

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TAHİL BAZLI FERMENTE SİNBIYOTİK
İNSTANT KARIŞIM: TATLI DENEMELERİ**

Özlem KARAGÜL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sedef Nehir EL

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.01.00

Sunuş Tarihi : 05.02.2015

Bornova-İZMİR

2015

Özlem KARAGÜL tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “**Tahıl Bazlı Fermente Sinbiyotik İstant Karışım: Tatlı Denemeleri**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 05.02.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Sedef Nehir EL

Raportör Üye : Prof. Dr. Sibel KARAKAYA

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nural KARAGÖZLÜ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Tahıl Bazlı Fermente Sinbiyotik İstant Karışım: Tatlı Denemeleri**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

05 / 02 / 2015

Özlem KARAGÜL

ÖZET**TAHİL BAZLI FERMENTE SİNBİYOTİK****İNSTANT KARIŞIM: TATLI DENEMESİ**

KARAGÜL, Özlem

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sedef Nehir EL

Şubat 2014, 88 sayfa

Bu tezde probiyotik ürün çeşitliliğini arttırmak amacıyla fermantasyondan yararlanılarak çorba, tatlı gibi gıda ürünlerinde kullanılabilir bir sinbiyotik toz formüle edilmiştir. Çalışmanın amacı yüksek çözünürlükte, kullanımı kolay, raf ömrü uzun alternatif gıda bileşeni geliştirmektir ve bu amaç doğrultusunda tahıl (yulaf, pirinç, buğday), yemiş (susam, turna yemişi, kestane) ve çimlendirilmiş taneler (yeşil mercimek, maş fasülyesi) haşlanmış ve probiyotik *Lactobacillus plantarum* ile fermente edilmiştir. Probiyotiklerin mide-bağırsak ortamındaki canlılığını arttırmak amacıyla yağsız süt tozu (YST) ve prebiyotik kaynağı olarak oligofruktoz(FOS)-inülin karışımı eklendikten sonra konvansiyonel ve dondurarak kurutma uygulanmıştır.

Dondurarak kurutulmuş ürün (D) ve konvansiyonel olarak kurutulmuş ürün (K) *in vitro* sindirime tabi tutulmuştur. Dondurularak kurutulmuş ürünün mide-bağırsak ortamındaki canlılığı, prebiyotik aktivitesi ve duyuşal kabuledilirliği değerlendirilmiştir. YST'nun kriyoprotektan etkisinin sonucu olarak D, YST ve prebiyotik içermeyen kontrol örneğine göre daha fazla canlı içerdiği tespit edilmiştir. Simüle mide-bağırsak koşullarına tabi tutulduktan sonra kontrol örneği ve D canlı hücre sayısının sırasıyla 2,42 log kob/g ve 3,35 log kob/g azaldığı bulunmuştur. Bu sonuç YST ve prebiyotiklerin ürüne eklenmesinin kalın bağırsağa ulaşan canlı hücre sayısını arttırdığını göstermiştir. Her iki örneğin prebiyotik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca D, yeni bir sinbiyotik fonksiyonel gıda oluşturmak için bir krem tatlı ile karıştırılmıştır (1,28 10⁷ kob/g porsiyon). Duyusal değerlendirmede panelistler tatlıyı kabul edilebilir olarak değerlendirmiştir.

Bunlara ek olarak ürünlerin sahip olduğu biyoaktif özellikleri analiz edilmiştir. D ve K için ADE inhibisyonu IC₅₀ değeri sırasıyla 8,29±0,20 µg protein/ml, 8,52±0,29 µg protein/ml ve rölatif safra bağlama kapasitesi sırasıyla %72,97±7,68, %80,33±7,57 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: fonksiyonel gıda, probiyotik, prebiyotik, sinbiyotik, fermantasyon, anjiotensin-dönüştürücü enzim, safra asidi

ABSTRACT**CEREAL-BASED FERMENTED SYNBIOTIC
INSTANT BLEND: A DESSERT PRACTISE**

KARAGÜL Özlem

MSc in Food Eng.

Supervisor: Prof. Dr. Sedef Nehir EL

February 2014, 88 pages

In this thesis, a synbiotic instant powder blend to use in soups, desserts, etc. was formulated by using fermentation in order to increase probiotic food product diversity. The aim of this study was to develop an alternative food ingredient, which was high soluble powder, easy to handle, shelf stable and prebiotic source. For this purpose, a mixture of cereals (oat, rice, wheat), nuts (sesame, cranberry, chestnut) and germinated grains (lentil, mung bean) were boiled and fermented with probiotic *Lactobacillus plantarum*. After addition of skim milk powder (SMP) in order to enhance viability of probiotics through gastrointestinal tract and oligofructose(FOS)-inulin mixture as prebiotic sources into the mixture, conventional drying and freeze-drying were performed.

Freeze-dried product (F) and conventional-dried product (C) were subjected to *in vitro* digestion. Viability of probiotic cells in gastrointestinal tract, prebiotic activity and sensorial acceptability of F was evaluated. Freeze dried product contained higher count of viable cells than that of control as a result of cryoprotectant effect of SMP. The count of viable cells of control and F were decreased 3,35 log cfu/g and 2,42 log cfu/g after simulated gastrointestinal conditions, respectively. These results indicated that SMP and prebiotic addition enhanced the count of survival cells that reached to large intestine. It was determined that both control and F had prebiotic activity. Also F was mixed with a cream dessert to obtain a novel synbiotic functional food (1,28 10⁷ cfu/g portion). According to result of sensory evaluation, panelists evaluated dessert as acceptable.

Moreover, bioactive properties of products were analyzed. IC₅₀ value for angiotensin-converting enzyme inhibition of F and C were determined as 8,29±0,20 µg protein/ml, 8,52±0,29 µg protein/ml, respectively and relative bile acid binding capacity of F and C were determined as 72,97±7,68%, 80,33±7,57%, respectively.

Keywords: functional food, probiotic, prebiotic, synbiotic, fermentation, angiotensin-converting enzyme, bile acid

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yardımını esirgemeyen, deneyim ve bilgi birikimiyle bana ışık tutan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sedef Nehir EL'e,

Her zaman yardım ve desteklerini hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sibel KARAKAYA'ya ve Arş. Gör. Şebnem ŞİMŞEK'e sabır ve özverileri için çok teşekkür ederim.

Çalışma için gerekli olan hammadde desteği sağlayan Artısan Gıda Sanayi Tic. Ltd. Şti.'ne teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan HPLC cihazının kullanımında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Emine NAKİLCİOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan arkadaşlarım Alper Tolga EKER ve Cansu ÖZEL'e özverileri için teşekkür ederim.

Hiçbir zaman yardım ve desteklerini esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Aslı KANCABAŞ KILINÇ, Gülay ÖNCÜ, Hülya İLYASOĞLU ve Nilüfer GİRGİN'e Yüksek Lisans eğitimime kattıkları anlam için ayrıca teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her anında olduğu gibi eğitim hayatımda da yanımda olan kıymetli aileme gösterdikleri sabır ve anlayış için sonsuz teşekkürler ederim.

Çalışmamı, hayatım boyunca her an maddi ve manevi destekçim olan sevgili kardeşim Ersan KARAGÜL'e ithaf etmek istiyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1 GİRİŞ	1
2 TAHIL BAZLI FERMENTE GIDALAR	3
2.1 Tahıllar ve Beslenme	3
2.2 Tahıl Bazlı Fermente Probiyotik Gıdalar	4
3 FERMANTASYON	9
3.1 Laktik Asit Bakterileri (LAB)	10
3.2 Laktik Asit Fermantasyonunda Gerçekleşen Biyokimyasal Değişiklikler	11
4 PROBİYOTİKLER	13
4.1 Probiyotikler ve Bağırsak Mikroflorası	18
4.2 Probiyotiklerin Sağlık Etkileri	19
4.3 Enkapsülasyon	22

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.3.1 Dondurarak kurutma/liyofilizasyon ile enkapsülasyon	25
4.3.2 Taşıyıcı/Kaplayıcı materyaller	26
5 PREBİYOTİKLER VE SİNBİYOTİKLER	29
6 MATERYAL VE YÖNTEM	31
6.1 Materyal	31
6.1.1 Hammaddeler	31
6.1.2 Probiyotik mikroorganizma	31
6.1.3 Kimyasal malzemeler	31
6.1.4 Kullanılan cihazlar	33
6.2 Yöntemler	33
6.2.1 Fermente sinbiyotik ürünün hazırlanması	34
6.2.2 Probiyotik ve prebiyotik özelliklerin değerlendirilmesi	36
6.2.3 İstant özelliklerin belirlenmesi	37
6.2.4 Duyusal değerlendirme	37
6.2.5 Fitik asit analizi	38
6.2.6 Safra asidini bağlama kapasitesi	39
6.2.7 <i>İn vitro</i> sindirim	40

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
6.2.8 Protein analizi	41
6.2.9 ADE inhibisyon aktivitesi	42
6.3 İstatistiksel Analiz	43
7 BULGULAR VE TARTIŞMA	44
7.1 Çimlendirme	44
7.2 Probiyotik ve prebiyotik özelliklerin değerlendirilmesi	45
7.2.1 Kriyoprotektan kullanımının liyofilizasyon işleminde canlılığa etkisi	46
7.2.2 Liyofilize tozun mikrobiyal yükünün <i>in vitro</i> koşullarda değişimi	47
7.2.3 Liyofilize tozun prebiyotik aktivitesi	49
7.3 İstant Özellikler	50
7.4 Duyusal Analiz	53
7.5 Fitik Asit Analizi	56
7.6 Safra Asidi Bağlama Kapasitesi	57
7.7 ADE İnhibisyon Aktivitesi	60
8 SONUÇ	63
KAYNAKLAR DİZİNİ	66
ÖZGEÇMİŞ	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1: Lactobacillus salivarius 118 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunması	14
6.1: Sinbiyotik toz karışımı üretimi akım şeması	33
6.2: Deneme planı	35
6.3: Sıralama testi değerlendirme formu	38
6.4: Fitik asit standart grafiği	39
6.5: Safra asidi standart grafiği	40
6.6: Bradford standart grafiği.....	41
7.1a: 72 saat çimlendirilmiş maş fasulyesi.....	44
7.1b:72 saat çimlendirilmiş yeşil mercimek.....	44
7.2: Mide bağırsak bölgesinin karakteristikleri (Cook et al., 2012)	47
7.3a: Tahıl bazlı fermente sinbiyotik instant toz	55
7.3b: Krem tatlı toz karışımı.....	55
7.4: %15 sinbiyotik toz içeren krem tatlı	55
7.5a: Substrat FAPGG'nin ADE hidrolizi sonucu oluşan ürünü FAP'ın inhibitör (sinbiyotik toz) yokluğunda sahip olduğu HPLC profilleri	61
7.5b: Substrat FAPGG'nin ADE hidrolizi sonucu oluşan ürünü FAP'ın inhibitör (sinbiyotik toz) varlığında sahip olduğu HPLC profilleri	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Potasyel probiyotik geleneksel gıdalar (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010).....	6
6.1: Sindirim sıvılarının bileşimi	41
7.1: Tohumların çimlendirme aşamalarındaki kütle değişimleri ve çimlenme oranları	44
7.2: Sinbiyotik tozlarda bulunan canlı <i>L.plantarum</i> sayısının sindirim sıvılarında inkübasyon sıradaki değişimi	46
7.3: Sinbiyotik tozların rekonstitüsyon özellikleri.....	51
7.4: Dört farklı oranda sinbiyotik toz içeren krem tatlıya uygulanan sıralama testi sonuçları	54
7.5: Fermantasyon ve sterilizasyon ile pH ve fitik asit miktarındaki değişim	56
7.8: Sinbiyotik tozların protein içerikleri ve ADE için IC ₅₀ değerleri.....	62

1 GİRİŞ

Son yıllarda tüketiciler artan bir şekilde kişisel sağlıklarıyla ilgilenirken gıdaların da sağlıklı ve hastalık önleyici özellikler taşımalarını bekler olmuştur. Probiyotik bakterilerin sağlığa katkılarının farkındalığının artmasına paralel olarak probiyotik gıda ürünleri gıda kültürü olarak giderek popüler olmaktadır (Ishibashi and Shimamura, 1993; Dolly et al., 2011). Probiyotikler, uygun miktarda tatbik edildiğinde konakçı üzerinde olumlu etkiler sağlayan, yaşayan mikroorganizmalardır (Kalliomaki et al., 2001; Brown and Valiere, 2004; Rivera-Espinoza et al., 2010). Birçok çalışma seçilen probiyotik suşlarının gıda ürünlerine eklenmesiyle gastrointestinal enfeksiyonlar, antimikrobiyal aktivite, laktoz metabolizmasını iyileştirme, serum kolesterolünü düşürme, bağışıklık sistemini uyarma, antitumöjenik özellikler, anti-karsinojenik özellikler, anti-dişaretik özellikler, iltihaplı bağırsak hastalığını iyileştirme ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonunu baskılamadaki sağlık yararlarını göstermiştir (Gomes and Malcata, 1999; Agerholm-Larsen et al., 2000; Gotcheva et al., 2002; Nomoto, 2005; Imasse et al., 2007; Shah, 2007; Rivera-Espinoza et al., 2010).

Geleneksel olarak probiyotikler yoğurt ve diğer fermente süt ürünlerine eklenmektedir (and Martin, 1991; Young, 1998; Hagen and Narvhus, 1999; Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001; Garcı'a-Fonta'n et al., 2006; Penna et al., 2007; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010Laröia). Günümüzde süt bazlı olmayan probiyotik ürünlere olan tüketici talebinde bir artış vardır ve bu mikroorganizmalar içeceklerle katıldığı kadar, tablet, kapsül ve dondurularak kurutulmuş preparatlar formunda (Örneğin Multibionta, Enterogermina, Reuterina, UltraLevure, Florastor) takviyeler olarak da marketlerde yer almaktadır (Vrese and Schrezenmeir, 2001; Berni-Canani et al., 2007; Guarner et al., 2012).

Gıda endüstrisi için süt ve süt ürünü içermeyen probiyotik ürünler geliştirilirken zengin doğal kaynaklardan yararlanma, yüksek kalitede fonksiyonel gıda üretme çabasında zorlayıcı bir etkidir olmaktadır (Prado et al., 2008; Granato et al., 2010; Nualkaekul et al., 2012). Bitki temelli gıdalar mineraller, vitaminler ve çeşitli antioksidanlar gibi fonksiyonel bileşenlerce zengindir ve yakın zamanda dünya tüketici nüfusunun büyük bir yüzdesi tarafından sıklıkla ve devamlı şekilde tüketilmektedir. Daha da fazlası bunlar hiçbir süt alerjisi içermemektedir (Wang et al., 2012).

Fermente gıdalar probiyotiklerin olumlu sağlık imajını güçlendirmek için çok uygundur, çünkü tüketiciler bunların canlı mikroorganizma içerdiği gerçeğine

aşınadır (Saxelin, 2000; Heller, 2001; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010). Batı dünyasında büyük çapta üretilen geleneksel tahıl bazlı gıda ve içeceklerin (ekmek, makarna ve biralar) dışında dünya çapında hak ettikleri bilimsel ilgiyi görmemiş çok çeşitli fermente ürünler vardır. Fermantasyondan sorumlu flora çoğu durumda yereldir ve LAB (Laktik Asit Bakterileri), maya ve/veya fungusları içerir. Benzer fermentasyon prosedürleri günümüzde, gelecekte de eğilimin devam edeceği gibi, sağlık özelliği kazandırılmış yeni gıdalar geliştirmekte kullanılmaktadır (Blandino et al., 2003).

Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotiklerin kanıtlanmış ve muhtemel sağlık yararları göz önünde tutulduğunda bunları içeren doğal ve doğala özdeş gıdaların tüketiminin yaygınlaştırılması sağlığı korumada ve gereksiz ilaç kullanımını önlemede etkili olabilir (Gülmez ve Güven, 2002). Probiyotikler üzerinde ileride yapılacak araştırmalarda probiyotik etkili bakterilerin detaylı olarak yararlarının ve vücut ile etkileşimlerinin net olarak ortaya konması sayesinde giderek riskli hale gelen antibakteriyel direnç oluşumuna karşı kullanılmasının yaygınlaşacağı bildirilmiştir (Guarner et al., 2012).

Bu çalışma kapsamında, fonksiyonel gıdalara artan ilgiye cevap olarak çorba, tatlı gibi gıda ürünlerinde kullanılacak yüksek çözünürlükte, kullanımı kolay, raf ömrü uzun sinbiyotik instant toz karışımı geliştirilmiştir. Bu amaçla tahıl-çimlendirilmiş bakliyat-kuruyemiş karışımı probiyotik *Lactobacillus plantarum* ile fermente edilmiş ve inülin-fruktooligosakkarit karışımı ile zenginleştirilmiştir. Probiyotiklerin mide-bağırsak ortamındaki canlılığı ve ürünün duyuusal kabuledilirliği değerlendirilmiştir. Bunlara ek olarak ürünün *in vitro* sindirimden sonra sahip olduğu anjiotensin dönüştürücü enzim inhibisyon aktivitesi ve safra bağlama kapasitesi analiz edilmiştir.

2 TAHIL BAZLI FERMENTE GIDALAR

2.1 Tahıllar ve Beslenme

Tahıllar insanlar için en önemli protein, karbonhidrat, vitamin, mineral ve lif kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir (Chavan and Kadam, 1989). Tam tane tahıllar ayrıca fitoöstrojen, fenolik maddeler, antioksidan, fitik asit ve steroller gibi birçok fitokimyasalların da kaynağıdır (Katina et al., 2007). Ancak süt ve süt ürünleriyle karşılaştırıldığında tahılların besleyici kalitesi ve fermente tahıl ürünlerinin duyuşal özellikleri daha zayıftır. Bunun arkasındaki sebepler ise düşük protein içeriğı, bazı zorunlu aminoasitlerin (Örn. treonine, lizin ve triptofan) noksanlığı, düşük nişasta yararlılığı, bazı antinütrientlerin (fitik asit, taninler, polifenoller) bulunması ve tanelerin doğal olarak sert, katı, kaba yapıda olması şeklinde sıralanabilir (Horn and Schwartz, 1961; Chavan and Kadam, 1989; Sanni et al., 1999; Blandino et al., 2003; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010).

Tahılların protein sindirilebilirlikleri, kısmen proteinleri bağlayarak sindirilmez yapan lif ve tanninleri bulundurmasına bağlı olarak, hayvansal ürünlerden daha düşüktür (Graham et al., 1980; Sanni et al., 1999). Buna rağmen güncel çalışmaların çoğı tahıl liflerinin antioksidan bileşiklerin guta taşınmasına yardımcı olan fonksiyonel bir bileşen olabileceğini de göstermektedir (Vitaglione et al., 2008; Wang et al., 2012).

Tahıllar dünya çapında en önemli mahsullerden biridir ve epidemiyolojik çalışmalar tahılları kalp damar hastalıkları, obezite, tip 2 diyabet ve bazı kanserler gibi kronik hastalık riskinin azalması ile ilişkilendirmiştir (Okarter and Liu, 2010; Wang et al., 2012). Tahıllar birçok yararlı fizyolojik etkisinin yanında önemli bir suda çözünür diyet lifi (β -glukan ve arabinoksilan gibi), oligosakkarit (galakto-ve frukto-oligosakkarit gibi) ve dirençli nişasta kaynağıdır. Bu nedenle prebiyotik olarak tanımlanabilecekleri öne sürülmektedir (Andersson et al., 2001; Shah, 2001; Okarter and Liu, 2010; Wang et al., 2012). Çeşitli yararlı etkilerine ek olarak sindirilemeyen karbonhidratlar kolonda bulunan *Lactobacilli* ve *Bifidobacteria türlerinin* gelişimini seçici olarak destekleyerek prebiyotik olarak işlev gösterir (Andersson et al., 2001; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010; Wang et al., 2012).

Karışık tahıl hamurları Asya ve Batı ülkelerinde geleneksel sağlıklı yemeklerdendir ve tahıl hamurlarının formülasyonu bölgeden bölgeye

değişmektedir (Wang et al., 2012). Çoğu gelişmekte olan ülkede, özellikle tropikal Afrika'da, yetişkin gıdaları kadar bebekleri süten kesme gıdaları da tahıllar, kökler, manyok ve patates yumrularından oluşan sabit yerel diyete dayanmaktadır. Küçük çocukların beslenmesine uygun olması için bu tahıllar büyük miktar su ile seyreltilerek sıvı formda hazırlanmaktadır. Bu da yüksek hacimde düşük enerji ve beslenme yoğunluğu ile sonuçlanmaktadır. Bu ürünler temel diyetle olmaya devam ettikçe, çabalar bu gıda ürünlerinin besleyici durumunu geliştirmek yönünde olması gerekmektedir (Sanni et al., 1999).

Tahılların besin kalitesini iyileştirmek amacıyla birçok yöntem uygulanmıştır. Protein kalitesini geliştirmek için amino asitler, protein konsantreleri ya da diğer gıda kaynaklarıyla (proteince zengin baklagiller veya yağı alınmış yağlı tane küspeleri) tamamlama veya takviye etme ve genetik iyileştirme gibi çeşitli metotlar uygulanmaktadır (Jansen, 1974; Campbell-Platt, 1994; Sanni et al., 1999; Blandino et al., 2003). Tahıllar lizin açısından yoksundur ancak sistein ve metiyonin açısından zengindir. Baklagiller ise lizin açısından zengin ancak kükürtlü amino asitler açısından fakirdir. Bu iki grubu kombinlemek bütün protein kalitesini artıracaktır (Blandino et al., 2003; Campbell-Platt, 1994). Bunun yanı sıra pişirme, çimlendirme, öğütme ve fermantasyon işlemleri uygulanmış ve en etkili protein kalitesini artırma yönteminin fermantasyon olduğu görülmüştür (Mattila, 1998; Blandino et al., 2003).

