 27, 1, 222.
- Öztürk, I., Çalışkan, O., Tornuk, F., Özcan, N., Yalçın, H., Başlar, M. ve Sağdıç, O., 2015. Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars, *LWT-Food Science and Technology*, 63, 1, 144-151.
- Özcan, T. ve Altun, B., 2013. Süt ürünlerinde probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu I: enkapsülasyon teknikleri, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27, 2, 93-104.
- Palamutoğlu, R. ve Sarıçoban, C., 2013. Probiyotik mikrororganizmaların mikroenkapsülasyonu, *Akademik Gıda*, 11, 1, 88-96.
- Pawar, S. N. ve Edgar, K. J., 2012. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications, *Biomaterials*, 33, 11, 3279-3305.
- Peker, H. ve Arslan, S., 2011. Mikroenkapsülasyon ve süt teknolojisinde kullanım alanları, *Akademik Gıda*, 9, 6, 70-80.
- Pennacchia, C., Blaiotta, G., Pepe, O. ve Villani, F., 2008. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics, *Journal of Applied Microbiology*, 105, 6, 1919-28.
- Peppler, H.J. ve Beaman, R.G., 1967. Microbial technology vinegar fermentation, Reinhold Publishing Corporation, 344-359.
- Rainieri, S. ve Zambonelli, C., 2009. Organisms associated with acetic acid bacteria in vinegar production, pp. 73-95, in: Solieri, L., Giudici, P. (Editor), *Vinegars of the World*, Springer-Verlag, Italy.
- Riaz, Q. U. A. ve Masud, T., 2013. Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability, *Critical reviews in food science and nutrition*, 53, 3, 231-244.
- Ryan, E. P., Heuberger, A. L., Weir, T. L., Barnett, B., Broeckling, C. D. ve Prenni, J. E., 2011. Rice bran fermented with *Saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5, 1862-1870.

- Sadler, J., 2005. Innovation in functional food and drinks, Bus. Insights Ltd., Warwick, UK.
- Samanidou, V. F., Antoniou, C. V. ve Papadoyannis, I. N., 2001. Gradient RP-HPLC determination of free phenolic acids in wines and wine vinegar samples after spe, with photodiode array identification. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24, 14, 2161-2176.
- Santana, R. V., dos Santos, D. C., Santana, A. C. A., de Oliveira Filho, J. G., de Almeida, A. B., de Lima, T. M. ve Egea, M. B., 2020. Quality parameters and sensorial profile of clarified “Cerrado” cashew juice supplemented with *Sacharomyces boulardii* and different sweeteners, *LWT*, 128, 109319.
- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R. ve Ebadi, A., 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes, *Scientia Horticulturae*, 111, 24-29.
- Satıcı, M., 2021. Çeşitli hammaddelerden üretilen ev yapımı sirkelerin fizikokimyasal ve biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi ile bazı gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların canlı kalma durumları üzerine etkilerinin tespiti, Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun.
- Sievers, M. ve Swings, J., 2005. Family Acetobacteraceae, *Manual of systematic bacteriology*, pp. 41-95, in: G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Editor), Springer, New York, USA.
- Sivudu, N., S., Ramesh, B., Umamahesh, K. ve Vijaya Sarathi Reddy, O., 2016. Probiotication of tomato and carrot juices for shelf-life enhancement using micro-encapsulation, *Journal of Food Biosciences and Technology*, 6, 2, 13-22.
- Solieri, L. ve Giudici, P., 2009. *Vinegars of the world*, Springer-Verlag, 17-39.
- Şengün, İ. Y. ve Kılıç, G., 2019. Farklı sirke çeşitlerinin mikroflorası, biyoaktif bileşenleri ve sağlık üzerine etkileri, *Akademik Gıda*, 17, 1, 89-101.
- Talebnia, F. ve Taherzadeh, M. J., 2006. In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*, *Journal of Biotechnology*, 125, 3, 377-384.
- Tesfaye, W., Morales, M.L., Garcia-Prailla, M.C. ve Troncoso, A.M., 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation, *Trends in Food Science & Technology*, 13, 12-21.
- Thirugnanasambandan, T. ve Gopinath, S. C., 2023. Laboratory to industrial scale synthesis of chitosan-based nanomaterials: A review, *Process Biochemistry*.
- Tormo, M. ve Izco, J.M., 2004. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products, *Journal of Chromatography A*, 1033, 305–310.

- TSE 1880 EN 13188, 2024. Sirke ve tarım kökenli sıvılardan elde edilen ürün-tarifler, özellikler, işaretleme, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Ünal, E., 2007. Dimrit üzümünden değişik yöntemlerle sirke üretimi üzerinde bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Wang, R., Sun, J., Lassabliere, B., Yu, B. ve Liu, S. Q., 2022. Green tea fermentation with *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and *Lactiplantibacillus plantarum* 299V, LWT, 157, 113081.
- Wang, R., Zhang, X., Zhu, J., Bai, J., Gao, L. ve Liu, S., 2020. Facile preparation of self-assembled chitosan-based composite hydrogels with enhanced adsorption performances, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Aspects, 598, 124860.
- Yabancı, N., 2010. İnülin ve oligofruktozların insan sağlığı ve beslenmesi üzerine etkileri, Akademik Gıda, 8, 1, 49-54.
- Yamada, Y. ve Yukphan, P., 2008. Genera and species in acetic acid bacteria, International Journal of Food Microbiology, 125:15-24.
- Yarnpakdee, S., Kaewprachu, P., Jaisan, C., Senphan, T., Nagarajan, M. ve Wangtueai, S., 2022. Extraction and physico-chemical characterization of chitosan from Mantis shrimp (*oratosquilla nepa*) shell and the development of bio-composite film with agarose, Polymers 14, 19, 3983.
- Yetiman, A. E., 2012. Sirke mikroflorasındaki asetik asit bakterilerinin moleküler teknikler ile tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Yıldırım, Z., Öncül, N. ve Yıldırım, M., 2016. Kitosan ve antimikrobiyal özellikleri, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 5, 1, 19-36.
- Yıldız Turgut, D. ve Seydim, A.C., 2013. Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen bazı Nar (*Punica granatum* L.) çeşit ve genotiplerinin organik asit ve şeker kompozisyonu, Akademik Ziraat Dergisi, 2, 1, 35-42.
- Yıldız, P. O. ve Yangılar, F., 2014. Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fen Bilimleri Dergisi, 30, 3, 198-206.
- Zhang, H., Chen, K. ve Yang, J., 2022. Development of a versatile microencapsulation technique for aqueous phases using inverse emulsion, Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects, 634, 127865.
- URL-1 <<https://serifehatun.com.tr/sirke/nar-sirkesi>>, Erişim tarihi: 06.06.2024.
- URL-2 <<https://www.wikiwand.com/en/Barrel>>, Erişim tarihi: 06.06.2024.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Rumeysa Etlik

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Selçuk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü,
2017-2021

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı,
2021-2024

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Doğuş Çay ve Gıda Maddeleri Üretim Pazarlama İthalat İhracat A.Ş. / Yaz Stajı

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Nar Sirkesine Eklenen Mikroenkapsüle *Saccharomyces boulardii* Mayasının Canlılığının Belirlenmesi / Icenss 4. Uluslararası Mühendislik ve Doğa Bilimleri Çalışmaları Kongresi / 24-25 Mayıs 2024 / Ankara.