Günümüzde çimlendirme ve fermantasyon tahılların protein kalitesini iyileştirme yolları olarak kabul edilmektedir. Gıdaların fermantasyonu en eski ve en ekonomik gıda işleme metotlarından biridir ve bu çoğunlukla gıdaların mikrobiyal proteinler, amino asitler, yağlar ve vitaminler açısından beslenme değerlerinde gelişme sağlar (Lorri, 1993; Sanni et al., 1999).

2.2 Tahıl Bazlı Fermente Probiyotik Gıdalar

Fermente ürünlerden dünya çapında renklendirici, baharat, içecek, kahvaltılık, hafif yemek olduğu kadar ana yemek olarak da yararlanılmaktadır. Fakat bu gıdaların mikrobiyolojisi biraz karışık ve belirsizdir. Çoğu kendi doğasından kaynaklı maya, bakteri ve fungusların karışımını içermektedir. Bu mikroorganizmalar paralel şekilde ya da fermantasyon süreci boyunca dominant floranın değişmesi şeklinde aktivite gösterebilir (Steinkraus, 1998). Soya sosu gibi büyük ticari skalada üretilen ürünlerin yanında ev çapında üretilen birçok fermente ürün vardır (Blandino et al., 2003).

Blandino et al.'nın (2003) yaptığı derlemeye göre dünya genelinde çoğu Afrika ve Asya'da üretilen çeşitli tahıl bazlı gıda ve içecekler şu şekildedir: Pirinç bazlı yerel fermente gıdalar: idli, dosa, dhokla; buğday bazlı geleneksel fermente gıdalar: soya sosu, kishk, tarhana; mısır bazlı geleneksel fermente gıdalar: ogi, kenkey, pozol; sorghum bazlı geleneksel fermente gıdalar: injera, kisra; geleneksel tahıl bazlı fermente içecekler: biralar, sake, bouza, chicha, mahewu, boza. Yüzyıllardan beri fermantasyon koruma, tahılların, meyvelerin, sebzelerin, baklagillerin ve etin aromasını modifiye etme ya da kalitesini iyileştirme için kullanılmaktadır. Fermantasyon prosesinin maya, LAB ve mantarların karışık kültürlerini içermesinden dolayı (Blandino et al., 2003; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010), geleneksel fermente gıdalar mikroorganizmaların bereketli bir kaynağıdır ve bunlardan bazıları probiyotik karakteristikler göstermektedir (Bkz. Çizelge 2.1).

Tarih boyunca insan beslenmesi için çok çeşitli süt bazlı olmayan fermente tahıl ürünü oluşturulmuştur ancak geleneksel fermente tahıl gıdalarında bulunan mikroorganizmaların probiyotik karakterleri sadece günümüzde rapor edilmektedir (Gotcheva et al., 2002; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010; Gupta and Abu-Ghannam, 2012; Wang et al., 2012). “Probiyotik” terimi sindirildiğinde sağlık durumunu geliştiren ve/veya konakçılarının mikrobiyal dengesini geliştirmesiyle onları faydalı şekilde etkileyen, tek ya da karışık canlı mikroorganizma kültürleri içeren ürünleri tanımlar. Tahıl bazlı fermente gıdalardaki LAB antimikrobiyal etkilerine karşın bu mikroorganizmaların ve ürünlerinin yeni probiyotik gıda üretimi için kullanımı da yeni bir trenddir (Salovaara, 1996; Blandino et al., 2003).

Tahılların fermantasyonu son ürünün raf ömrünü, tekstürünü, tat ve aromasını geliştirir. Bunun yanında tahıllar fonksiyonel gıda üretiminde başka bir alternatif sunmaktadır. Probiyotik gıda üretimi için kompleks yerel kültürlerle fermente edilmiş tahıl içeren gıdaların geliştirilmesi, çoğu durumda, potansiyel probiyotik özellikler taşıyan LAB için ulaştırma/taşıma aracı olarak tahıl bazlı substratlar sağlar (Gupta and Abu-Ghannam, 2012; Wang et al., 2012). Ancak bu matrislerin probiyotik mikroorganizmalar için hammadde olarak değerlendirildiği araştırmalar, süt ürünü muadilleriyle karşılaştırıldığında hala kısıtlıdır (Kedia et al., 2007; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010). Probiyotiklerin yararlı sağlık etkilerini belgeleyen kanıtlar artmaktadır. Bununla birlikte probiyotiklerin ürün geliştirmede ve fermente gıdaların probiyotik karakteristiklerinde kullanımı hakkında çalışmalarda eksiklik vardır (Rivera-Espinoza et al., 2010).

Çizelge 2.1: Potasyel probiyotik geleneksel gıdalar (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010)

Ürün	Probiyotik mikroorganizmalar	Substratlar
Adai	LAB	Tahıl, baklagil
Agbelime	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Leuc. Mesenteroides</i>	Manyok
Atole	LAB	Mısır
Ben-Saalga	LAB	İnci darısı
Boza	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranum</i>	Tahıl
Dosa	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>S. Cerevisiae</i>	Pirinç ve nohut
Idli	<i>Leuc. mesenteroides</i> , LAB, maya	Tahıl, baklagil
Ilambazi	LAB	Mısır
Lokubilisa		
Kecap	LAB	Buğday, soya fasülyesi
Kenkey	<i>L. casei</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. casei</i> , maya	Mısır
Kimchi	<i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. sake</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	Sebze
Kishk	LAB	Tahıl ve süt
Kisra	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. brevis</i>	Süpürge darısı
Koko	<i>L. fermentum</i> , <i>L. salivarius</i>	Darı
Mahewu	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. serevis</i>	Mısır
Mawe	<i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Mısır
Ngari	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>L. fructosus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> , and <i>L. plantarum</i>	Balık
Ogi	<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Mısır
Sauerkraut	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , LAB	Lahana
Som-Fug	LAB	Balık
Tarhana	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. Plantarum</i>	Yarı haşlanmış buğday lapası ve yoğurt
Tempeh	LAB, <i>L. Plantarum</i>	Soya fasülyesi
Uji	LAB	Mısır, manyok, süpürge darısı

Tahılların, bazı probiyotik bakterilerin gelişimi için uygun substrat olduklarını göstermek amacıyla çalışmalar yapılmaktadır (Martenson et al., 2002; Angelov et al., 2006; Trachoo et al., 2006; Kedia et al., 2007; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010). Pirinç, Asya'daki temel tahıldır ve pirinç ürünleri probiyotik gıda geliştirmek için ekonomik ve yararlı bir matris olabilir. Tahılların besleyici seviyesini arttırmak için fermantasyonun kullanılması çok yaygındır. Tahılların beslenme kalitelerini ve biyoaktif bileşiklerini arttırmak için diğer bir metot ise çimlendirmedir. Çimlendirme ile protein, amino asit, şeker ve vitamin içeriği artar, bu da probiyotik bakterilerin gelişimi için gereklidir (Trachoo et al., 2006; Rivera-Espinoza et al., 2010).

Tarhana ve Kishk, bazı probiyotik aktivitelere sahip LAB içeren geleneksel fermente süt-tahıl karışımlarıdır. Hatta tarhana en eski probiyotik gıdalardan biri olarak kabul edilmektedir (Ozdemir et al., 2007). Bu tahıl bazlı ürünler çoğu ülkelerin beslenmesi için önemli olması nedeniyle kayda değerdir (Tamime and McNulty, 1999; Blandino et al., 2003; Erbas et al., 2006; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010).

Bir fermente tahıl bazlı geleneksel Bulgaristan içeceğinden izole edilen *L. plantarum*, *Candida rugosa* ve *Candida lambica* suşlarının probiyotik özellikler ve gastrointestinal sistemden geçişi sırasında safra zehirlenmesine karşı canlılığını sürdürmesine olanak sağlayan %2 safra tuzu konsantrasyonuna iki saat kadar dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir (Gotcheva et al., 2002).

Bu mikroorganizmaların hayatta kalmalarıyla, fermantasyon kriterleriyle, starter kültür olarak kullanılmalarıyla ve diğer mikroorganizmalarla ilişkileriyle ilgili sorunlar hakkında az bilgi vardır (Kedia et al., 2007; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010). Geleneksel fermente tahıllar ve bilimsel araştırmalardan sağlanan bilgi, gıda endüstrisi için laktöz intoleransı ve kolesterol içeriği sakıncalı olduğu, özel nedenlerle süt ürünlerinin sindirmediği ya da süt ürünlerinin ulaşılamaz olduğu zamanlarda ve gelişmiş ülkelerde vejetaryenliğin artması nedenine bağlı olarak yeni probiyotik gıdalar geliştirilmesine yardımcı olabilir (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010; Wang et al., 2012).

Probiyotik olarak kabul edilen yosa gibi tahıl bazlı fermente gıdalar mevcuttur. Diğer geleneksel tahıl bazlı fermente gıdalar bazı hastalıkların kontrolüne yardım için modifiye edilmiştir. Örneğin Ogi'nin iyileştirilmiş hali

Doğik bazı diyarejenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip LAB starter kullanılarak geliştirilmiştir (Okagbue, 1995; Blandino et al., 2003).

3 FERMANTASYON

Fermente gıdalar insanların tarıma başladığı çağdan itibaren tükettiği en önemli gıdalardan birisi olmuştur. Fermantasyon ve fermente ürünler binlerce yıl önce tesadüfen keşfedilmesine rağmen M.Ö. 8500-4000 yıllarında Mezopotamya’da şarap ve peynir üretimi yapıldığını gösteren tasvirler bulunmuştur. Fakat fermantasyon olayının nasıl gerçekleştiği son 150-200 yıl içinde mikroorganizmaların ve enzimlerin keşfedilmesiyle açığa kavuşmaya başlamıştır (Caplice and Fitzgerald, 1999; Blandino et al., 2003; Erkaya ve Kabak, 2010). Mikroskopun gelişmesiyle bira ve şarap gibi fermente içeceklerde maya hücreleri fark edilmiştir. Bu sürecin sonunda 1857 yılında Louis Pasteur’un “fermantasyon etmeninin canlı maya hücreleri” olduğunu açıklaması fermantasyon mikrobiyolojisinin bilimsel olarak anlaşılmasındaki ilk adım olmuştur. İkinci adım ise 1907 yılında Nobel Kimya ödülünü kazanan Eduard Buchner’in, mikroorganizmaların yanında “zimaz” adı verilen ve mikroorganizmaların parçalanmasıyla açığa çıkan öz suyunun da fermantasyon gücüne sahip olduğunu bulmasıdır. Zimaz alkol dehidrojenaz, pirüvat dekarboksilaz, hekzokinaz, glukoz fosfat izomeraz, pirüvat kinaz, enolaz, fosfofrüktokinaz, aldolaz gibi enzimlerinin karışımıdır. Fermantasyonun bilimsel temelleri kurulduktan sonra, fermantasyonun gerçekleşmesini sağlayan mikroorganizmaların tanımlanması ve saf kültür elde etme çalışmaları başlamıştır (Erkaya ve Kabak, 2010). 1850’lerden itibaren fermantasyon prosesinin anlaşılmasıyla endüstriyel fermantasyon yapımı artmış ve dünyada bilimsel çalışmalar yürütülmeye başlanmıştır (Hirahara, 1998; Blandino et al., 2003).

Fermantasyon en eski ve en ekonomik gıda üretim ve muhafaza yöntemlerinden biridir (Blandino et al., 2003). Dünya genelinde genel olarak dört ana fermantasyon prosesinden yararlanılmaktadır: alkolik, asetik asit, alkali ve laktik asit fermantasyonu. Laktik asit fermantasyonu LAB’nin aktivitesi ile oluşmaktadır (McKay and Baldwin, 1990; Blandino et al., 2003; Erkaya ve Kabak, 2010). Hammaddelerdeki bazı bileşiklerin parçalanması ve değişik organik asitlerin üretilmesi sonucu pH’nın düşmesi laktik asit fermantasyonunun karakteristik özellikleridir. Günümüzde ticari ürünlerde kullanılan probiyotik LAB’nin çoğu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* ve *Streptococcus* cinslerinin üyeleridir (Leroy and Vuyst, 2004; Wang et al., 2012;).

3.1 Laktik Asit Bakterileri (LAB)

Fermente gıdaların üretiminden sorumlu olan mikroorganizmalar söz konusu substratta hali hazırda bulunur ya da starter kültür olarak eklenebilirler (Harlander,1992; Blandino et al., 2003). Yaygın fermantasyon bakterileri *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* ve *Bacillus* türlerine aittir. *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Trichothecium* cinslerine ait funguslar ve alkolik fermantasyon yapan *Saccharomyces* türü mayalardır (Steinkraus, 1998; Blandino et al., 2003). Fermente gıdalarda gelişen bakteri türü su aktivitesi, pH değeri, tuz konsantrasyonu, sıcaklık ve gıda matrisi kompozisyonuna göre değişmektedir (Blandino et al., 2003).

Batı dünyasında yaygın olan majör ürünler dahil çoğu fermente gıdanın fermantasyon prosesi LAB'ne bağlıdır (Conway,1996; Blandino et al., 2003). Aguirre ve Collins'e (1993) göre LAB terimi genellikle hareketsiz, patojenik olmayan, toksijenik olmayan, karbonhidratları fermentasyonda kullanan ve son ana ürün olarak laktik asit üreten gram-pozitif, katalaz-negatif, spor üretmeyen, çubuk ve kokların geniş bir grubunu tanımlamak için kullanılmaktadır (Vries et al., 2006; Guarner et al., 2012). Hekzosları metabolize döngüsüne göre iki gruba ayrılır: Homofermantatif ve heterofermantatif. *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* ve bazı *Lactobacilli* gibi homofermantatifler glikoz fermantasyonu sonucu tek ana ürün olarak laktik asit üretir. *Weisella*, *Leuconostoc* ve bazı *Lactobacilli* gibi heterofermantatifler ise glukozdan ekimolar kaltet, CO₂ ve etanol üretir (Aguirre and Collins, 1993; Blandino et al., 2003).

Laktik asit fermantasyonu geniş yelpazede tahıl bazlı gıdaların güvenilirliği, besleyici değeri, raf ömrü ve kabul edilebilirliğine katkıda bulunmaktadır (Oyewole, 1997). Bu fermantasyonların çoğunda tahıl taneleri temizlendikten sonra birkaç gün suda ıslatıldığında arka arkaya doğal olarak meydana çıkan mikroorganizmalar en sonunda LAB tarafından domine edilir. Bu tür fermantasyonlarda endojen tahıl amilazları LAB için enerji kaynağı teşkil eden fermente edilebilir şekerler oluşturur (Nout and Motarjemi, 1997; Blandino et al., 2003).

LAB'nin en büyük grubu 50 farklı tür bulunduran *Lactobacillus* türüne aittir. *Lactobacillus* türleri insan ve hayvan bağırsağında bulunmaktadır ve sayısı hayvanın türüne, yaşına ya da bağırsaktaki lokasyon bölgesine göre değişmektedir. Ancak sadece az bir *Lactobacillus* türü hem geleneksel ve

endüstriyel fermantasyonda ortaya çıkmakta hem de insan bağırsağında ikame etmektedir. Bunlar *L.crispatus*, *L.gasseri* ve *L.plantarum*'dur (Cataloglu and Gogebakan, 2004; Vries et al., 2006).

3.2 Laktik Asit Fermantasyonunda Gerçekleşen Biyokimyasal Değişiklikler

Fermantasyon istenmeyen bileşenlerin yok edilmesine, besleyici değerin artırılmasına ve daha güvenli ürünlerin elde edilmesine doğal bir yol sağlamaktadır (Simango, 1997; Blandino et al., 2003). Fermantasyon ayrıca raf ömrü, tekstür, tat ve son ürünün aroması üzerinde genel bir gelişmeye yol açar. Fermantasyon sırasında üründe iştah açıcı olabilen aroma karışımlarına neden olan çeşitli uçucu bileşikler oluşur (Chavan and Kadam, 1989).

Bazı tahıl ürünlerinde laktik fermantasyon teknolojisinin koruyucu rolü kanıtlanmıştır. LAB'nin antibiyozis etkinliği asitlerin, hidrojen peroksit ve antibiyotiklerin üretilmesinden kaynaklanmaktadır. Organik asitlerin üretilmesi pH değerini 4,0'ün altına düşürerek tahıllarda bulunan bozulmaya sebep olan mikroorganizmaların yaşamasını zorlaştırır (Daly, 1991; Blandino et al., 2003).

Organik asit üretme yetilerinden ayrı olarak LAB, oksijen ile hızla reaksiyona giren indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) 'i flavin nükleotitler ile okside ederek hidrojen peroksit üretme yetisine sahiptir (*NADH*, *NAD+*'nin indirgenmiş halidir, dolayısıyla *NAD+* de *NADH*'nin yükseltgenmiş (okside olmuş) halidir). Bu yol ile hidrojen peroksit parçalanmasını azaltarak birikmesine ve sonucunda bazı mikroorganizmalara karşı inhibe edici ortam oluşmasına neden olur (Caplice and Fitzgerald, 1999; Blandino et al., 2003).

Laktik asit fermantasyonunun bir diğer avantajı ise LAB içeren fermente ürünlerin virüsidal ve antitümör etkiye sahip olmasıdır (Esser et al., 1983; Oberman and Libudzisz, 1996; Seo et al., 1996; Blandino et al., 2003).

Diğer taraftan, laktik asit fermantasyonu sonucu tanin seviyesi azalabilir ve bu, bazı tanen zengini tahıllar hariç, demirin absorpsiyonun artmasını sağlar (Nout and Motarjemi, 1997; Blandino et al., 2003). Fermantasyon ayrıca fitatın bozulması için optimum pH koşullarını sağlar ve (LAB'nin önemli bir gelişim faktörü olan) manganez, demir, çinko, kalsiyum gibi mineralleri serbest bırakır (Blandino et al., 2003; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010).

Fermantasyonun protein ve amino asit miktarı üzerine etkisi ise bir tartışma konusudur. Çeşitli çalışmalar sonucu görülmüştür ki gıdaların besin içeriği üzerine fermantasyonun etkisi değişkendir fakat iyileştirmesi mutlakdır (Blandino et al., 2003). Fermantasyonun bazı sindirilemeyen poli ve oligosakkaritler gibi karbonhidratların seviyesini azalttığı, protein kalitesini ve lizin seviyesini geliştirdiği öne sürülmüştür; dahası da bazı amino asitler sentezlenebilir ve B grubu vitaminlerin biyoerişilebilirliği gelişebilir (Blandino et al., 2003; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010; Erkaya ve Kaya, 2012). *Lactobacillus* cinsinin çoğalması için fermente edilebilir karbonhidratlar, aminoasitler, B vitaminleri, nükleik asitler ve mineraller gereken kompleks mikroorganizmalar olarak tanımlanır (Gomes and Malcata, 1999; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010) ve bu nedenle tahılların fermantasyonu yararlı mikroorganizmaların gelişimini devamlılığını sağlayacak zengin substrat sağlamanın ucuz bir yolunu temsil edebilir (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010).

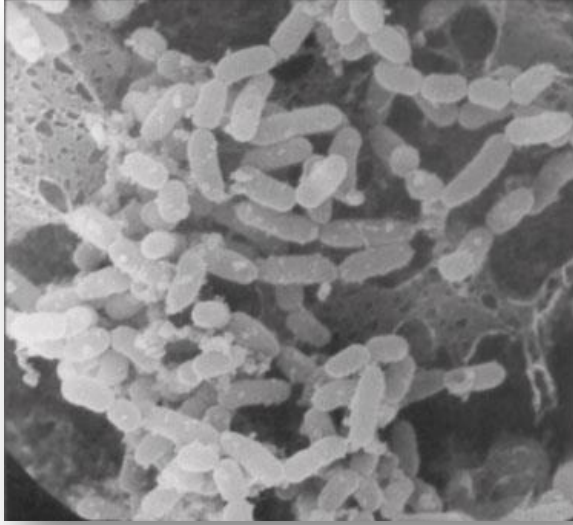
ADE inaktif bir dekapeptit olan anjiyotensin I'i kuvvetli bir damar daraltıcı olan oktapeptit anjiyotensin II'ye dönüştürerek arteriyel kan basıncı modüle eder (Skeggs et al., 1957; Torino et al., 2013). Ayrıca ADE önemli damar genişletme aktivitesine sahip bradikininini bozmaktadır. Hayvan ve insan deneylerinde ADE'nin doğal veya sentetik inhibitörlerle inhibisyonunun kan basıncını düşürdüğü görülmüştür (Hong et al., 2008; Torino et al., 2013). Fermantasyon sırasında mikrobiyal proteazlar ya da tohumlardaki organellerin içindeki özel protein gövdelerinden gelen proteazlar tarafından ADE inhibisyon aktivitesi olan biyoaktif peptitler serbest bırakılabilir (Müntz et al., 2001; Torino et al., 2013). Torino et al. (2013)'nin yaptığı çalışmada 200 g/l oranında su ile karıştırılan mercimekler 350 rpm 37°C'de 96 saat *L.plantarum* ile fermente edildikten sonra elde edilen mercimek ekstraktının inhibisyon değeri % 67,5'tan %93'e yükseldiği gözlemlenmiştir. IC₅₀ değeri ise 0,20 mg protein/ml olarak bulunmuştur ve önceki çalışmada (Boye et al., 2010) elde edilen mercimek ekstraktın IC₅₀ değeri (0,44 mg protein/ml) ile karşılaştırıldığında ümit verici potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

4 PROBİYOTİKLER

Mevcut bilimsel mutabakata rağmen, "Probiyotik" teriminin hiçbir yasal tanımı yoktur (Guarner et al., 2012). Probiyotik terimi ilk 1965'de Lilly ve Stillwell tarafından antibiyotiklerin aksine diğer mikroorganizmaların gelişimini uyaran mikrobiyal türevli faktörler olarak tanımlanmıştır. Roy Fuller 1989 yılında "konakçı hayvanın bağırsak dengesini düzelteren canlı mikroorganizma içeren yem" diyerek probiyotikler için canlılık ihtiyacını vurgulamış ve konakçı üzerinde faydalı bir etkiye sahip olduğu fikrini ortaya atmıştır (Gülmez ve Güven, 2002; Guarner et al., 2012). Probiyotik terimi 1992 yılında Havenaar ve Huis in't Veld tarafından "insan ve hayvanda yararlı mikrofloranın yararını arttıran tek veya karışık canlı mikroorganizma kültürü" olarak genişletilmiştir. Son olarak 1998 yılında Guarner ve Schaafsman tarafından "sağlıklı yaşamayı temin etmenin ötesinde belirgin bir sağlık kazancı sağlayan belirli sayıdaki canlı mikroorganizma" olarak tanımlanmıştır (Gülmez ve Güven, 2002).

Probiyotik bakteriler gram pozitif ve anaerob olup patojen değildirler (Sarica, 1999). Çoğu probiyotik mikroorganizmalar *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinsine aittir ama *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* ve *Propionibacterium* cinsine ait bazı türler de sahip oldukları sağlıklı etkileri nedeniyle probiyotik kabul edilmektedir (Sanders and Huis in't Veld, 1999; Blandino et al., 2003; Vinderola and Reinheimer, 2003; Rivera-Espinoza et al., 2010). Çoğu probiyotik suşları insan bağırsaklarından izole edilmiştir ve en önemlileri LAB grubuna aittir (Blandino et al., 2003). Ayrıca *Lactobacillus* bakteriler mide pH'sına en fazla dayanıklı olan ve sindirim kanalından geçiş esnasında canlılıklarını koruyabilen bakterilerdir (Yalçın vd., 1996; Sarica, 1999).

Bifidobakteriler insan ve hayvan gastrointestinal sisteminin doğal sakinleridir bu nedenle ağız ve dışkıda bulunmaları şaşırtıcı değildir. Yeni doğanların bağırsak sisteminde doğumdan sonra günler içinde *Bifidobakteriler* bağırsakta kolonize olur ve popülasyonu yaştan, beslenme diyetinden, antibiyotiklerden ve stressten etkilenir. Bu mikroorganizmaların etkinliği bağırsak sisteminde kolonize olabilme ve istenmeyen bağırsak bakterilerini kontrol etme yeteneği ile ilgilidir ancak bütün izole *Bifidobakteriler*'de bakteriyel tutunma ve bağırsakta canlılığını sürdürme özelliği görülmemektedir. Probiyotik olarak kullanılan bazı bifidobacterium kültürleri *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis* ve *B. breve*'dir (Rivera-Espinoza et al., 2010). Bu mikroorganizmalar, bağırsak mikrobiota dengesini geliştirerek ve patojenlere karşı mukozal savunmayı



Şekil 4.1: Lactobacillus salivarius 118 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunması

güçlendirerek insan sağlığına yarar sağlamaktadır (Boylston et al., 2004; Fritzen-Freire et al., 2012).

LAB hücre yapıları ve glikozu fermente etmekte kullandıkları yol ile sınıflandırılır. Yaygındırlar, doğal ortamları çoğu bitkilerdir ve mide-bağırsak mikroflorasının bir bölümünü oluştururlar (Abadias et al., 2008; Rivera-Espinoza et al., 2010). Bu bakteriler geleneksel fermente gıdalarda bulunmaktadır ve kontrollü fermantasyon ile gıda üretiminde kullanılmaktadır. LAB ana metabolit olarak laktik asit üreten homofermantatifler ve bunun yanında etanol ve karbondioksit üreten heterofermantatifler olarak ikiye ayrılır. Fermente gıdalardan izole edilen bazı LAB suşları mide-bağırsak koşullarında barınmak için dayanıklılığı, bağırsak epitelyumuna tutunabilmesi ve hayvan ince bağırsağında patojen bakterilerin gelişimi ya da istilasını önlemeleri nedeniyle probiyotik olarak kullanılmaktadır (Vries et al., 2006; Chiu et al., 2007; Rivera-Espinoza et al., 2010). LAB fermente edilebilir şekeri, pH'yı düşürerek ürünün karakteristiklerini değiştiren ve hem gıda ürünü hem de insan bağırsak sistemi mikroflorasında olası patojen mikroorganizmaların gelişimi için elverişsiz koşullar yaratan, laktik asit, etanol ve diğer metabolitlere dönüştürebilme yetenekleri nedeniyle gıda endüstrisi için önemlidir. En önemli LAB *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Pediococcus*'tur. *Lactobacillus acidophilus* sağlıklı bir insanın bağırsak bölgesindeki baskın laktobasillerdir. Bu yüzden probiyotik ürünlerde çoğunlukla bu mikroorganizma kullanılmaktadır (Arihara et al., 1998; Rivera-Espinoza et al., 2010).

Morelli'ye (2000) göre yapılan yayınlarda bilim adamları arasında bir potansiyel probiyotik *Lactobacillus* suşunun sahip olması gereken özellikleri üzerinde genel hatlarıyla bir çeşit anlaşmaya ulaşıldığı görülmektedir. Suşun insanlar için etkili ve yararlı bir probiyotik olarak seçilmesi için şu özellikleri taşıması gereklidir;

- a) Suşun orijini; orijin ile uygulanan kaynağın aynı olması adaptasyonu kolaylaştırılabilir.
- b) Güvenlik; suşun antibakteriyel direnci nakletmeyeceği konusunda güvenli olması gerekmektedir.
- c) Yaşama kalıbiyeti; suşun yaşama kabiliyetini belirleyen adezyon yeteneğinin güçlü olması ile asit ve safra ortamına direncinin iyi olması gerekmektedir.
- d) Dayanıklılık; sindirim sisteminde meydana gelen olaylardan etkilenmemelidir.
- e) Duyusal özellikleri; gıdalara ilave edildiğinde kaliteyi düşürmemelidir.
- f) Mikrobiyolojik özellikleri; mide-bağırsak mikrobiyotada yaşayabilmelidir.
- g) Tüketici üzerindeki etkileri; bağırsakta kanamaya neden olmamalı veya bağırsak doğal geçirgenliğini bozmamalıdır.
- h) Tutunma; bağırsağa tutunma ve bağırsakta yaşama kabiliyeti iyi olmalıdır.
- i) Patojen üzerine etkisi; ürettikleri asit veya bakteriosin yardımıyla veya kompetitif etkiyle patojenler üzerinde inhibitör etki yapmalıdırlar.
- j) Metabolik aktivite düzenleme; örneğin prokarsinomayı inaktive etme gibi özellikleri bulunmalıdır.
- k) İmmunomodülasyon; gıda alerjenlerine ve patojenlere karşı savunmayı güçlendirebilmelidir (Gibson and Fuller, 2000).

- 1) Olumlu etkilerinin başlaması birkaç gün ya da haftadan daha çabuk olmalı, antibiyotiklerle alındıklarında etkilerini sürdürebilmelidirler (İnanç vd., 2005).

In vivo ya da *in vitro* çalışmalar sonucunda mide ve bağırsağın aşırı koşullarına (asit, safra, enzim, düşük seviyede oksijen) dayanıklılık, mide-bağırsak mukozasına tutunma yeteneği ve patojenlerin yarışçı dışlama probiyotik seçimi için geçerli kriterler olmuştur (Sanders and Huis in't Veld, 1999; Schillinger et al., 2005; Collado et al., 2008).

Probiyotiklerin besinsel kaynakları *Lactobasiller*, *Bifidobacteriler*, *Enterococcus*, *Streptococcus*'ların kullanıldığı fermente yoğurtlar, peynir, turşu, çiğ sucuk, ekmekek, bira, şarap, kıymız ve kefir (İnanç vd., 2005). Ticari probiyotik preparatları canlı bakteri, mantar, maya ve maya kültürleri ile çeşitli enzimleri içermektedir. Bu preparatlar sadece bir mikroorganizma suşundan oluştuğu gibi karışık flora da içermektedirler (Fuller, 1989; Yalçın vd., 1996). Collins and Gibson'a (1999) göre de etkili bir probiyotik gıda ürünü şu nitelikte olmalıdır;

- a) Konakçıya, bir gıdadan daha fazla yarar sağlamalıdır.
- b) Patojen mikroorganizma içermemeli ve toksik olmamalıdır.
- c) Yüksek sayıda canlı etken içermelidir.
- d) İçerdiği canlı etkenler bağırsakta yaşama ve metabolize edici yetenekte,
- e) Benzer konakçıdan (Örneğin insan) elde edilmiş olmalıdır ve
- f) Depolama ve kullanma süresince canlı kalmalıdır.
- g) İyi duyuşsal nitelikte olmalıdır (Gülmez ve Güven, 2002).

Probiyotikler için gerekli genel bir doz belirtmek mümkün değildir; bu doz insan üzerinde sağlık yararları gösteren çalışmalara dayanmak zorundadır (Guarner et al., 2012). Probiyotiklerin işlevselliği ile ilgili olarak yararlı etki göstermesi için canlı ve ürünün gramında tipik olarak en az 10^8 - 10^9 gibi yüksek bir konsantrasyonda mevcut olması gerekmektedir (Shah, 2001) ancak yakın zamanda ölü hücrelerin de yararlı immünolojik etkileri üzerine ikna edici veriler vardır (Vinderola and Reinheimer, 2003; Mottet and Michetti, 2005; Adams, 2010; Rivera-Espinoza et al., 2010; Kent et al., 2014). Bununla birlikte probiyotik

gıda ürünlerinin terapötik olarak etki etmesi için, raf ömrünün sonuna kadar en az 6 log kob/g bakteri içermesi gerektiği öne sürülmektedir (Talwalkar et al., 2004; Fritzen-Freire et al., 2012). Bu bağlamda son zamanlarda probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu, fonksiyonel gıda ürünlerinin içindeki probiyotik mikroorganizmaların stabilitesini arttırmak için bir metot olarak giderek artan bir ilgi çekmektedir (Anal and Singh, 2007; Semyonov et al., 2010; Fritzen-Freire et al., 2012). Dahası Ding and Shah'a (2009) göre mikroenkapsülasyon bu mikroorganizmaların işleme ve depolama sürecinde ve hatta insan mide-bağırsak bölgesinden geçişte canlılığını geliştirebilir.

Probiyotik karışımlarda kullanılan çoğu bakteri, insan bağırsak mikroflorasına uyumluluk olasılığını maksimize etmek ve canlı kalma şansını arttırmak için insan dışkısından izole edilmiştir (Andersson et al., 2001; Rivera-Espinoza et al., 2010). Yine de *in vitro* çalışmalarda süt ürünü içermeyen fermente gıdalardan izole edilen mikroorganizmalar da bu özellikleri göstermiştir.

Charalapompoulos et al. (2002) farklı tahıllarla ve *L.plantarum*, *L.fermentum*, *L.acidophilus* ve *L.reuteri* ile yaptığı çalışmada, malt bulunan ortamın kimyasal kompozisyonundan dolayı arpa ve buğday bulunan ortamlardan daha iyi desteklediğini saptamıştır. Bunun yanında *L.plantarum* ve *L.fermentum*'un diğerlerine göre daha kolay geliştiğini ve asidik koşullara daha dayanıklı olduğunu belirlemiştir. Ayrıca 2003'de yaptığı çalışmada asidik koşullarda (pH 2,5) arpa ve buğday ekstraktlarının *L.plantarum*, *L.acidophilis* ve *L.reuteri* canlılığını belirgin koruyucu bir etki gösterdiğini belirlemiştir (Charalapompoulos et al., 2003).

Probiyotik bakteriler genellikle marketlerde fermente gıdaların içinde yer almaktadır ve süt ürünleri probiyotiklerin taşıyıcısı olarak hakim role sahiptir (Heller, 2001; Rivera-Espinoza et al., 2010). Bu mikroorganizmaları verimli bir şekilde taşımak amacıyla, probiyotik bakterilerin fermente olmamış gıda matrislerinde ve süt içermeyen ürünlerdeki canlılığı çalışılmıştır (Örneğin Sheehan et al., 2007). Bunun yanında fermente gıdalar probiyotiklerin olumlu sağlık imajını güçlendirmek için çok uygundur çünkü tüketiciler bunların canlı mikroorganizma içerdiği gerçeğine aşınadır (Saxelin, 2000; Heller, 2001; Rivera-Espinoza et al., 2010).

4.1 Probiyotikler ve Bağırsak Mikroflorası

Mide-bağırsak normal florası doğumda sterilken, yeni doğan döneminde kazanılmakta ve yaşam boyu sabit kalmaktadır (İnanç vd., 2005). Doğumdan sonra ikinci ve beşinci günlerde oluşan *Bifidobacteriler* birinci haftadan sonra dışkı florasına (10^{10} - 10^{11} /g) hakim olmakta, *Enterococcus*, *Bacterioides*, *Clostridium* gibi patojenler de azalmaktadır (Yalçın ve Yurdakök, 2000). Mide-bağırsak bölgesi immün sistemini kullanıma hazırlayan bu bakterilerdir ve bunlar olmaksızın immün sistemin normal fonksiyon gösteremeyeceği kanıtlanmıştır (Vanderhoof and Rosemary, 2002). Bağırsak mikrobiyotası bağırsak mukozal yüzeyinde ya da bağırsak lümeninde ortaklaşa ya da yarış içerisinde yaşamaya adapte olmuş bakteri, arke ve ökaryotları içeren çeşitli ve dinamik bir ekosistem oluşturur (Gülmez ve Güven, 2002; Guarner et al., 2012). Dışkı örneklerindeki çoğu bakteri hücreleri kültürlerde gelişmemektedir (Guarner et al., 2012). Mide-bağırsak florasını çevresel stres, iklim, antibiyotikler, emosyonel faktörler ve diyetel değişiklikler etkileyebilmektedir. Probiyotikler intestinal mikrobiyal dengeyi geliştirerek flora katkısında bulunmakta, yarışma yolu ile reseptörlere bağlanarak patojenlere yer bırakmamakta, dışkı ile atılmalarını sağlamaktadır (Yağcı, 2002).

Bağırsaklar vücudun en önemli bağışıklık fonksiyonu gösteren organıdır ve vücuttaki bağışıklık hücrelerinin %60'ı bağırsak mukozasında bulunmaktadır (Guarner et al., 2012). İleum bakterilerinin bağışıklık fonksiyonundaki önemli etkisi incebağırsak mukozasında (Payer Plakaları) çok sayıda organize lenfoid yapının bulunmasından ileri gelmektedir (Guarner et al., 2012). Probiyotikler mukozal bağışıklık mekanizmasını uyararak, antagonizm ve potansiyel patojenlerle yarış ile intestinal ekosistemini etkiler. Bu olguların, probiyotiklerin en yaygın olarak kullanılma sebebi olan ishal görülme oranı ve şiddetinin azaltılması da dahil olmak üzere, en yararlı etkilere aracılık ettiği düşünülmektedir. Probiyotikler muhtemelen prokarsinojenlerin seviyesini arttıracak bazı bakteriyel enzimlerin aktivitesini baskılamadaki rolleri nedeniyle hayvan modellerinde kolon kanserini azaltmaktadır ancak bu insanlarda henüz kanıtlanmamıştır (Guarner et al., 2012).

Probiyotikler sindirim sistemindeki antikor seviyesini artırarak bağışıklık sistemini güçlendirmektedirler (Fuller,1989; Vanbelle et al.,1990; Teller and Vanbelle,1991). *Lactobacillus*'lar *E.coli*'ye karşı anti-*E.coli* faktörü salgılayarak *E.coli*'nin toksik amin sentezini engellemektedir (Nemeskery, 1983; Jones and Thomas., 1987; Lyons, 1987; Sarıca, 1999). Probiyotik bakteriler, toksik amin ve

amonyak üreten patojen mikroorganizmaların çoğalmasını önlemek suretiyle de bağırsakta bu toksik maddelerin birikimini engellemektedir.

Sayırsız klinik ve *in vitro* çalışma probiyotiklerin çeşitli sağlık yararlarının olduğunu göstermiştir. Enfeksiyonların önlenmesine yardım ederler, bağışıklık sistemini geliştirirler, osteoporozu önlerler, bağırsak enfeksiyonunu önlerler, bağırsak hareketlerini düzenlerler ve anti-tümör, anti-mutajenik ve anti-alerjiktirler (Penner, 2005; Dolly et al., 2011). Ancak probiyotiklerin bu etkilerini gösterebilmeleri için normal mide pH'sına karşı dayanıklı olmaları ve mideden bağırsağa geçişleri süresince canlı kalmaları gerekmektedir (Sarıca, 1999). *Lactobacillus*ların genellikle normal mide pH'sına dayanıklı oldukları bildirilmektedir (Kumprecht,1990; Sarıca, 1999).

4.2 Probiyotiklerin Sağlık Etkileri

Sindirim sistemi florası beslenmede ve sağlıkta kritik rol oynar. Bağırsak bakterileri temel besin öğelerini yararlı hale dönüştürürken gaz vb. yan ürünler de meydana gelir. Anaerop mekanizma ile gerçekleşen fermantasyon, bireyin günlük enerji ihtiyacına katkıda bulunurken, bu olaylar sonucunda oluşan bazı zararlı ürünler de bir seri akut ve kronik bağırsak rahatsızlıklarına zemin hazırlar. Bazen de bağırsağa ulaşan patojen bakteriler bağırsak florası arasındaki dengeyi bozar. Sürekli bozulmaya yatkın olan dengenin tekrar kurulması için probiyotiklerden yararlanılmaktadır (Gibson and Fuller, 2000).

Gıdadaki probiyotik bakterilerin sağlığa yararları mide-bağırsak enfeksiyonu, serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi ve bağışıklık sisteminin uyarılması için proflaksis olmasını da kapsar (Vrese and Schrezenmeir, 2008; Wang et al., 2012). Probiyotikler bağırsak yangılanmasının önlenmesinde ve kanser tedavisinde de önemli rol oynamaktadır (Shahani and Ayebo, 1980; Kim,1988; Fuller,1989; Sarıca, 1999). 10^7 kob/g düzeyinde *L. johnsonii* La 1 içeren fermente bir süt ürünü alındığında hastalarda akciğer yangısı üzerinde olumlu etki yaptığı ve fagositik aktiviteyi arttırdığı bildirilmiştir (Biourgeet al., 1998; Gülmez ve Güven, 2002). *B. longum* ve *L. acidophilus*'un 10^9 'luk dozunun %28-48 oranında linoleik asit peroksidasyonunu önlediği, 4-nitrofenil-N-oksit (4NQO)'in sitotoksik etkisinin *B. longum* tarafından %90 oranında ve *L. acidophilus* tarafından ise %50 oranında önlediği, her iki etkenin de plazma lipid peroksidasyonunda %11-29 oranında azalma sağladıkları bildirilmiştir (Lin and Chang, 2000).

Çoğu çalışma en iyi etkinin mikroorganizmaların bağırsak epitelyumunda kolonize olduklarında sağlanacağı konusunda hemfikirdir. Böylece bağırsak bağışıklık sistemini etkileyebilir, enterik patojenler ile yer değiştirebilir, antimitojenler, antioksidanlar ve hücre sel sinya ile muhtemel başka etkiler sağlayabilir (Park et al., 2007; Rivera-Espinoza et al., 2010). Bu mikroorganizmaların bağırsak florasından izole edilmiş ve canlı olmaları, ayrıca mide-safra asitlerine dayanıklılık göstermeleri, bağırsak hücrelerine tutunabilmeleri ve mide-bağırsak sisteminde kolonizasyon yeteneğine sahip olmaları gerekmektedir (İnanç vd., 2005). Probiyotiklerin immunostimülatör etkilerinin bağırsağa adezyon yeteneğine bağlı olduğu, bu yeteneğini de hücre duvarında bulunan teikoik asit ve lektin benzeri maddelerden kaynaklandığı belirlenmiştir (Ambrosini et al., 1998; Gülmez ve Güven, 2002).

Probiyotiklerin bağırsak epitel hücrelerinde kolonize olarak çoğalmaları oksidasyon redüksiyon potansiyelini düşürerek, aerobik patojen mikroorganizmaların oksijenden yararlanmalarını engelleyerek gelişmelerini inhibe etmektedir (Yalçın vd., 1996).

Alander et al. (1999) *L.rhamnosus* GG ile fermente edilen buğdaydan üretilen bir içeceği bir grup insana 12 gün süreyle içirdikten sonra suşun bağırsakta kolonize olduğunu biyopsi ile tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, uygulama kesildikten 1 hafta sonra kolonizasyonun giderek son bulduğunu vurgulamışlardır. Biogurge et al (1998) ise, *Bacillus* CIP 5832 suşunun köpek bağırsağında kolonize olduğunu, dışkıda 2-4. günlerde en yüksek sayıya ulaştığını, uygulama kesildikten 3 gün sonra dışkıda etkenin giderek azaldığını bildirmiştir.

Ayrıca *L.acidophilus*, bağırsaklarda kolesterolün emilimini etkileyerek serum kolesterol düzeyini düşürmektedir (Kim, 1988; Sarıca, 1999). Günde *L. acidophilus* L1 içeren 200 ml fermente süt tüketen hiperkolesterolemik bireylerde kolesterol düzeyi %2,4-3,2 oranında düşmüştür. Her %1'lik kolesterol azalmasının da kalp hastalıkları riskini %3 oranında azalttığı görüşüne göre, bu riski % 6-10 oranında azalttığı anlamına geldiği bildirilmiştir (Anderson and Gilliland, 1999)

Probiyotikler hayvanın sindirim sistemi hücreleri tarafından üretilen enzimler ile simbiyotik olarak çalışan selülaz, ksilanaz, lipaz, proteaz, β -glukanaz ve amilaz gibi enzimleri üreterek özellikle sindirim sistemi tam olarak gelişmemiş

genç hayvanlarda besin maddelerinin sindirimine yardımcı olmaktadır (Vanbelle et al.1990). Bu mikroorganizmalar B grubu vitaminleri (Niasin, Biotin, Piridoksin, Folik Asit, Pantotenik Asit) sentezleyerek sindirime katkıda bulunmaktadır (Hooper, 1990).

Probiyotikler insan bağırsağındaki bakterilerin, özellikle de patojen bakterilerin kolonizasyonunu önleyerek bağırsak rahatsızlıklarını gidermede etkili olan birçok mekanizmayı harekete geçirirler. Bu mekanizmalar aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır (Rolfe, 2000):

- İnhibitör maddelerin üretilmesi; organik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinlerden ibaret olan bu inhibitör maddeler, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerin bağırsağa tutunmasını engeller.
- Diğer bakterilerin tutunacağı adezyon bölgelerini kompetitif inhibisyon suretiyle tutarak patojenlerin kolon yüzeyine tutunmasını engeller.
- Kompetitif olarak besinleri patojen bakterilerden çalarak beslenmelerini önlerler (ancak bu etki *in vivo* ortamda doğrulanmamıştır).
- Toksin reseptörlerini yıkımlarlar.
- İmmün sistemi güçlendirirler.

Probiyotikler, ürettikleri organik asitler ile bağırsağın pH'sını düşürerek (pH'ı 4-4.5'un altına) nötr veya bazik pH'da yaşayan patojen mikroorganizmaların gelişmelerini engellemektedir (Jernigan et al.,1985; Sarıca, 1999). *Lactobacillus*'ların prezervatif etkisi, ürettikleri antimikrobiyal etkili organik asitler (laktik asit, asetik asit ve formik asit), hidrojen peroksit, diasetil, asetaldehit ve bakteriozinlerden kaynaklanmaktadır. *Lactobacillus*'lar, acidolin, acidophin, diplococin ve lactocidin gibi maddeler üreterek diğer patojenik mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etki yapmaktadırlar (Alp vd., 1993). En iyi bilinen bakteriozin Nisin'dir. Nisin, bakterilerin hücre duvarındaki lipit II prekürsörlerini etkileyerek por oluşumuna neden olur. Ancak bu durumdaki bakterinin vankomisine direnç geliştirmesi riski ortaya çıkar. Bir başka bakteriozin olan Laktokoksin 972 de bakterilerin hücre duvarı oluşturmalarını engeller. Pediyoisin ise *L. monocytogenes*'de şeker transport sistemini bozar (Kuipers et al., 2000).

Bakteriozinlerin ısıya dirençli oldukları ve nötr pH'da optimum aktivite gösterdikleri, bazı Gram pozitif patojen bakterilere (*S. aureus*, *B. subtilis*, *L.*

monocytogenes, *C. perfringens* sporları) karşı inhibitör etki yaptığı ancak bakteriyozinlerin kemotripsin, protein, tripsin, pronaz, pepsin ve papain tarafından inaktive edildiği; lipaz, lizozom ve katalazdan etkilenmediği belirtilmiştir (Toit et al., 2000).

Probiyotik etkenin türü kadar, izole edildiği kaynak da önemli bulunmuştur. İnsandan elde edilen enterokok suşlarının %60-82'sinin bakteriyozin üretmesine karşın bu oran hayvanlardan elde edilenlerde %28-39 olarak tespit edilmiştir. İnsan dışkısından elde edilen 15 adet vankomisin dirençli suştan sadece bir tanesinin bakteriyozin üretmesine karşın hayvan dışkısından elde edilenlerde bu durum %44 olarak saptanmıştır. Bu araştırmada bakteriyozin üretimi ile direnç oluşumu arasında bir ilişki olabileceği ileri sürülmüştür (Gülmez ve Güven, 2002). Çeşitli probiyotik ve prebiyotiklerin klinik uygulamaları The World Gastroenterology Organisation (WGO)'nın 2012 yılında yayınladığı derlemede özetlenmektedir.

4.3 Enkapsülasyon

Enkapsülasyon aktif ajanları bir taşıyıcı materyal ile kaplanma prosesidir ve gıdanın içindeki canlı hücreleri korumak (Lisserre et al., 2007; Shima et al., 2009; Thantsha et al., 2009), raf ömrünü arttırmak ve kullanımı kolay toz formuna çevirmek (Oliveria, 2007a, 2007b) için kullanışlı bir araçtır. Ek olarak enkapsülasyon kontrollü salınımı kolaylaştırabilir ve etki bölgesine ulaştırmayı optimize edebilir, bu şekilde söz konusu probiyotik suşun etkinliğini artırır (Chávarri et al., 2012). Canlı probiyotik kültürlerin kurutulması uzun süreli koruma için çok uygundur ve fonksiyonel gıda uygulamalarında kullanılmaktadır. Bu işlem ayrıca bu mikroorganizmaların gıda içinde çoğalmasını dolayısıyla gıdanın duyuşal karakterini değiştirmelerini önleyebilir. Bu uygulamada en büyük zorluk kurutma sırasında canlılığın sürdürülmesinde yaşanmaktadır. Depolama süresinde de mikroorganizmaların canlılığı ve stabilitesini etkileyen en büyük faktör bakterileri kurutma işleminde oluşan problemlerdir (Dolly et al., 2011).

Enkapsülasyonun hedefi; bakterinin işleme ve depolamada canlı kalmasını ve ince bağırsak gibi sindirim sisteminin uygun bölgelerinde açılan mikro ortamı yaratmaktır. Probiyotiklerin korunacağı başlıca etkenler şunlardır:

- İşleme koşulları (sıcaklık, oksidasyon, kayma gerilimi vb.)
- Kuruma (kuru gıda ürünleri için)

- Depolama koşulları (paketleme ve çevre: nem, oksijen, sıcaklık vb.)
- Mide-bağırsak sisteminde parçalanma (midede düşük pH ve incebağırsakta safra tuzu) (Picot and Lacroix, 2004; Chávarri et al., 2012).

Püskürtmeli kurutmada aktif materyalin bir koruyucu polimer matriks içerisinde tutuklanması, bu materyalin kaplama ajanı çözültüsü içerisindeki dispersiyonu ve emülsiyonu ile hazırlanır (Barbosa et al. 2005). Püskürtmeli kurutma yönteminde sıvı ürün atomizör yardımı ile çok küçük damlacıklar halinde sıcak hava ortamına verilir. Yapıdaki su yüksek buharlaşma hızından dolayı kısa süre içerisinde üründen uzaklaşır (Koç vd., 2010). Sıcaklığa karşı hassas olan ürünlerde kaynama noktası düşük olan kimyasalların üstüne püskürtülerek olumsuzluklar önlenir. Bu yöntemin olumsuzlukları arasında yapışma tehlikesi, oksidasyon, renk ve aroma değişimi sayılabilir. Sprey kurutma mikrokapsülenmiş gıda maddeleri üretmek üzere kullanılan en yaygın ve en ucuz tekniktir (Gharsallaoui et al., 2007; Jyothi et al., 2009). Bu teknikte ekipman temini kolay ve üretim maliyetleri birçok metottan daha düşüktür (Gökmen vd., 2012).

Püskürtmeli soğutma, püskürterek kurutma prensibinin tersi şeklindedir. Bu durumda bakterilerin enkapsülasyonu için yüksek erime noktasına sahip bir erimiş matriks kullanılmaktadır ve bu karışım taşıyıcı materyalin katılaşmasını sağlamak için bir soğuk hava akımı içine enjekte edilir. Bu yöntemle elde edilen kapsüller genellikle suda çözünür değildir ve probiyotik kapsüllemeye nadiren kullanılmaktadır (Chávarri et al., 2012). Genellikle yüksek erime noktasına sahip oldukları için katı yağlar kullanılır (Vos et al., 2010).

Akışkan yatakta kaplamada enkapsüle edilecek katı partiküller, ısıtılmış veya soğutulmuş hava ile kaplama odasına alt kısımdan verilir ve hareket halindeki hava ile odanın üst kısmına taşınır. Eritilen veya buharlaşmış bir çözücü içerisinde çözüldürülmüş kaplama materyali hava odasına bir sis bulutu oluşturacak şekilde atomize edilir ve havada asılı partiküllerin kaplanması sağlanır (Onwulata, 2005; Koç vd., 2010). Probiyotiklerin bu yöntemle kaplanmasında en çok yağ bazlı kaplama materyali kullanılır ancak proteinler ve karbonhidratlar da kullanılabilir (Champagne and Fustierintech, 2007). Bu teknik büyük ölçekli hacim ve yüksek verim elde edilebilmesi nedeniyle probiyotiklerin endüstriyel enkapsülasyonunda en uygun tekniktir diyebiliriz (Chávarri et al., 2012).

Emülsiyon temelli tekniklerde probiyotik içeren polimer çözeltisi (sürekli olmayan faz) soya, ayçiçeği, kanola ve mısır yağı gibi sıvı yağlar (sürekli faz) içerisine eklenmektedir. Suda çözünen polimer çözeltisinin yağ fazı içerisinde çözünmeyen küçük jel formuna dönüşmesi gerekir. Bunun için hazırlanan su/yağ emülsiyonu bir süre bekletilmektedir. Emülsiyonun iç faz partikül boyutu ne kadar küçük olursa oluşan mikrokapsüller de o kadar küçük olmaktadır. Elde edilen kapsüller filtrasyonla sıvı çözeltiden ayrılmaktadır (Krasaekoopt et al., 2003; Chávarri et al., 2012). Bu teknik kolayca ölçeklendirilebilmesi de oldukça büyük boyut dağılımına sahip kapsüller üretir (Chávarri et al., 2012).

Koaservasyon, kaplama materyalinin sıvı fazının polimerik çözeltiden ayrılması ile birlikte kaplama fazının çekirdek materyali homojen bir tabaka halinde sarması sonucunda gerçekleşmektedir (Desai and Park, 2005; Koç vd., 2010). Bir biyoaktif bileşen çözeltisi, ters yüklü matriks ile karıştırıldığında bir kompleks oluşur (Vos et al., 2010). Bu teknik temel olarak elektrostatik etkileşimden kaynaklanmaktadır ancak hidrofobik etkileşimler de oluşmaktadır (Augustin and Hemar, 2009)

Ekstrüzyon ile enkapsülasyon materyali bir lüleden ya da damla oluşturu cihazlardan geçmeye zorlayarak küçük damlalar üretmekten ibarettir (Vos et al., 2010). Ekstrüzyon ile mikroküreler içinde kapsülleme iki adımdan gerçekleşir: (1) probiyotik bakteri içeren iç faz küçük damlalar şeklinde dağıtılır (2) damlalar jelatinizasyon ya da yüzeyinde zar oluşmasıyla katılaşır. İlk adım için emülsiyon sistemi ya da koaservasyon ile kapsüller elde edilir (Chávarri et al., 2012). Ekstrüzyon tekniğinde destekleyici materyal olarak, alglerden ekstrakte edilen ve D-mannuronik ile L-guluronik asitten ibaret bir heteropolisakkarit olan aljinat kullanılmaktadır (Gökmen vd., 2012). Büyük ölçekli damla üretimi için çoklu-nozzle sistemi, dönen disk atomizör ya da jet-kesici tekniğinden yararlanılabilir (Vos et al., 2010).

Nişasta granülüne yapışma uygulamasından çeşitli fonksiyonel gıda bileşeni için uygun bir taşıyıcı olarak kısmen hidrolize olmuş ve çapraz bağlı nişasta granülleri kullanılmaktadır (Whistler, 1991; Chávarri et al., 2012). Bazı probiyotik bakteriler nişastaya yapışabilme özelliği göstermektedir ve bu bakterileri korumak için nişastadan yararlanılabileceği ile ilgili birkaç çalışma bulunmaktadır (Chávarri et al., 2012).

Kompres kaplama tekniği kuru bakteri tozunun tablet veya pelet formuna sıkıştırılması ve bu tablet/peletin üzerinin polimerler ile kaplanmasıyla gerçekleştirilir. Kompres kaplama, liyofilize bakterilerin depolama sırasında stabilitesini arttırmak için probiyotik bakterilerin jel oluşturan polimerlerle enkapsülasyonu yeniden önem kazanmıştır (Chan and Zhang, 2005). Ancak son ürünün büyüklüğü nedeniyle bu teknik gıda bileşeni elde etmek için değil farmasötik ve nutrasötik bileşikleri geliştirilmesi için kullanılmaktadır (Chávarri et al., 2012). Ayrıca probiyotiklerin enkapsülasyonunda kokristalizasyon ve lipozom oluşturma tekniklerinden de yararlanılabilir (Koç vd., 2010; Ünal ve Erginkaya, 2010; Gökmen vd., 2012).

Probiyotik kültürlerin donmuş ya da kurutulmuş formları gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca probiyotiklerin kuru formda olmasının uzun süreli korunma, işlemede, depolamada, pazarlamada ve fonksiyonel gıda geliştirme uygulanmasında kolaylık sağlaması gibi avantajları vardır. Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma bu amaçla sıklıkla kullanılan yöntemlerdir (Dolly et al., 2011).

4.3.1 Dondurarak kurutma/Liyofilizasyon ile enkapsülasyon

Dondurarak kurutma bütün ısıya duyarlı materyallerin düşük basınç ve düşük sıcaklık şartlarında dehidrasyonunda kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem sıklıkla suda çözünür esanslar ve doğal aromaların enkapsülasyonunda kullanılmaktadır (Gökmen vd., 2012). Bu teknikte dehidrasyon prosesi dondurma sonrasında ortam basıncının düşürülerek donmuş suyun süblimleşerek katı formdan direk olarak gaz forma geçirilmesi şeklinde çalışmaktadır (Chávarri et al., 2012).

Dondurarak kurutma probiyotikleri başka bir teknikle kaplanmasından sonra kurutmak için kullanışlıdır. Proses, taşıyıcı materyallerin varlığında probiyotiklerin dondurulmasını takiben suyun vakum altında süblimasyonu şeklinde uygulanır. En önemli avantajları su fazına geçişin ve oksidasyonun önlenmesidir. Probiyotiklerin aktivitesinin dondurarak kurutmaya karşı güçlendirilmesi ve stabilizasyonun depolama süresince sağlanması için sıklıkla donmaya karşı koruyucular eklenmektedir (Chávarri et al., 2012). En yaygın kriyoprotektanlar laktoz, treloz, sorbitol, sükroz, süt proteinleri ve yağsız süttür (Semyonov et al., 2010).

Dondurma ve takip eden donmuş suyun süblimasyonu hücre membranı ve DNA hasarı gibi hücrel zarara neden olur. Mikroenkapsülasyon süblimasyon sırasında kritik seviyedeki bağlı suyu tutabilir böylece bakterilerde hücre membranı sızıntıları ve hassas proteinlerin yapısındaki değişiklikler gibi istenmeyen etkilerden kaçınılabılır (Hamoudi et al., 2007; Rajam et al., 2012). Ancak emülsiyon ve ekstrüzyon tekniklerinde, üzerinde durulması ve dikkat edilmesi gereken en önemli aşama, karıştırma veya bir diğer ifadeyle de homojenizasyon işlemidir. Homojenizasyon işlemi, mikroenkapsüle edilecek bakterinin canlılığı ve kapsül boyutu üzerinde direkt etkili olmaktadır. Kullanılan homojenizatörün özelliğine göre, bakteri canlılığı ve kapsül boyutu değişmektedir. Bu nedenle, mikroenkapsülasyon işlemi sırasında amacımıza en uygun homojenizatörün seçimi de oldukça önemlidir (Koç vd., 2010).

4.3.2 Taşıyıcı/Kaplayıcı materyaller

Kaplanmış hücrenin kabuğu veya kaplaması yarı geçirgen, ince ancak hücreyi canlı tutacak ortam koşullarını sağlamasını destekleyecek kadar güçlü olmalıdır. Bunun yanında probiyotik hücrelerin insan vücudunda belirli bir bölgede salınması için dizayn edilebilir. Kapsüllerin koruyucu kabuğunun dizaynı için kullanılan materyaller gıda sınıfı, biyo-bozunabilir ve iç faz ile çevre arasında bir bariyer oluşturabiliyor olması gerekir.

Mikrokapsüller mide-bağırsak bölgesinde ve gıda matrisleri içerisinde yapısal bütünlüğünü korumak için suda çözünür olmalıdır. Materyaller tek-katman oluşturmak için tek başına ya da bir arada kullanılır. Mikrokapsülleri ikinci bir membran ile kaplamak depolama sırasında oksijene maruz kalmalarını önleyebilir ve hücrelerin asidik koşullara ve yüksek safra asidi konsantrasyonlarına direncini arttırabilir. Bu amaçla kullanılan enkapsülasyon ajanları iyonik hidrojeller (sodyum aljinat, kitosan), termal hidrojeller (jellan gum, ksantan, karajenan, jelatin), nişasta ve süt proteini jelleridir (Chávarri et al., 2012; Rajam et al., 2012).

Süt proteinleri uygun şartlarda jel formuna dönüşebilmektedirler. Proteinler peptit bağlarıyla bağlı amino asit molekülleri zinciridir ve çok sayıda amino asit (22 ünite) ve değişik diziliş olasılığı nedeniyle çok çeşitli protein vardır. Proteinlerin ötesinde süt proteinleri enkapsülasyon materyali olarak fiziko-kimyasal özellikleriyle oldukça ilgi çekicidir. Süt proteinleri probiyotik hücreler için doğal taşıyıcılardır ve yapısal ve fiziko-kimyasal özellikleri sayesinde taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirler (Livney, 2010).

Süt proteinleri kimyasal kompozisyon ve fiziksel özellikleriyle geniş kapsamda iki ana kategoriye ayrılır. Kazeinler prolince zengin, ayrı hidrofobik ve hidrofilik parçaları olan açık yapılı düzensiz sargı proteinleridir ve kazeinlerin %95'i doğal olarak kendiliğinden kazein miselleri halindedir. Peynir altı suyu proteinleri temel olarak α -laktalbumin, β -laktoglobulin (β -lg), immunoglobulinler, serum albümin ve ayrıca çok sayıda küçük proteinler içerir ancak peynir altı suyu proteinleri globüler yapıdadır (Livney, 2010).

α -laktalbumin ve β -laktoglobulin kısmen mide-bağırsak dindirimine dirençlidir. Pepsin denature olmamış β -laktoglobulini parçalayamazken tripsin düşük hızda α -laktalbumin ve denature β -laktoglobulini protein parçalarına böler. Kimotripsin ise α -laktalbumin ve β -laktoglobulini sınırlı miktarda hidroliz edebilir (Guo, 1995; Bamdad et al., 2009). Peynir altı suyu proteini çözeltisi 90°C'nin üzerine ısıtıldığında sıkıca katlanmış protein molekülleri doğal hallerinden, protein-protein interaksyonuna ve disülfid ve hidrojen bağlarının oluşumuna izin veren katlanmamış açık forma geçmektedir (Anandharamkrishnan et al., 2007; Rajam, 2012). Bu interaksyonlar peynir altı suyu proteinlerini daha katı, güçlü ve esneyebilir yapar (Kinsella and Morr, 1984; Rajam et al., 2012). Süt proteinleri bu özelliklerinden dolayı birçok probiyotik enkapsülasyonu çalışmasında kullanılmıştır (Sheu and Rosenberg, 1998; Gbassi et al., 2009; Dolly et al., 2011; Fritzen-freire et al., 2012; Rajam et al. 2012; Burgain et al., 2013a).

Rajam et al. (2012)'nin yaptığı microenkapsülasyon çalışmasında peynir altı suyu proteini yerine denature edilmiş peynir altı suyu proteini kullanıldığında enkapsülasyon veriminin arttığını rapor etmiştir. Fritzen-Freire et. al (2012) yaptığı püskürtmeli kurutucu ile enkapsülasyon çalışmasında ise enkapsülasyon ajanı olarak kullandığı yağsız süz tozunu çeşitli prebiyotikler ile kombine etmiş ve en iyi sonucu YST/inülin/fruktooligosakkarit kombinasyonunu kullanarak yaptığı uygulamada aldığını belirtmiştir.

Süt proteinleri ile probiyotik mikroorganizmalar arasında çoğunlukla ortam pH'sından etkilenmeyen interaksyonlar gerçekleşmektedir. Peynir altı suyu proteinleri için spesifik, kazein için ise spesifik olmadığı düşünülen bu etkileşimler mikroorganizmaların proteinlere tutunmasını sağlamaktadır (Burgain et al., 2013b). Bakterilerin tutunma doğası hücre yüzeyinde bulunan pili gibi proteinler ve egsopolisakkarit (EPS) gibi polisakkaritlerin bulunmasından kaynaklanmaktadır. Tutunma sterik ve elektrostatik etkileşimler gibi uzun

menzilli güçler ve Van der Waals, asit-baz, hidrojen bağlama ve biyospesifik etkileşimler gibi kısa menzilli güçler tarafından control edilir (Burgain et al., 2013b).

5 PREBİYOTİKLER VE SİNBIYOTİKLER

Prebiyotik terimi Gibson ve Roberfroid tarafından “kolon bakterilerinden birinin veya az bir kısmının çoğalmasını ve/veya aktivitesini etkileyerek yararlı bir etki oluşturan, sindirilemeyen gıda katkı maddesi” olarak tanımlanmıştır (Klaenhammer, 2000). Prebiyotikler bağırsakta yaşayan mikroorganizmalardan belli bir grubu besleyen, çoğunlukla insan enzimleri tarafından sindirimi zayıf, nişasta olmayan polisakkaritleri ve oligosakkaritleri içeren, besin maddeleridir (Guarner et al., 2012). Prebiyotikler sindirilemeyen yani yapısı bozulmadan kolona ulaşan, ancak probiyotikler tarafından fermente olabilen karbonhidratlardır. Laktuloz, inülin, oligosakkaritler (maltoz, soya, ksiloz), oligofruktoz ve galaktoz içeren galaktooligosakkaritler (kurubaklagiller) prebiyotiklerin besinsel kaynaklarıdır (Hanson et al., 1999; Yağcı, 2002; Zubaidah ve Akhadian, 2013). Bu bileşenler yararlı bakterilerin büyümesini zararlı olanlardan daha çok desteklemektedirler. Prebiyotikler yararlı anaerobik bakteri sayısını arttırarak ve potansiyel patojen mikroorganizmaların popülasyonunu azaltarak bağırsak bakterilerini etkiler (Guarner et al., 2012).

Yaygın olarak bilinen prebiyotikler oligofruktoz, inülin, galakto-oligosakkaritler, laktuloz ve anne sütü oligosakkaritleridir (Guarner et al., 2012). Prebiyotik oligofruktoz, buğday, soğan, muz, bal, sarımsak ve pırasa gibi birçok gıdada doğal olarak bulunur (Guarner et al., 2012). Bir porsiyon pırasa yemeği, bir küçük boy muz, bir küçük boy soğan ve sarımsak günlük prebiyotik gereksinimini karşılamaktadır (Moshfegh et al., 1999; Yalçın ve Yurdakök, 2000).

Günümüzde üzerinde çalışılan ve gıdalara katkı maddesi olarak katılan prebiyotikler inülin tipi fruktanlardır. İnülin doğada yaygın olarak bitkilerin depo karbonhidratı formunda bulunan ve früktoz polimerlerinin heterojen karışımına verilen isimdir. İnülin, polimerizasyon derecesi 2-60 ya da daha fazla olan bir fruktandır. Polimerizasyon derecesi daha düşük (2-20) birimlere fruktooligosakkarit ya da oligofruktoz adı verilmektedir (Ninnesse, 1999). Monocotyledonous ve dicotyledonous familyasından birçok bitki inülin sentezlemektedir. Oligofruktoz ayrıca hindiba köklerinden izole edilebilir veya sükrozdan enzimatik yolla sentezlenebilir (Guarner et al., 2012). Hindibadan elde edilen fruktanlardan olan oligofruktoz ve inülin kolonun yararlı florasını oluşturan *Bifidobacterilerin* üremesini stimüle ederek prebiyotik nitelik gösterirler (Reddy, 1999).

İnülin tipi fruktanlar şeker ve yağ (sadece inülin) yerine, tekstür kazandırıcı, stabilize edici veya tat verici olarak fermente süt ürünlerine, jellere, dondurma benzeri yiyeceklere ve ekmeğe, pasta, bisküvi gibi ürünlere, ekmeğe sürülerek tüketilen gıdalara ve bebek mamalarına katılmaktadır (Roberfroid, 2000).

Fruktooligosakkaritlerin temel diyet kaynakları arasında buğday, soğan, muz ve sarımsak sayılabilir. Pırasa, yerelması, hindiba, bir tür yabani soğan, kuşkonmaz ve bezelye ise diğer kaynaklar arasındadır. Arpa ve çavdar gibi bazı tahıllar da fruktooligosakkarit içermektedir. Günde 4-10 g fruktooligosakkarit alındığında bifidojenik etki göstermektedir (Green, 1997; İnanç vd., 2005).

Oligofruktozun kolonda fermentasyonunun çok sayıda fizyolojik etkilerinden bazıları kolonda Bifidobakterilerin sayısının artırma, kalsiyum, magnezyum gibi minerallerin emilimini artırma, dışkı ağırlığını artırma, mide-bağırsak bölgesinden geçiş süresini kısaltma ve muhtemelen kan lipit düzeylerini düşürmedir (Guarner et al., 2012). Fermentasyonları sonucu oluşan kısa zincirli yağ asitleri (bütirat, propiyonat, asetat) sodyum ve su emilimini artırmakta, ileal ve kolonik epitelyal hücrelerin çoğalmasını sağlamaktadır. Mide-bağırsak sistemi motilitesinin düzenlenmesinin yanı sıra, mukozanın kan akımını artırarak, kolon epiteli üzerinde trofik etki göstermektedirler (İnanç vd., 2005).

Sinbiyotik terimi, probiyotik ve prebiyotik kombinasyonuna verilen addır (Gibson and Roberfroid, 1995; Gülmez ve Güven, 2002; Guarner et al., 2012). Bir sinbiyotik ürün hem probiyotik hem de prebiyotik etki gösterir (Guarner et al., 2012). En iyi bilinen sinbiyotikler *Bifidobacterium*+FOS, *Lactobacillus*+laktitol ve *Bifidobacterium*+galaktooligosakkarit kombinasyonlarıdır (Gülmez ve Güven, 2002).

Ratların bağırsağında yapay olarak meydana getirilen kanser kök hücrelerinin hayvanlara yedirilen oligofruktoz ve inülin ile birlikte *B.longum* vermekle kanser gelişiminin ciddi boyutta baskılandığı görülmüştür ve bu konu üzerinde daha detaylı araştırma yapılarak kolon kanserine karşı bu sinbiyotik etkiden yararlanılması önerilmiştir (Reddy et al, 1997; Gülmez ve Güven, 2002).

Nisin ve laktisin gibi bakteriyozinlerin sodyum sülfat ve sodyum laktat gibi organik asitlerle kombine edildiklerinde *S.kentucky* ve *L.innocua* üzerinde daha fazla inhibitör etki gösterdiği ve toplam bakteri sayısında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Scannel et al., 2000).

6 MATERYAL VE YÖNTEM

6.1 Materyal

6.1.1 Hammaddeler

Çalışmada kullanılan yeşil mercimek (*Lens culinaris* Medikus subsp. *Culinaris*), maş fasulyesi (*Vigna radiata* var. *Emerald*), tam buğday (*Triticum durum*), pirinç (*Oryza sativa* L.), yulaf (*Avena sativa* L.), kestane unu (*Castanea sativa* Mill), susam (*Sesamum indicum* L.) ve yağsız süt tozu (YST) İzmir ilindeki bir hipermarketten, kurutulmuş turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon*) bir kuruyemişçiden, gıdaya uygun Beneo Orafiti marka inülin ve fruktooligosakkarit (FOS) ise Artisan Gıda Sanayi Tic. Ltd. Şti., Altunizade, İstanbul'dan temin edilmiştir.

6.1.2 Probiyotik mikroorganizma

Fermentasyon işleminde kullanılmak üzere seçilen probiyotik mikroorganizma, *Lactobacillus plantarum*, Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Bilim Dalından temin edilmiştir.

6.1.3 Kimyasal malzemeler

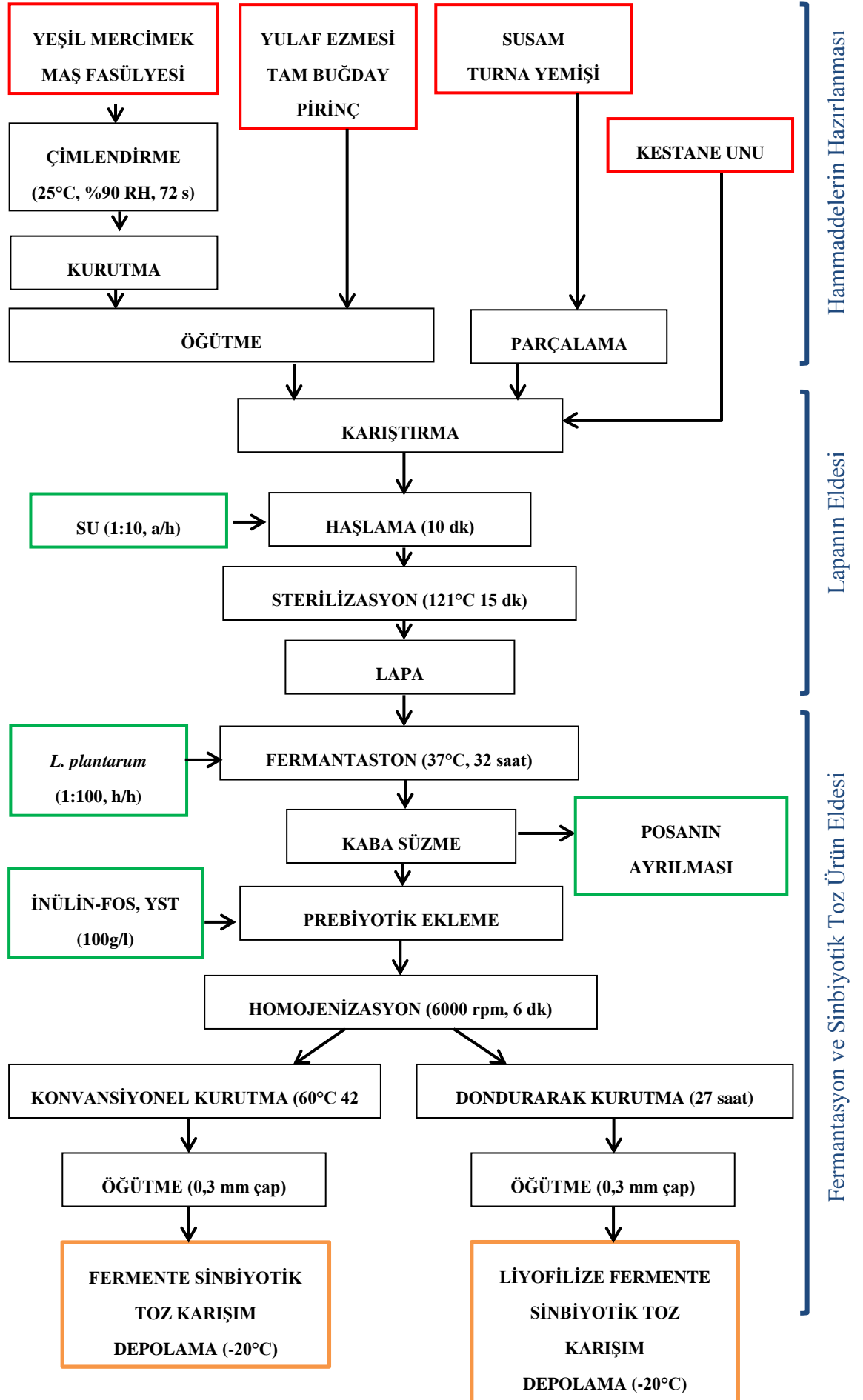
α - Amilaz (A 1031), pepsin (P 7000), safra asidi (B 8631), pankreatin (P1750), fitik asit sodyum tuzu hidrati (P 0109), anjiyotensin dönüştürücü enzim (A 6778), FAPGG / N-(3-[2-furylacryloyl]-phe-gly-gly) (F 7131), Pefabloc SC (76307), nonilamin (N 310001) Sigma-Aldrich firmasından, MRS agar (1106600), MRS Broth (1106610), Merck KGaA Darmstadt Germany firmasından, safra asidi kiti (450-A) Trinity Biotech plc., Ireland firmasından, Spectra/Por diyaliz membranı MWCO:20000 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, USA'den ve Vivaspin 20 model MWCO 3000 ultrafiltrasyon membranları Sartorius Stedim Biotech Gmb'den temin edilmiştir. Asetonitril HPLC (34851) Riedel'den ve diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta E.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir.

6.1.4 Kullanılan cihazlar

Çözeltilerin hazırlanmasında Stuart CC16 (UK), Ika big-squid (white) ve Ika RH basic 2 (Germany) marka magnetik karıştırıcılar ve Yellow Line TTS3 (Germany) Digital vorteks karıştırıcı kullanılmıştır. Tüm tartım işlemlerinde Denver Instrument S1-234 marka terazi, pH ayarlanmasında Sartorius PB-11 marka pH metre kullanılmıştır. Örneklerin saklanması ya da dondurulması amacıyla Regal ve Uğur (Türkiye) marka derin dondurucular kullanılmıştır. Sert tanelerin öğütülmesi için Toper marka çekiçli öğütücü, diğer kuru örneklerin öğütülmesi amacıyla Simon marka SCM-2914 model mutfak tipi öğütücü kullanılmıştır. Çimlendirme ortamının sağlanması ve safra bağlama testinde diyaliz koşullarının sağlanması için Velp Scientifica marka FOC 225E model soğutmalı inkübatör ve ortamın kontrolü için H560 Dewpoint Pro marka higrometre kullanılmıştır. Çimlendirilmiş kurubaklagillerin ve fermente ürünün kurutulması amacıyla Labconco, Freezone 2.5 model liyofilizatör, homojenizasyon işlemlerinde IKA T-25 digital Ultra-Turrax (Germany) homojenizatör, haşlama işleminde Arçelik marka set üstü ocak, mikrobiyolojik analizlerde ve fermantasyon aşamasında Memmert Germany etüv ve otoklav kullanılmıştır. Mikroorganizma hasadında ve sinbiyotik toz ürünün çözünürlük analizinde Thermo Scientific IEC CL3IR (USA) Multispeed soğutmalı santrifüjden yararlanılmıştır. Ayrıca mikroorganizma sayımından önce kapsüllerin açılması ve *in vitro* sindirim analizinde sindirimin etkili bir şekilde modellenmesi amacıyla Stuart SI500 (UK) marka orbital çalkalayıcı kullanılmıştır. Üründe fitik asit ve inkübe edilmiş MRS broth içindeki mikroorganizma miktarının belirlenmesi amacıyla Thermo Inc. Varioskan Flash (Finland) marka mikropilaka okuyucu kullanılmıştır. Sinbiyotik toz ürünün ADE inhibisyonu etkisini belirlemek amacıyla Agilent 1200 model HPLC cihazı kullanılmıştır. HPLC cihazında kullanılan mobil fazların degas edilmesi amacıyla ultrasonik su banyosu kullanılmıştır.

6.2 Yöntemler

Çalışma materyalinin hazırlanmasına ait akım şeması Şekil 6.1'de verilmiştir. Çalışma kapsamında 3 tekrar, 2 paralel olarak yapılan analizler Şekil 6.2'de verilmiştir.



Şekil 6.1: Sinbiyotik toz karışımı üretimi akım şeması

6.2.1 Fermente sinbiyotik ürünün hazırlanması

6.2.1.1 Hammaddelerin hazırlanması

Hammaddeler, fermente ürün yapımı için karıştırılmadan önce çeşitli ön işlemlerden geçirilmiştir. İnülin, FOS ve YST 1:1:2 (a/a/a) oranında karıştırılarak muhafaza edilmiştir. Liyofilize *L.plantarum* kültürü MRS broth içinde süspansiyon edilerek 35 °C’de 72 saat canlandırılmış ve 10⁶ kob/ml *L.plantarum* süspansiyonu elde edilmiştir. Tam buğday ve pirinç çekiçli öğütücü, yulaf ezmesi ev tipi öğütücü ile un haline getirilmiştir. Susam ve turna yemişi ev tipi öğütücü ile parçalanmıştır. Yeşil mercimek ve maş fasulyesi ise taş ve kırık taneler ayrıldıktan sonra Urbano et al.’nın (1999) uygulamasının modifikasyonu sonucu oluşturulan yöntemle çimlendirilmiştir. Öncelikle % 0.5 (h/h) hipoklorit içeren suda 2 dakika bekletilen taneler iyice yıkandıktan sonra 1:5 (a/h) oranında su ile 25±0,5 °C’de 6 saat ıslatılmıştır. Islatma sonunda suyu süzülen taneler aynı sıcaklıkta %90 RH’de kök uzunluğu minimum 5 cm’ye ulaşınca kadar 72 saat (yaklaşık 3 gün) çimlendirilmiş, dondurularak kurutulmuş ve ev tipi öğütücü ile un haline getirilmiştir. Çimlendirme uygulamasında tanelerin çimlendirme öncesi ve sonrası ağırlıkları ve çimlenme yüzdesi belirlenmek üzere ölçümler yapılmıştır.

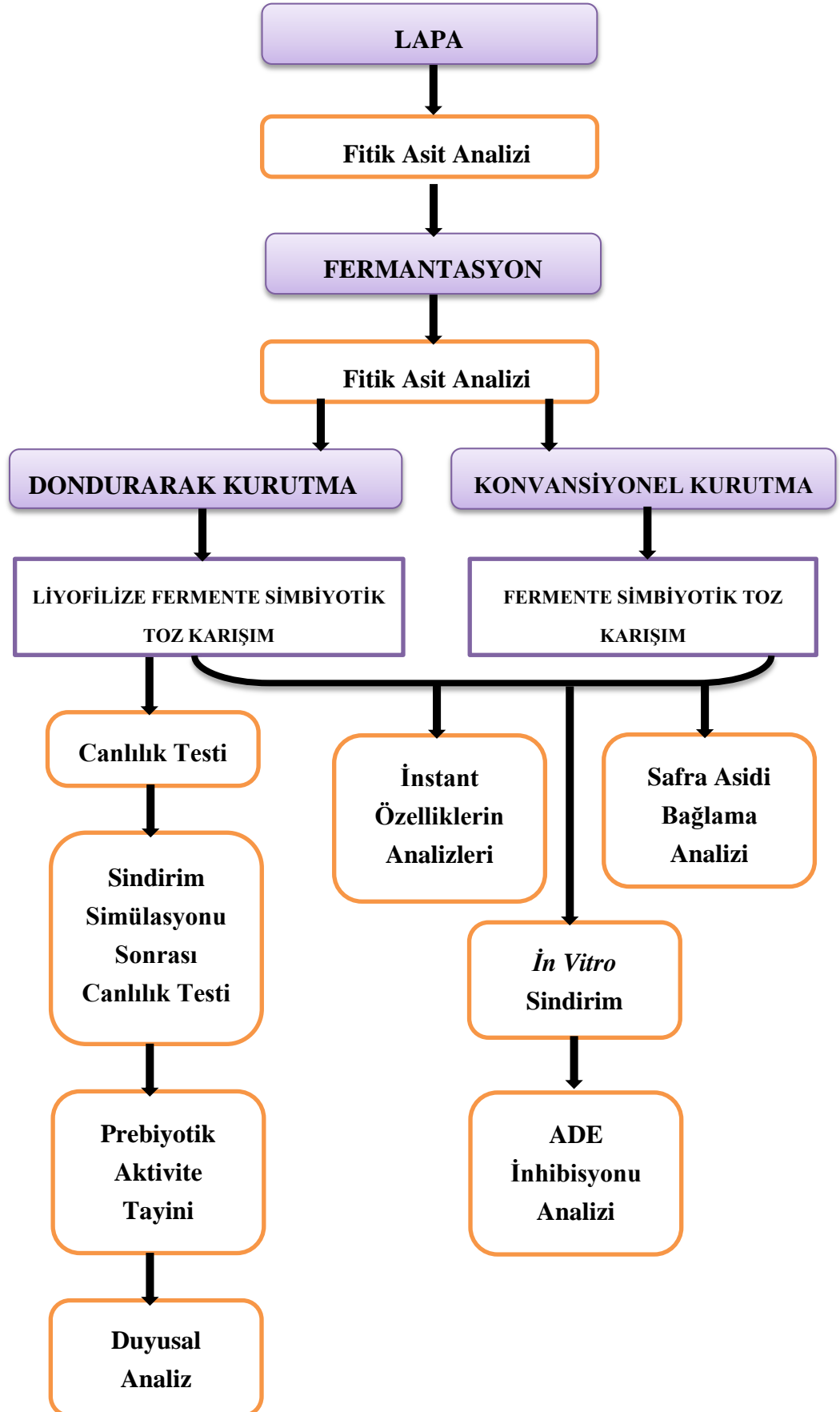
Bütün hammaddeler kullanımdan önce nemden korunacak şekilde kavanoz içinde +4 °C’de saklanmıştır.

6.2.1.2 Lapanın eldesi

Pirinç unu, tam buğday unu, yulaf unu ve kestane unundan 8’er gram; parçalanmış turna yemişi, susam unu, çimlendirilmiş yeşil mercimek ve maş fasulyesi unundan ise 3’er gram alınarak hazırlanan karışım 1:10 (a/h) oranında su ile basınçlı tencerede buhar çıkışından sonra 10 dk haşlanarak lapa elde edilmiş ve kavanozlara koyulmuştur. Kavanozlar 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiş ve fermantasyon için 37°C’de inkübatörde soğumaya bırakılmıştır.

6.2.1.3 Probiyotik ile fermantasyon, prebiyotik ile enkapsülasyon ve kurutma

Hazırlanan steril lapaya steril ortamda 10⁶ kob/ml *L.plantarum* süspansiyonundan 1:100 (h/h) oranında eklenerek homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Kavanozların ağzı alüminyum folyo ile kapatılmış ve 37°C’de 32 saat fermente edilmiştir. Fermantasyon sonunda ürün kaba süzgeçten geçilerek posasından ayrılmıştır. Süzütünün bir kısmı kontrol grubu olarak ayrılırken geri kalanına 10 g/100 ml YST+FOS-inülin eklenmiştir. Bu karışım yüksek hızlı homojenizatör ile 6000 rpm’de 6 dk homojenize edilmiştir.



Şekil 6.2: Deneme planı

Enkapsülasyonun ikinci adımı olarak enkapsülasyon karışımına iki farklı kurutma uygulanmıştır: dondurarak kurutma ve konvansiyonel kurutma. Kurutulmuş fermente ürün parçalanarak maksimum partikül çapı 0,5 mm olacak şekilde toz haline getirilmiş ve -20°C’de depolanmıştır.

6.2.2 Probiyotik ve prebiyotik özelliklerin değerlendirilmesi

6.2.2.1 Hücre süspansiyonlarının hazırlanması

Örnekler analiz öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir. Aseptik koşullarda tartılan 10±0,1 g örnek, 90 ml steril serum fizyolojik su ile seyreltilmiş ve homojenizasyon amacıyla 2000 rpm’de 2 dakika karıştırılmıştır. Ayrıca enkapsüle örnek de, enkapsüle olan mikroorganizmaların serbest bırakılması amacıyla 37°C’de 100 rpm’de 30 dk karıştırılmıştır (Rajam et al., 2012), daha sonra plak sayım yöntemi ile canlı sayımı yapılmıştır.

6.2.2.2 Sindirim simülasyonu sonrası canlılık testi ve Prebiyotik aktivite

Sindirim simülasyonu Paez et al. (2012) tarafından önerilen yöntemle gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonlarından 5 ml alınmış ve üzerine 5 ml “tükürük-mide” sıvısı (0,022 g/l CaCl₂, 1,62 g/l NaCl, 0,22 g/l KCl, 1,2 g/l NaHCO₃ ve % 0,3 (a/h) pepsin) eklemiştir. Karışımın pH’sı 2,5’e ayarlanmış ve 37°C su banyosunda 90 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda karışımdan 5 ml örnek alınarak 6000 g 5°C’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra %0,5 safra içeren MRS broth (pH 7,4) ile aynı hacme tamamlanmış ve 37°C’de 3 saat inkübe edilmiş ve canlı sayımı yapılmıştır. Ayrıca ürünün prebiyotik aktivitesini gözlemek amacıyla 3 saat uzatmalı inkübasyon uygulanmıştır.

6.2.2.3 Plak sayım yöntemi ile canlı sayımı

Canlı sayımı elde edilen süspansiyonlara ayrı olarak uygulanmıştır. Süspansiyonların 10⁻¹’den 10⁻¹⁰’a kadar dilüsyonları hazırlanarak MRS agara yayılmıştır. Petriler 37°C’de 48 saat aerobik şartlarda inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapılmıştır. Sayımda 30-300 koloni bulunduran petriler esas alınmış ve *L.plantarum* yükü kob/g cinsinden belirtilmiştir.

6.2.3 İstant özelliklerin belirlenmesi

Sinbiyotik toz ürünün instant özelliklerini değerlendirmek amacıyla ürünün ıslanabilirlik, dağılıbilirlik ve çözünürlük özellikleri değerlendirilmiştir.

6.2.3.1 İslanabilirlik

Ürünün ıslanabilirliği, yaklaşık 10 g örneğin 27°C’de 100 ml distile suda ıslanıp suyun yüzeyine tamamen nüfuz etmesi için gereken, saniye cinsinden süre olarak saptanmıştır (Schubert, 1980).

6.2.3.2 Dağılıbilirlik

Dağılıbilirlik özelliği Shittu and Lawal’ın (2007) tanımladığı yöntemle belirlenmiştir. Yaklaşık 10±0,001 g örnek 27°C’de 100 ml distile suda 1 dk elle karıştırılarak çözülmüştür. Karışım, asılı partiküllerin çökmesi için 30 dk kendi haline bırakılmıştır. Sürenin sonunda ağırlığı belirli bir ölçü kabına 50 ml süpernatant alınarak tartılmıştır. Ürünün dağılıbilirliği % olarak aşağıdaki formül ile belirlenmiştir:

$$\% \text{ Dağılıbilirlik} = \left[\frac{2 \times (50 \text{ ml süpernatant ağırlığı (g)} - 50 \text{ ml distile suyun ağırlığı})}{\text{örnek ağırlığı}} \right] \times 100$$

6.2.3.3 Çözünürlük

Ürünün çözünürlüğü Takashi and Seibi’nin (1988) yöntemi ile belirlenmiştir. 5 g örnek 50 ml distile suda 30°C’de 30 dk boyunca karıştırılmıştır. Oluşan süspansiyon 9500 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kurutma kaplarına aktararak 105°C’de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuştur. Tartım sonrası ürünün çözünürlüğü % cinsinden belirlenmiştir.

6.2.4 Duyusal değerlendirme

Elde edilen sinbiyotik toz ürünün zenginleştirme amaçlı kullanımını değerlendirmek için yapılan tatlı denemesinde eklenebilecek en fazla oranı belirlemek amacıyla duyusal analiz gerçekleştirilmiştir. Yapılan duyusal değerlendirmede, yeni ürün geliştirmede ve örneklerin duyusal kalitelerinin kıyaslanmasında kullanılan sıralama testi uygulanmıştır. Sıralama testi, bir karakteristiğin yoğunluğu bakımından artan veya azalan bir sıra ile üç veya daha fazla örneğin panelistler tarafından sıralanmasına dayanmaktadır. Bu testte örnekler tercih derecesine veya genel kalite, renk, hacim, sertlik, lezzet şiddetleri gibi özelliklerine göre sıralanabilmektedir (Altuğ ve Elmacı, 2005).

Bu tatlı denemesinde ticari krem tatlının toz formuna %5, %10, %15 ve %20 oranında sinbiyotik toz ürün eklenmiştir ve tatlı ticari prosedüre uygun olarak süt ile hazırlanmıştır. Ticari krem tatlının seçiminde sinbiyotik toz ürünle aynı formda olması, hızlı bir şekilde ve sıcaklık uygulaması gerektirmeden tüketime hazır hale getirilmesi nedeniyle sinbiyotik ürünün canlılığını etkilemeyecek olması dikkate alınmıştır. Hazırlanan zenginleştirilmiş krem tatlılar genel tercih derecelerine göre sıralamaları için 15 paneliste sunulmuştur. Sıralama testi için hazırlanan form şekilde gösterilmiştir.

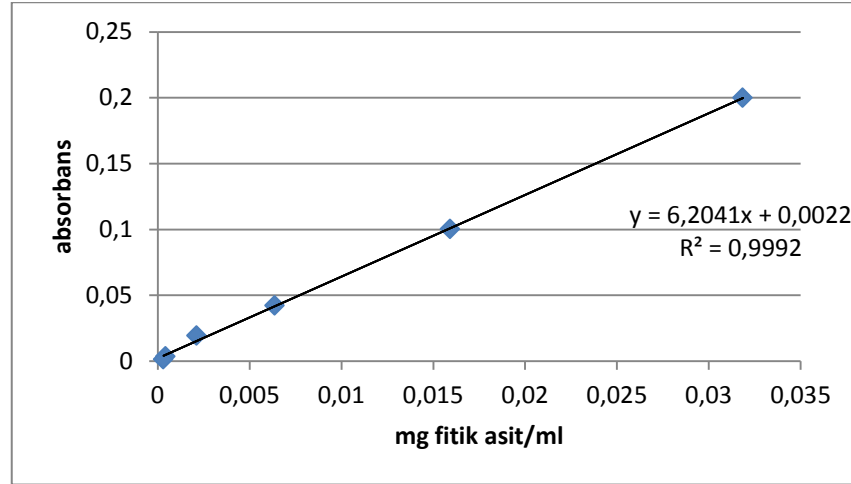
Panelistin Adı Soyadı: Ürün: Sinbiyotik Krem Tatlı	Tarih: / / Saat:
Size sunulmuş 4 örneği soldan başlayarak tadınız. En çok tercih ettiğiniz birinci sırada, en az tercih ettiğiniz ise en alt sırada olmak üzere örnekleri sıralayınız. Teşekkür ederiz.	
	<u>Örnek Kodu</u>
En çok	1.
	2.
	3.
En az	4.

Şekil 6.3: Sıralama testi değerlendirme formu

6.2.5 Fitik asit analizi

Fermente ürün yapımı aşamasında, fermantasyon öncesi ve fermantasyon sonrası alınan örneklerde Talamond et al. (1998) tarafından geliştirilen ve Ledesma et al. 'nın (2005) modifiye ettiği spektrofotometrik yöntem ile fitik asit miktarı belirlenmiştir: Fermantasyon öncesi ve fermantasyon sonrası alınan örnekler dondurularak kurutulduktan sonra 1,8 g örnek, fitik asit ekstraksiyonu için 25 ml 0,5 M HNO₃ ile karıştırılıp oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosunda 3-4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda örnek 4000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant süzülerek ekstrat elde edilmiştir. 1 ml ekstrata 0,90 ml distile su ve 1 ml 50 µg/ml Fe⁺³ çözeltisi eklenip tüpler vortekslenmiş ve 15 dk demir-fitat şelatı oluşumu için bekletilmiştir. Tüpler kaynayan su banyosunda 20 dk bekletildikten sonra soğuk su banyosunda oda sıcaklığına soğutulmuştur. Her tüpe 1 ml distile su ve 0,05 ml 100g/l NH₄SCN çözeltisi eklenip vortekslenildikten sonra 465 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

Standart grafiğini oluşturmak için fitik asit sodyum tuzu hidrati ($C_6H_6Na_{12}O_{24}P_6$) kullanılmıştır. Tartılan fitik asit sodyum tuzu hidrati 0,5 M HNO_3 ile çözülerek 6 farklı konsantrasyonda standart çözeltileri hazırlanmıştır ve bu çözeltilerde ekstrada uygulanan tüm işlemler tekrarlanmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ile denklem elde edilmiştir (Bkz. Şekil 6.4).



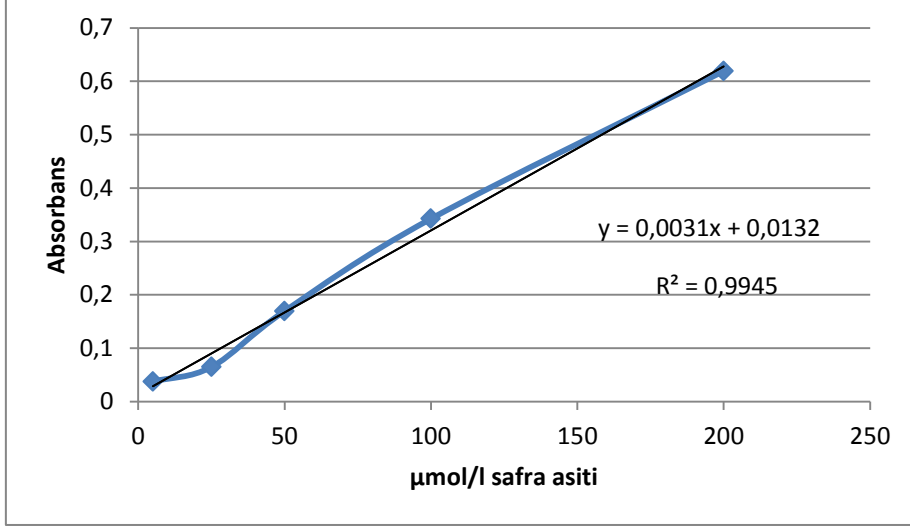
Şekil 6.4: Fitik asit standart grafiği

6.2.6 Safra asidini bağlama kapasitesi

Ürünün safra bağlama kapasitesinin tayini için Kahlon and Smith (2007) tarafından oluşturulan *in vitro* safra asidi bağlama analizi uygulanmış ve sonuçlar kolestramin eşdeğeri olarak “yüzde, (%)” cinsinden belirlenmiştir.

Falcon tüplere tartılan 100 mg örnek üzerine 1 ml 0,01 N HCl çözeltisi eklenerek çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüplere 0,1 ml 0,1 N NaOH eklenerek pH 6,3’e ayarlanmıştır. Her tüpe sırasıyla 4 ml 720 μ M safra asidi karışımı (glikokolik asit, deoksikolik, taurokolik asit ve kolik asit içeren), 4 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 6,3) ve 5 ml pankreatin çözeltisi (10 mg pakreatin/ml fosfat tamponu) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Tüpler tekrar çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 1 saat inkübe edildikten sonra 25°C’de 10000 g 10 dk santrifüj edilerek süpernatant alınmıştır. Negatif kontrol olarak selüloz (safra asidi bağlamayan lif), pozitif örnek olarak kolestramin (safra asidi bağlayıcı aniyonik resin) kullanılmıştır. Süpernatantta bulunan bağlanmamış safra asitleri safra tanı kiti kullanılarak analiz edilmiş ve kolestraminin safrayı %100 bağladığı kabul edilerek örneklerin safra bağlama yüzdesi hesaplanmıştır.

Örneklerde serbest halde bulunan safra asitleri safra tanı kiti ve safra asidi kalibratörleri kullanılarak spektrofotometrik yöntemle 530 nm dalga boyunda analiz edilmiş ve $\mu\text{mol/l}$ cinsinden belirlenmiştir. Şekil 2.5’de 5, 25, 50, 100 ve 200 μM safra standartları kullanılarak hazırlanan standart grafiği verilmiştir.



Şekil 6.5: Safra asidi standart grafiği

6.2.7 *In vitro* sindirim

Sinbiyotik toz ürünün sindirim modeli Minekus et al. (2014) tarafından oluşturulan *in vitro* sindirim protokolü kullanılmıştır. Yöntemde kullanılan sindirim sıvılarının bileşimi ve hazırlama protokolü Çizelge 6.1’de gösterilmiştir.

Ağız fazı: 5 g örnek, sırasıyla 150 U/ml α -amilazı içeren STS ile 5:4 (a/h) ve 25 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ karıştırılmış, su ile 10 ml’ye tamamlanmış ve 37°C, 75 rpm’de 2 dk inkübe edilmiştir.

Mide fazı: Ağız fazından gelen örnek, sırasıyla 1000 U/ml pepsin içeren SMS ile 5:4 (h/h) ve 15 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ karıştırılmış, su ile 20 ml’ye tamamlanmış, pH 3,0’e ayarlanmış ve 37°C, 75 rpm’de 2 saat inkübe edilmiştir.

Duedonal faz: Kimüs sırasıyla 100 U/ml pankreatin ve 10mM safra içeren SDS ile 5:4 (a/h) ve 30 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ karıştırılmış, su ile 40 ml’ye tamamlanmış, pH 7,0’e ayarlanmış ve 37°C, 75 rpm’de 2 saat inkübe edilmiştir. Sindirimi durdurmak için 400 μl 25 μM Pefablok eklenmiştir.

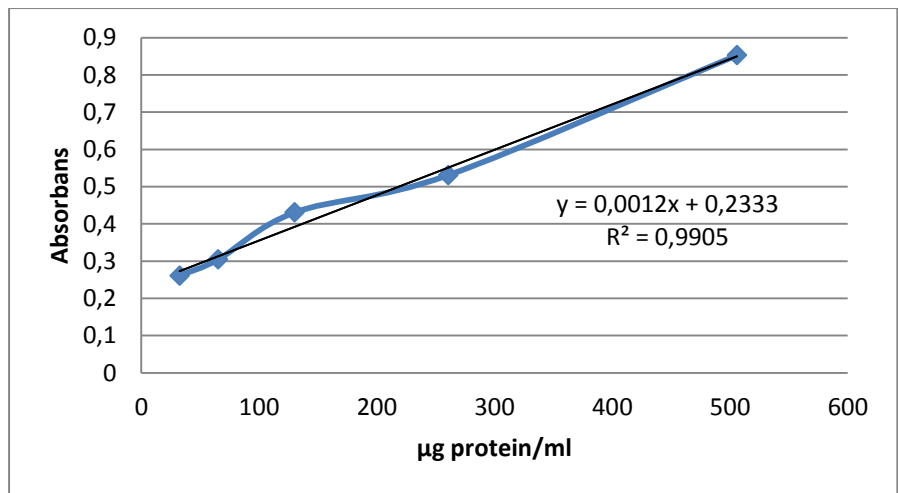
Çizelge 6.1: Sindirim sıvılarının bileşimi

Simüle Tükürük Sıvısı(STS)			Simüle Mide Sıvısı(SMS)			Simüle Duodenal Sıvı(SDS)		
pH 7			pH 3			pH 7		
Hacim	Bileşen	Stok	Hacim	Bileşen	Stok	Hacim	Bileşen	Stok
ml		g/l	ml		g/l	ml		g/l
10	KCl	46,8	28	KCl	46,8	5.4	KCl	46,8
20	KH ₂ PO ₄	68	0.9	KH ₂ PO ₄	68	0.8	KH ₂ PO ₄	68
4	NaHCO ₃	84	6.5	NaHCO ₃	84	42.5	NaHCO ₃	84
1	NaCl	120	10	NaCl	120	8	NaCl	120
1	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	2	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30	1.1	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5
pH ayarlamak için			pH ayarlamak için			pH ayarlamak için		
ml		mol/l	ml		%	ml		mol/l
4	NaOH	1	3	HCl	32	0.5	NaOH	1
1	HCl	1				0.3	HCl	1

Distile su ile 400 ml'ye tamamlanır ve -20° C'de depolanır.

6.2.8 Protein analizi

Sindirilmiş örneklerin protein miktarı modifiye edilerek kullanılan Bradford yöntemi ile saptanmıştır (Bradford, 1976). *In vitro* sindirimden gelen 150 µl örnek üzerine 150 µl Bradford reaktifi eklenmiş ve 15 dakika 25°C'de inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış sığır serum albumini (BSA) standardıyla çizilen kalibrasyon grafiğinden (Şekil 2.6) yararlanarak örnekteki protein miktarı belirlenmiştir.



Şekil 6.6: Bradford standart grafiği

6.2.9 ADE inhibisyon aktivitesi

Sinbiyotik toz ürünün sindirim öncesi ve sindirim sonrası sahip olduğu ADE inhibisyon aktivitesinin belirlenmesinde Bünning and Riordan (1979)'ın oluşturduğu ve Lahogue et al. (2010) tarafından modifiye edilen HPLC yöntemi kullanılmıştır.

6.2.9.1 Örneğin hazırlanması ve HPLC analizinin uygulanması

Tampon çözeltisi: 0,3 M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl çözeltisi, pH 7,5

Substrat çözeltisi: FAPGG son konsantrasyonu 2,5 μ M olmak üzere tampon çözeltide çözülmüştür.

İnhibitör çözeltisi: *in vitro* sindirimden gelen, 3000 Da membrandan geçirilmiş ve liyofilize edilmiş örnekler tampon ile 3 farklı konsantrasyonda çözülmüştür.

Enzim çözeltisi: ADE son konsantrasyon 100 mU/ml olacak şekilde tampon çözelti ile çözülmüş ve yaklaşık 250 μ l hacimlerde ependorf tüplere ayrılarak -20°C'de analize kadar depolanmıştır.

Mobil faz: 0,02 M nonilamin çözeltisi H₃PO₄ ile pH 2,4'e ayarlanmıştır. Hazırlanan nonilamin çözeltisi 67,5:32,5 (h/h) oranında asetonitril ile karıştırılmıştır. Çalışmada kullanılan mobil faz çözeltileri hazırlandıktan sonra mavi bant filtre kağıdından süzölmüş ve analizden önce 30 dk degas edilmiştir.

Ependorf tüplerde sırasıyla 125 μ l tampon çözeltisi, 100 μ l substrat çözeltisi ve beş farklı konsantrasyonda inhibitör bulunduran 50 μ l inhibitör çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Kontrol grubu için ise inhibitör çözeltisi yerine tampon çözelti kullanmıştır. Bu karışımlar üzerine 25 μ l enzim çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatılmış ve karışım 37°C'de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 200 μ l metanol eklenmiştir.

Mobil faz akış hızı 1 ml/dk olan oda sıcaklığındaki sisteme 100 μ l örnek enjekte edilmiş ve $\lambda=305$ 'de DAD dedektör ile analiz edilmiştir.

6.2.9.2 ADE inhibisyonunun hesaplanması

Örneğin ADE inhibisyonunun belirlenmesi inhibitör varlığında ve yokluğunda HPLC’de elde edilen FAP pik alanlarının farkına dayanır. FAP ve FAPGG izokritik olarak oda sıcaklığında ayrılmaktadır. FAPGG ve FAP bileşenlerinin alıkonma süreleri sırasıyla $7,44 \pm 0,24$ ve $11,17 \pm 0,25$ dk’dır. Deneysel hata oranı %3,5’tir. Yüzde inhibisyon aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır:

$$ADE \text{ inhibisyonu (\%)} = [1 - (A_{inhibitör}/A_{kontrol}) \times 100]$$

$A_{inhibitör}$: inhibitör varlığında FAP pikinin kısmi alanı

$A_{kontrol}$: inhibitör olmayan kontrol örneğinde FAP pikinin kısmi alanı

Beş farklı konsantrasyonda sinbiyotik toz ürün ile elde edilen % ADE inhibisyonu (I) değerleri ile oluşturulan grafiğin eğim denklemi oluşturulmuştur ve CI_{50} değeri elde edilmiştir. Oluşan denklemde değerler şu şekildedir:

$$y = a/[1 + (b/x)^n]$$

y: % ADE inhibisyonu (I)

a: maksimum inhibisyon (I_{max})

b: %50 inhibisyona denk gelen konsantrasyon (IC_{50})

x: inhibitör konsantrasyonu (C)

n: Hill katsayısı (eğrinin eğimi, ADE’nin bağlayıcı bölgelerinin sayısı)

6.3 İstatistiksel Analiz

IC_{50} değerleri GraphPad Prism 6 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Duyusal analiz sonuçlarına varyans analizi uygulanmıştır (Kramer and Twigg, 1984). Verilerin değerlendirilmesi amacıyla SPSS versiyon 18.0 (SPSS Inc., Chiacago, IL) istatistik analiz paket programı kullanılmıştır. İncelenen bir değişken açısından ikiden fazla grubun birbirleriyle karşılaştırılmalarının gerektiği durumlarda değerler arasında fark olup olmadığı One-Way ANOVA ile saptanmış ve farklılık % 95 güven aralığında Tukey’s b testi ile değerlendirilmiştir. İncelenen bir değişken açısından herhangi bir grubun farklı koşullar altındaki tepkilerinde farklılığın olup olmadığını incelemesinde % 95 güven aralığında eşleşmiş örneklem t-testi kullanılmıştır.

7 BULGULAR VE TARTIŞMA

7.1 Çimlendirme

Modifiye edilmiş çimlendirme yöntemi ile 72 saatte ikincil kök ve yeşil yaprak oluşumu gerçekleşmeksizin minimum 5 cm filiz uzunluğu elde edilmiştir (Bkz. Şekil 7.1). Maş fasulyesi, yeşil mercimeğe göre çimlendirme sırasında daha fazla ağırlık kaybına uğramasıyla birlikte ilk ağırlık, çimlenme oranı ve ağırlık kaybı arasında bir regresyon bulunamamıştır (Bkz. Çizelge 7.1, $p>0,01$).

Çizelge 7.1:Tohumların çimlendirme aşamalarındaki kütle değişimleri ve çimlenme oranları

	Ağırlık (g)*			%*	
	Çimlenme Öncesi**	72 Saat Çimlenme***	Çimlenme Sonrası**	Ağırlık Kaybı**	Çimlenme Oranı
Yeşil Mercimek	10,12±0,06 ^a	27,34±1,15 ^b	8,17±0,23 ^c	19,02±1,96 ^A	94,30±2,07 ^A
Maş Fasulyesi	10,06±0,04 ^a	35,46±3,71 ^b	7,61±0,33 ^a	24,32±3,43 ^B	90,71±2,61 ^A

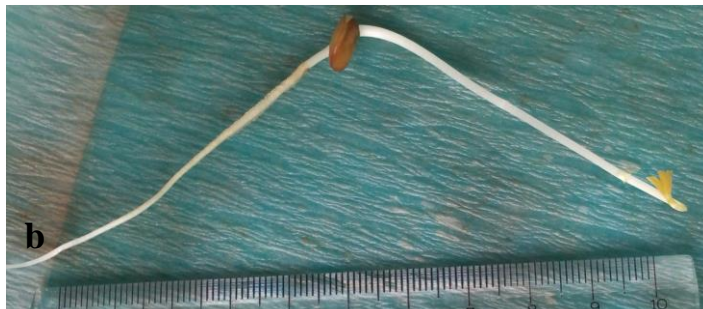
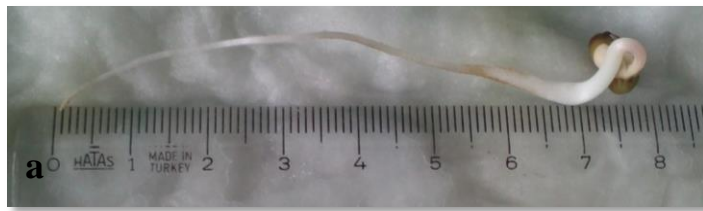
* Değerler Ortalama ± SD olarak verilmiştir.

** Kuru ağırlık esas alınmıştır.

*** Taze ağırlık esas alınmıştır.

^{a-c} Farklı harfler, aynı satırdaki değerler arasındaki farkın $p<0.05$ düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

^{A-B} Farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın eşleşmiş örneklem t-testi sonucunda $p<0.05$ düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 7.1: 72 saat çimlendirilmiş (a) Maş fasulyesi (b) Yeşil mercimek

Kuru tanelerin çimlenme olayı sırasında su alması sonucu enzimlerin aktif duruma geçmesi ile birlikte tohumlarda metabolik aktiviteler ve buna bağlı olarak yağ, fosfor içeren bileşikler, kompleks karbonhidrat ve protein yıkımı başlar (Miransari and Smithc, 2014). Bu enzimatik hidrolizler sonucu, çimlendirilmiş tohumların beslenme açısından daha kolay sindirilirliğinin işareti olan suda çözünür kuru madde oranı artar (Dilber vd., 2003). Tohumun kök ve sürgün vermesi için gereken enerjiyi üretmek adına depo dokusu olan nişasta hidroliz edilir. Bu olaylar sonucunda tohumda toplam ağırlık düşüşü gerçekleşir (Khalil and Mansour, 1994; Grawel and Jood, 2009). Yapılan çimlendirme çalışmalarında kök uzunluğu arttırıldıkça ve çimlendirme süresi uzadıkça toplam kuru madde miktarının azaldığı belirlenmiştir (Dilber vd., 2003; Tian et al., 2010).

Martin et al. (2008) çeşitli bakliyalara uyguladıkları 25°C'de 96 saat çimlendirme %84-100 arasında yüksek çimlenme oranlarına sahip olmalarına rağmen sadece Dolichos fasulyesi 5 cm'i geçip 5,9 cm filiz uzunluğuna erişebilmiştir.

Tian et al. (2010) 16°C'de 144 saat yulaf tohumlarını çimlendirmiş ve kök-filiz uzunluğu arttıkça ağırlığın azaldığını ve yüksek solunum nedeniyle en fazla kuru madde kaybının çimlendirmenin 48-72 saatleri arasında gerçekleştiğini belirlemiştir. 72 saat sonunda yulafın ağırlık kaybı %10-12 arasında, kök uzunluğu ise 2-3 cm arasında bulunmuştur.

Uygulanan modifiye çimlendirme literatürdeki diğer uygulamalarla karşılaştırıldığında çimlenme oranı ve filiz uzunlukları açısından daha üstün sonuçlar vermiştir. Tohumda gerçekleşen metabolik aktivitelerin ve kök-filiz oluşumu için nişastanın katabolize edilmesinin sonucu olarak da literatürde kaydedilen sonuçlardan daha fazla ağırlık kaybı gerçekleşmiştir.

7.2 Probiyotik ve Prebiyotik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Elde edilen liyofilize toz ürünün dondurarak kurutma işleminden sonraki probiyotik mikroorganizma yükünün ve matris içinde uygulanan enkapsülasyonun mide ve bağırsak koşullarında hücrelerin canlılığına etkisinin gözlemlenmesi için yapılan canlı sayımı sonuçları Çizelge 7.2'de özetlenmiştir. Çalışmada sinbiyotik lapa matrisinde serbest halde bulunan *L.plantarum* hücrelerinin mide-bağırsak koşullarına dayanıklılığını arttırmak için YST ve prebiyotik bileşenlerden yararlanılmış ancak birebir enkapsülasyon işlemi uygulanmamıştır.

7.2.1 Kriyoprotektan kullanımının liyofilizasyon işleminde canlılığa etkisi

Prebiyotik ekleme aşamasında eklenen YST+inülin-FOS karışımı, dondurarak kurutma işlemi sonucunda toz ürünün %30'unu oluşturmuştur. Kontrol örneğinde ise prebiyotik ve YST kullanılmadığı için, aynı oranda daha fazla canlı bulundurması beklenmiştir ancak sinbiyotik toza göre daha düşük mikroorganizma yüküne sahiptir ($p < 0,05$).

Çizelge 7.2: Sinbiyotik tozlarda bulunan canlı *L.plantarum* sayısının sindirim sıvılarında inkübasyon sıradaki değişimi.

	Log kob / g*			
	Sindirim öncesi	Sindirim sonrası		
		0 dk	Mide 90 dk	Bağırsak 270 dk
Kontrol**	7,70±0,42 ^{a,A}	4,31±0,22 ^{c,A}	4,35±0,26 ^{c,A}	5,29±0,25 ^{b,A}
Sinbiyotik toz	8,56±0,33 ^{a,B}	5,67±0,43 ^{c,B}	6,14±0,28 ^{bc,B}	6,92±0,33 ^{b,B}

* Değerler Ortalama ± SD olarak verilmiş.

** Kontrol "Prebiyotik Ekleme" aşaması uygulanmayan örnektir.

^{a-c} Farklı harfler, aynı satırdaki değerler arasındaki farkın $p < 0,05$ düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

^{A-B} Farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın eşleşmiş örneklem t-testi sonucunda $p < 0,05$ düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

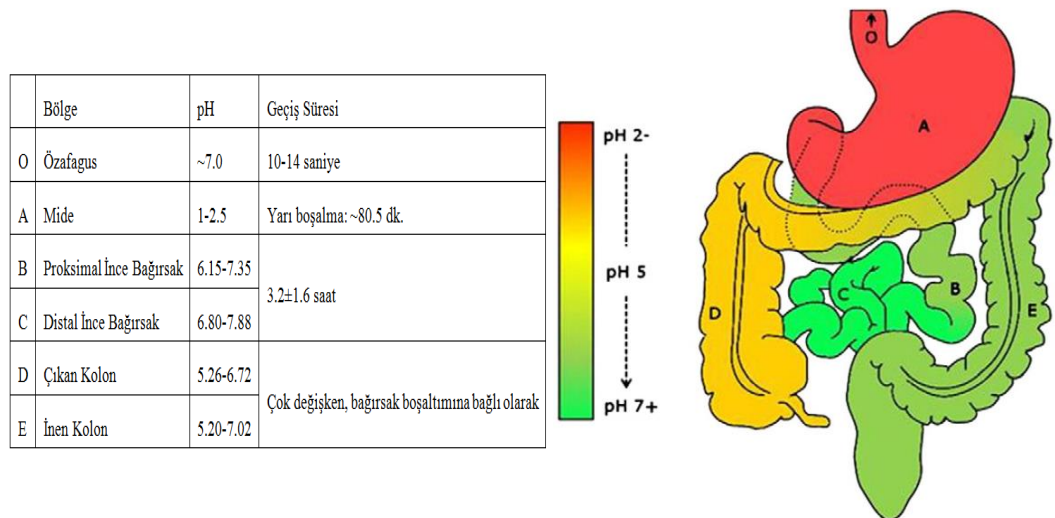
Homojenizasyon (Capela et al., 2007; Ding and Shah, 2009) ve dondurma (Hamoudi et al., 2007; Semyonov et al., 2010; Rajam et al., 2012) işlemleri canlı mikroorganizma kaybına neden olmaktadır. Bu etkenlere rağmen sinbiyotik tozun kontrolden daha fazla canlılığa sahip olmasının nedeni kullanılan YST'nun donmaya karşı koruyucu etkisinden kaynaklanmaktadır. Donma sırasında hücre dışı ortamda oluşan buz kristalleri büyüdükçe donmamış kısmın çözünmüş madde konsantrasyonunda artış gerçekleşir. Konsantrasyondaki artış sonucu oluşan osmotik basınç, donmamış kısımda bulunan hücrelerde dehidrasyona neden olur. YST'nun koruyucu etkileri ise hücre dışında bulunan sıvının yoğunluğunu arttırarak donma öncesi hücrenin osmotik strese adapte olmasına yardımcı olması ve camsı geçiş sıcaklığını yükselterek kristalleşme gerçekleşmeden sıvının katı faza geçmesini kolaylaştırmasıdır (Capela et al., 2006; Fowler and Toner, 2006; Jagannath et al., 2010; Tripathi and Giri, 2014). Sonuç olarak YST'nun donmanın mikroorganizmaların hücre canlılığına verdiği zararı azalttığını söyleyebiliriz.

7.2.2 Liyofilize tozun mikrobiyal yükünün *in vitro* koşullarda değişimi

Örneklere ait mikroorganizma yükü *in vitro* uygulamalar karşısında benzer rejim göstermiştir. Ancak mide koşullarında (% 0,3 (a/h) pepsin, pH 2,5) kontrol grubunun mikroorganizma yükünde sinbiyotik toza göre daha fazla kayıp olmuştur. Bu sonuç enkapsülasyon ile 90 dk sonunda mide koşullarına dayanan daha fazla mikroorganizmanın ince bağırsağa ulaşmasının sağlandığını göstermektedir.

Yüksek asit düzeyinden dolayı enkapsüle probiyotiklerde en fazla canlılık kaybı midede gerçekleşir (Bkz. Şekil 7.2). Serbest hücreler mide ortamında hızla canlılığını kaybederken gıda matrisi veya YST+inülin-FOS karışımı içinde tutuklu kalmış hücreler enzim ve düşük pH'dan kaynaklı hidrolizler sonucunda serbest kalmadan önce daha geç mide sıvısıyla temasa geçer. Probiyotiklerin mide pH'sına ve pepsine direnç gösteren matris içinde tutuklanması mideye ulaşan probiyotiklerin bir kısmının canlılığını koruyarak incebağırsağa ulaşması sağlanabilir. Bu amaç için süt proteinlerinin kullanımı yaygındır (Cook et al., 2012; Kent and Doherty, 2014).

Dupont et al. (2010) çiğ ve pastörize sütü *in vitro* mide-bağırsak koşullarına tabi tutmuş ve pastörizasyon işleminin kazein proteinlerinin sindirime direncini artırırken peynir altı suyu proteinlerinin sindirilirliğini arttırdığını gözlemlemiştir. Bu *in vitro* çalışmada iki sütte de kazein proteinlerinin mide koşullarında 20-40 dk sonrasında sindirildiği ve en dirençlilerinin κ - ve α_2 -kazein olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında majör peynir altı suyu protein β -lg (18 kDa) mide ve bağırsak koşullarında sindirilmemiş olarak kalmıştır.



Şekil 7.2: Mide bağırsak bölgesinin karakteristikleri (Cook et al., 2012)

Gbassi et al. (2009) *L.plantarum* spp hücrelerini aljinat jeline hapsetme tekniğiyle enkapsüle etmiş ve elde ettiği kapsülleri denatüre edilmemiş peynir altı suyu protein ile kaplamıştır. 10 log kob/g canlı içeren kapsüller mide koşullarına tabi tutulduğunda pepsin varlığında α -laktalbumin ve sığır serum albümin peptitlere parçalanırken β -lg bozulmamış halde kaldığı belirlenmiştir. Çalışmanın sonucu olarak kontrol örneği mide koşullarında 90 dk sonra canlılığını tamamen kaybederken peynir altı suyu proteini ile kaplanmış kapsüller 120 dakikada 5 log azaldıktan sonra bağırsak koşullarına tabii tutulmuş 180 dk sonra 2 log kob/g'a inmiştir.

Enkapsülasyon materyali olarak en çok tercih edilen peynir altı suyu proteinleri pI (pH=4,8)'nın altında pozitif yüklü moleküllerin arasındaki elektrostatik itmeler nedeniyle yüksek çözünürlüktedir. Artan elektrostatik itme sonucu kaplama materyalinde açılmalar ve kaplanan hücrelerin serbest kalması gerçekleşir (LaClair and Etzel, 2010; Dolly et al., 2011).

Prebiotiklerin midede sindirilmemesinin yanında probiyotik canlılığın sürdürülmesine yararı, asitten dolayı oluşan hasarların onarılması için karbon kaynağı sağlamasıdır (Donkor et al., 2007; Paseephol and Sherkat, 2009) ancak probiyotikler öncelikle inülininden daha kolay metabolize olan basit şekerleri kullanacaktır (Nualkaekul et al., 2012). Bu çalışmada da sinbiyotik toz ürünün öncelikle laktoz olmak üzere FOS ve inülin içeriğiyle mide koşullarına maruz kalan hücrelerin canlılığını desteklediği düşünülebilir.

Bağırsak koşullarında (% 0,5 (a/h) safra tuzu içeren MRS broth, pH 7.4) 3 saat boyunca inkübe edilen örneklerin mikrobiyal yükünde istatistiksel açıdan önemli artış olmamıştır. Sinbiyotik tozda gerçekleşen canlı sayısındaki artış ise kapsüllerden hücre salınımının devam ettiğine bağlanabilir.

Dolly et al. (2011) peynir altı suyu protein kullanarak dondurarak kurutma ile enkapsüle ettiği *L.plantarum* (mtcc 5422) canlılığının hem mide koşullarına (%3 pepsin, pH 2,0) hem de bağırsak koşullarına (%2 safra tuzu) 2 saat boyunca stabil kaldığı ve sonra azalma eğilimi gösterdiği, bunun yanında kontrol örneğinin her iki ortamda da sürekli azalma göstererek 4 saat sonunda canlılığın tamamen bittiğini gözlemlemiştir. Ayrıca bağırsak koşullarında ilk 2 saat içinde artma görülmesinin sebebini serbest hücrelere ek olarak enkapsüle hücrelerin serbest kalmasına bağlamıştır. Rajam et al. (2012) aynı çalışmayı doğal ve denatüre peynir altı suyu proteinini 1:1 oranında aljinat ile karıştırarak gerçekleştirmiştir ve

peynir altı suyu proteinin denatüre edilmesinin canlılığı koruma sırasında dahi iyi koruduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada ise mide koşullarında denatüre peynir altı suyu+aljinat kullanılan enkapsülasyonda ilk 1 saatte azalma ve sonrasında stabilite görülmüştür. Doğal peynir altı suyu+aljinat enkapsülasyonunda ise mide koşullarında ilk 1. saatte tolerans, sonraki 1 saatte canlılıkta azalma, sonraki 1 saatte artış ve son 1 saatte tekrar azalma görülmüştür. Bu rejim yazarlar tarafından yüzeye tutulu olan hücrelerin ilk 2 saatte çok az bir miktarı serbest kalırken sonraki 1 saatte salınımın hızlanması ve sonra mide koşullarına savunmasız kalan hücrelerin canlılığı yitirmesi olarak açıklanmıştır. Aljinat mide koşullarına daha hassastır ve peynir altı suyu proteinler başlangıçta sindirime direnç gösterse de zamanla mide sıvısına teması arttıkça kaplama materyali şişmeye ve açılmaya başlamıştır. Bağırsak koşullarında ise denatüre peynir altı suyu+aljinat kapsülleri ile 4 saat boyunca sabit canlı sayısı sağlanırken peynir altı suyu+aljinat kapsüllerinde 1 saat sonra azalma başlamış ve 4 saat sonunda kontrol ile aynı yüke sahip olmuştur. Ancak iki çalışma arasında kontrol örneklerinin mide koşullarında 2, bağırsak koşullarında 1 saat sonunda sabit canlılık sürdürmesi ilgi çekici bir farktır.

7.2.3 Liyofilize tozun prebiyotik aktivitesi

Kimüs incebağırsaktan ortalama 3 saat içerisinde kolona ulaşmaktadır (Cook et al., 2012). Örneklerin bağırsak koşullarında 6 saat inkübasyonu sonunda her iki örnekte de canlı sayısı başarılı şekilde yükselmiştir ($p<0,05$). Bağırsak koşullarında sinbiyotik etkileşim nedeni ile inülin-FOS karışımı içeren sinbiyotik tozda kontrol örneğinden daha fazla mikroorganizma artışı beklenmiştir ancak istatistiksel anlamda fark görülmemiştir. Bu da her iki grupta da tahıl-baklagil-kuruyemiş karışımından gelen prebiyotik bileşenlerin *L.plantarum* 'un gelişmesini desteklediğini göstermektedir.

Zubaidah and Akhadian (2013) 1:9 (a/a) oranında çeşitli inülin kaynağı yumrularından elde ettikleri inülin ekstraktları ile MRS Broth'u karıştırarak oluşturduğu besiyerinde *L.plantarum* ve *L.casei* 37°C'de 36 saat inkübasyona bırakıldığında kontrol örneğine göre inülin içeren ortamdaki mikroorganizma sayısının daha çok arttığı görülmüştür. Kontrol grubu 24 saat sonunda hızlı bir düşüş gösterirken inülin içeren ortamdaki canlılık artmaya devam etmiş (log faz) veya durgun faza ulaşmıştır.

Sathyabama et al. (2014) *Staphylococcus succinus* ve *Enterococcus fecium*'un hapsetme tekniğiyle enkapsülasyonunda aljinat jeline 1:1 (a/a) hindibadan etanol ile ekstrakte edilen prebiyotikleri eklemiş ve 8 log kob/ml başlangıç mikroorganizma yüküne sahip kapsül süspansiyonlarını *in vitro* sindirime tabi tutmuştur. *In vitro* sindirim koşulları mide için 3 mg/ml pepsin, pH 3, 2 saat ve bağırsak için 1 mg/ml pankreatin, 7ml h/h safra, pH 8.0, 6 saat olarak belirlenmiştir. Enkapsüle *S. succinus* canlılığında mide koşullarında 0,7 log kob/ml ve takiben bağırsak koşullarında 0,3 log kob/ml azalma olurken, kontrolde ise 0,6 log kob/ml ve 1,3 log kob/ml azalma olmuştur. *E. fecium* için bu değerler 0 log kob/ml (azalma yok) ile 0,1 log kob/ml ve kontrol için 0,4 log kob/ml, 0,4 log kob/ml'dir.

Başlangıçta $4,32 \cdot 10^8$ kob/g içeren sinbiyotik toz ve $6,65 \cdot 10^7$ kob/g içeren enkapsüle olmayan kontrol örneği bulundurdıkları canlı sayısı nedeniyle probiyotik özellik taşımıştır. Örneklere ait mikroorganizma yükünün *in vitro* uygulamalar karşısındaki genel rejimin sonucu olarak kontrol örnekte toplam 3,35 log kob/g, sinbiyotik tozda ise toplam 2,42 log kob/g azalma görülmesi YST+inülin-FOS karışımının kullanılmasının *L.plantarum* canlılığının mide-bağırsak koşullarına dayanıklılığını arttırdığını göstermiştir. Ayrıca uygulanan uzatmalı bağırsak inkübasyonu sonucunda canlılığın her iki grupta da artma eğilimi göstermesi ürünün probiyotik canlılığı destekleyecek prebiyotik bileşenleri bünyesinde bulundurduğu ve bu sebeple sinbiyotik özellik taşıdığı belirlenmiştir.

7.3 İstant Özellikler

Fermente sinbiyotik lapaya uygulanan iki farklı kurutma işleminden sonra maksimum 0,3 mm çapında öğütülmesiyle elde edilen tozların sahip oldukları rekonstitüsyon özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan fiziksel analiz sonuçları Çizelge 7.3'de özetlenmiştir. İki yöntemle kurutulan tozların ıslanma süreleri ve çözünme oranları farklılık gösterirken ($p < 0,05$), dağılma oranları anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$).

Çoğu gıda ürünü için hızlı ıslanma süresi 250-300 μm 'den büyük partiküllerde görülmektedir (Bhandari et al., 2013). Çalışma kapsamında elde edilen tozlar aynı çap elekten (0,3 mm) geçirilmesine ve aynı kompozisyona sahip olmasına rağmen ıslanma süreleri farklı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Islanabilirlik toz parçalarının kendisi ile nüfuz edecek sıvı yüzeyi arasındaki yüzey geriliminin üstesinden gelme gücü olarak ifade edilir (Fang et al., 2008) ve ıslanma süresi ya da ıslanabilirlik tüm partiküllerin ıslanıp suyun yüzeyine tamamen nüfuz etmesi için gereken süredir (Schubert, 1980).

Çizelge 7.3: Sinbiyotik tozların rekonstitüsyon özellikleri

Kurutma Yöntemi	Zaman (s)*	%*	
	Islanabilirlik	Dağılabilirlik	Çözünürlük
Konvansiyonel	362±15,68 ^a	5,52±0,042 ^a	50,19±1,34 ^a
Liyofilizasyon	2894±14,49 ^b	7,67±0,208 ^a	54,34±2,06 ^b

* Değerler Ortalama ± SD olarak verilmiş.

^{a-b} Farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın eşleşmiş örneklem t-testi sonucunda p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

Tozların suda rekonstitüsyonunu ıslanma, batma, dağılma ve çözülme olarak dört adıma ayırmak mümkündür. Rekonstitüsyon adımları içerisinde genellikle partiküllerin ıslanması, çözülme hızını kontrol eden adımdır (Kim et al. 2002). Hızlı ıslanmanın, toz parçaları ve sıvı yüzeyi arasında küçük temas açısı olduğunda, büyük porlar oluşturan büyük partiküllerde ve kritik küme porozitesini aşmayacak şekilde yüksek poroziteye sahip partiküllerde meydana geldiği görülmüştür (Kim et al. 2002; Fang et al., 2008; Bhandari et al., 2013).

Islanma, katının yüzeyindeki hava fazı ile sıvı fazın yer değiştirmesi işlemidir. Tozların ıslanma hızı, sıvı fazın katıdaki silindirik kapilere akmasına bağlı olarak modellenir ve çoğunlukla yer çekimi etkisini yok sayan Washburn denklemi ile ifade edilir (Fang et al., 2008).

$$\frac{dl}{dt} = \frac{r \gamma}{\eta 4l} \cos \theta$$

dl/dt: kapilere penetre olan sıvının hızı

r: kapiler yarı çap

η: sıvının viskozitesi

γ: sıvının yüzey gerilimi

θ: temas açısı

Dondurarak kurutma yönteminde donma sırasında oluşan buz kristallerinin kurutma aşamasında süblimasyonu sonucu gözenekli yapıya sahip ürünler oluşur ve bu elde edilecek toz ürünün iyi rekontitüsyon özelliği göstermesine yol açar (Stapley, 2008; Anandharamakrishnan et al., 2010). Böylece diğer örnekten daha iyi çözünürlük gösteren liyofilize toz ($p<0,05$), hızlı ıslanması ve şişmesi sonucu çevreleyen suyu yoğunlaştırarak (η /viskozitesini arttırarak) kapillerler içine penetre olmasını yavaşlatır (Kim et al. 2002), su ve partikül arasındaki yoğunluk farkı azaldıkça partiküllerin batması engellenir (Freudig et al., 1999; Fang et al., 2008). Washburn denklemine göre daha yavaş ıslanacağı ön görülen etüvde kurutulmuş örneğin daha kısa sürede ıslanmayı tamamlamasının nedeni ise kurutma işleminden dolayı aldığı fiziksel yapısına bağlanabilir. Konvansiyonel kurutulmuş örnek kapiler bulundurmayan dolayısı ile daha yoğun partiküllere sahiptir. Bu partiküller ağırlıkları nedeniyle daha kolay batacağı (Caric and Milanovic, 2002) için partikülü çevreleyen suyun viskozitesini arttırmadığını ve ıslanma prosesinin daha verimli sürdürüldüğünü söyleyebiliriz.

Sıvı olarak su kullanılan rekonstitüsyon uygulamalarında toz bileşen ne kadar hidrofilik ise temas açısı o kadar daralır. Kim et al. (2002) %51 laktoz (hidroskopik) içeren yağsız süt tozunun ıslanma süresini 600 saniye, %26,6 yağ (hidrofobik) içeren süt tozunun ıslanma süresini 900 saniyeden fazla bulmuştur. Jha et al.'nın (2002) geliştirdiği instant sütlü-pirinçli Hint tatlısı Kheer'in ıslanma süresi 120 saniye olarak belirlenmiştir.

Yeniden sulandırılarak tüketilen gıdalar düşük dağılılabirliğe ve sıklıkla yüksek sedimentasyon hacmine sahiptir (Shittu and Lawal, 2007). Kheer'in dağılılabirliği %69.73-86.51, süt tozunun %95-98, yağsız süt tozunun %86-99 olarak belirlenmiştir (Jha, 2002). Shittu and Lawal (2007) kakaolu içecek tozlarının dağılılabirliğini %50-95 arası olarak belirlemiştir. Toz gıdaların dağılılabirliği çoğunlukla kazeinin çözültide dağılmasına bağlıdır (Varnam and Surherland, 1994; Fang et al., 2008).

Tozların rekonstitüsyonunun son adımı olan çözünürlük, genel rekonstitüsyon kalitesinin anahtar belirleyicisidir (Fang et al., 2008). Shittu and Lawal (2007) kakaolu içecek tozlarının çözünürlüğünün %44-77 arasında değiştiğini belirlemiştir. Szulc and Lenart (2012)'de %40 süt tozu, %33 pirinç lapası, %25 toz şeker, %2 çilek tozu ile ürettiği 495 ± 6 μm partikül büyüklüğüne sahip bebek mamasının ıslanma süresini 180 saniyeden fazla ve 54 ± 1 olarak bulmuş ve süt tozu miktarını arttırdıkça/pirinç lapası miktarı azaldıkça ıslanma

süresinin uzadığını, çözünürlüğünün arttığını belirlemiştir. Elde edilen sinbiyotik tozların yüksek çözünürlükte olması için çimlendirme, fermantasyon, parçalama, haşlama ve boyut küçültme işlemleri uygulanmıştır ancak düşük çözünürlük göstermelerinin sebebi yüksek sedimentasyon hacmine sahip olmasından kaynaklanmış olabilir. Sinbiyotik tozlar instant toz ürünlere göre düşük, bebek mamasının toz formuna göre benzer çözünürlük göstermiştir.

7.4 Duyusal Analiz

Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliğine (2011) göre “Bu gıda probiyotik mikroorganizma içerir. Probiyotik mikroorganizmalar sindirim sistemini düzenlemeye ve bağışıklık sistemini desteklemeye yardımcı olur.” sağlık beyanında bulunulabilmesi için gıda ürününün en az 10^6 kob/g canlı probiyotik mikroorganizma içermesi gerekmektedir ve kullanılan krem tatlının porsiyonu 100 gramdır. Çalışmada elde edilen sinbiyotik toz ürün ortalama $4,32 \cdot 10^8$ kob/g canlı mikroorganizma içermektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, krem tatlı karışımı tozu %5, %10, %15 ve %20 oranında sinbiyotik toz ürün ile zenginleştirilmiş ve ticari tarife göre süt kullanılarak hazırlanmıştır.

Tatlı denemesinde sinbiyotik toz ürünün krem tatlıya en fazla eklenme oranını belirlemek amacıyla yapılan duyusal analizde 15 paneliste 5-10-15-20 g/100 g sinbiyotik toz ürün eklenmiş 4 örnek sunulmuştur. Panelistlerin genel tercih derecesine göre en çoktan en aza yaptıkları sıralama sonucu elde edilen duyusal analiz sonuçları Çizelge 7.4’de verilmiştir. Sonuçlar Kramer and Twigg (1984) hazırladığı “%5 Önem Düzeyinde Gerekli Sıralama Toplamları ($p < 0.05$) Tablosu” kullanılarak analiz edilmiştir (Altuğ ve Elmacı, 2005). Bu tablo kullanılarak 4 işlem ve 15 tekrara karşı gelen üst değerler 28-47 ve alt değerler 30-45 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 7.4’de gösterilen sıralama toplamları alt ve üst değerlerle karşılaştırıldığında, % 5, % 10 ve % 15 oranında zenginleştirilmiş krem tatlılar arasında panelistlerin tercihi açısından % 95 olasılıkla bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p < 0,05$). Bunun yanında % 20 oranında zenginleştirilmiş krem tatlı için sıralama toplamı (49), 30-47 aralığında olmaması nedeniyle panelistler tarafından tercih edilmediği anlaşılmıştır. Bu sonuçlara dayanarak krem tatlıyı %5-%15 aralığında herhangi bir oranda zenginleştirilmenin mümkün olduğu saptanmıştır. Bu nedenle çalışmaya en yüksek düzeyde sinbiyotik toz (15g/100g) içeren örnek ile devam edilmiştir (Bkz. Şekil 7.4).

100 gramında 15 gram sinbiyotik toz ürün içeren tatlı toz karışımının süt ile hazırlanmasından sonra elde edilen 100 gramlık porsiyonunda 2,95 g sinbiyotik toz ürün bulunmaktadır ve bu oran tatlıya $1,28 \cdot 10^7$ kob/g canlı probiyotik mikroorganizma kazandırarak probiyotik özellik katmıştır.

Çizelge 7.4: Dört farklı oranda sinbiyotik toz içeren krem tatlıya uygulanan sıralama testi sonuçları

Panelist	Zenginleştirme oranı (%)			
	5	10	15	20
1	1	2	3	4
2	3	1	2	4
3	2	3	1	4
4	1	4	2	3
5	2	1	3	4
6	2	1	3	4
7	2	3	1	4
8	4	1	3	2
9	1	4	2	3
10	3	4	1	2
11	3	1	4	2
12	2	3	1	4
13	2	4	3	1
14	1	3	2	4
15	1	2	3	4
Sıralama Toplamları	30	37	34	49

Liyofilize sinbiyotik toz $0,3 \pm 0,08$ g/g inülin- FOS karışımı içermektedir. Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliğine (2011) göre gıdanın prebiyotik olması için en az 1,25 g/porsiyon en fazla 3,75 g/porsiyon olması gerekir. Sonuç olarak oluşturulan krem tatlı sadece sinbiyotik tozdan gelen prebiyotik ile (0,885 g/porsiyon) prebiyotik özellik kazanmıştır.



Şekil 7.3: (a) Tahıl bazlı fermente sinbiyotik instant toz (b) Krem tatlı toz karışımı



Şekil 7.4: %15 sinbiyotik toz içeren krem tatlı

7.5 Fitik Asit Analizi

Tahıllarda 3-22 mg/g arasında bulunan fitik asit (fitat, myoinositol hegzafosforik asit, IP6) çoğu tohum ve tahıllarda toplam fosforun %70'ini bulunduran başlıca fosfor depo bileşenidir (Rhou and Erdman, 1995; Garcia-Estapa et al., 1999; Sokrab et al., 2012). Güçlü şelatlama kapasitesine sahip olan fitat katyonlar ile çözülmez bileşikler oluşturarak insanlarda mineral emilimini zayıflatır (Poutanen et al., 2009). Tahıl kepeğinde yüksek miktarda fitik asit bulunur ve bazı kepekler %5'den fazla IP6 içerebilmektedir (Garcia-Estapa et al., 1999; Lehrfeld, 1994). Garcia-Estapa et al. (1999) buğday ve tam tane buğdaydan elde ettiği unların fitik asit içeriğini sırasıyla 4,04±0,41 mg/g ve 22,2±0,90 mg/g olarak belirlemiştir.

Fitik asit fermantasyon, çimlenme, gıda işleme ve insan sindirimi sırasında bağırsakta enzimatik ve kimyasal olarak inositol pentafosfat (IP5), inositol tetrafosfat (IP4) ve inositol trifosfat (IP3) gibi daha düşük inositol fosfatlara hidroliz edilir (Burbano et al., 1995; Sanni et al., 1999). Sadece IP6 ve IP5 formunun mineral biyoyararlılığına negatif etkisi bulunurken diğer hidroliz ürünlerinin mineral bağlama kapasitesi zayıftır ya da oluşan bileşikler daha çözünürdür (Sandberg et al., 1989).

Çizelge 7.5: Fermantasyon ve sterilizasyon ile pH ve fitik asit miktarındaki değişim

	g/100g*		
	Fermantasyon Öncesi	Sterilizasyon Sonrası	Fermantasyon Sonrası
pH	5,37±0,03 ^a	-	3,79±0,08 ^b
Fitik Asit	0,17±0,01 ^a	0,06±0,01 ^b	0,06±0,01 ^b

* Değerler Ortalama ± SD olarak verilmiş

^{a-b} Farklı harfler, aynı satırdaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

Yapılan çalışmalarda fitik asit içeriğinin azaltılması işlemlerinde fermantasyonun üstünlüğü belirtilse de tahıl-çimlendirilmiş bakliyat-kuruyemiş karışımının fitik asit içeriği sterilizasyon işleminde başarılı şekilde azalma gösterirken (p<0,05), takip eden fermantasyon işlemi sonucu azalma gerçekleşmemiştir (Bkz. Çizelge 7.5). Sterilizasyon sırasında fitatın termal bozulmasının sonucu olan bu azalma Dost ve Tokul (2006)'un yaptığı çalışmaya benzer bir durum teşkil etmektedir. Sert buğday unundan (11,9 mg/g fitik asit)

yapılan fermente edilmemiş ekme  ve fermente ekmeğin piŐirildikten sonra sırasıyla 5,2 ve 4,9 mg/g fitik asit içerdiği belirlenmiştir.

Ghavidel and Prakash. (2007) maş fas lyesini ve yeşil mercimeği oda sıcaklığında 24 saat çimlendirme sonrası $50\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de 16–18 saat kurutmuŐ ve fitat miktarında sırasıyla %18 ve %21 azalma olduğunu tespit etmiştir. Khalil ve ark. (1994) baklaya haşlama (45 dk), otoklavlama (su ile karışık 121°C 'de 30 dk), çimlendirme (oda sıcaklığında 3 gün) ve sonrasında bütün ürünlere 50°C de bir gece kurutma uygulamıŐ; çiğ baklada $0,39\pm 0,07$ g/100g olan fitat içeriğini uygulamalar sonrası sırasıyla $0,27\pm 0,03$, $0,23\pm 0,04$ ve $0,18\pm 0,02$ g/100g fitat olarak bulmuştur. Sonuçlar fitatın azaltılmasında en etkili yöntemin çimlendirme olduğunu göstermiştir (%47).

Urbano et al. (1999) mercimeğe 120°C 'de 15 dk kurutma ve 20°C 'de 6 gün  imlendirdiği mercimeğe dondurarak kurutma uygulamıŐ fitat miktarlarını çiğ mercimek için 6,46 mg/g, ısıyla kurutulmuş mercimek için 5,67 mg/g, çimlendirilmiş mercimek için 4,77 mg/g bulmuştur. Fitat miktarının azaltılmasında çimlendirme yöntemi daha verimli bulunmuş ve kurutulmuş mercimekteki azalmanın enzimatik hidrolizden ziyade sıcaklık nedeniyle fitatın hidrolizinden kaynaklandığı belirtilmiştir.

Fermantasyon sırasında fitatın azalması fitaz enziminin çalışması için optimum pH'nın sağlanması sayesinde gerçekleşir. Sanni et al. (1999) mısır, darı, buğday ve soya fasulyesinden oluşan karıŐıma çimlendirme ve fermantasyon uyguladığında fermantasyon sonucu fitat miktarının azaldığını belirlemiştir. LAB ve mayalar fitaz aktivitesine sahip olmasına rağmen fermente tahıl ürünlerinde esas etken endojen tahıl fitazlarıdır. Leenhardt et al. (2005) tam buğday ununu fermente ettiklerinde fitat içeriğinde %70, Lopez et al. (2001) buğday kepeğini LAB ile fermente ettiklerinde fitat içeriğinde %90 azalma olduğunu bildirmiştir (Poutanen et al., 2009).

7.6 Safra Asidi Bağlama Kapasitesi

Safra asitleri karaciğerde kolesterolden sentezlenen asidik steroidlerdir. Karaciğerden taurin ya da glisin ile konjuge olarak daha amfipatik form olan safra tuzlarına dönüşür ve safra kesesinde biriktirilir. Duedonumdan salgılanan safra tuzlarının %80-97'si ileumdan geri emilerek karaciğere ulaşır ve enterohepatik döngüsünü tamamlar (Tok ve Aslım, 2007; Kahlon et al., 2014). Safra asitleri yağ sindirimi için gereklidir ve safra asitlerinin dışkı ile atılması karaciğerde yeniden sentezlenmesine, dolayısıyla kolesterolün azalmasına yol açar (Dziedzic et al., 2012; Kahlon et al., 2014). Bu nedenle sağlıklı gıdaların kolesterol düşürücü potansiyeli *in vitro* safra asidi bağlama kapasiteleri ile değerlendirilebilir.

Konvansiyonel kurutulmuş ve liyofilize edilmiş tozlara ait safra asidi bağlama kapasiteleri önemli bir fark göstermemiştir ($p>0,05$) ancak elde edilen iki ürün de literatüre geçmiş kuru madde bazında en yüksek rölatif safra bağlama kapasitesine sahip tahıl bazlı gıda olmuştur. Etüvde kurutulmuş ve liyofilize edilmiş örneklerin rölatif safra bağlama kapasiteleri sırasıyla %80,33±7,52 ve %72,97±7,1 olarak belirlenmiştir. Bazı yüksek safra bağlama kapasitesine sahip gıdalara örnek olarak yulaf unu %22,1±0,5 (Kim and White, 2012), soya fasulyesi %14,5±0,3 (Kahlon and Woodruff, 2002), bamya %16±0,3 ve pancar % 17,5±0,2 (Kahlon et al., 2007) verilebilir.

Çalışma kapsamında elde edilen toz ürünler değerlendirilirken yüksek dozda probiyotik içerdiği için seyreltilerek kullanılacağı ve dolayısıyla safra bağlama kapasitesinin azalacağı da göz önüne alınmalıdır. Probiyotik ve diyet lifi kaynağı olan sinbiyotik ürünün sahip olduğu yüksek safra bağlama kapasitesinin potansiyel sebepleri farklı çalışmalara ait sonuçlarla değerlendirilebilir.

LAB'nin kolesterolü azaltabilmesinin altında yatan safra bağlama ile direk ilişkili olan mekanizma safra tuzlarının LAB tarafından dekonjugasyonudur (Iranmanesh et al., 2014). Safra tuzları probiyotikler tarafından membranda bulunan histidin spesifik protein kinazlar (HPK) ile algılanır. *L. plantarum* dahil probiyotiklerin sahip olduğu safra tuzu hidrolaz (BSH) safra tuzlarını dekonjuge ederek karaciğerden ayrılırken safra asitlerine bağlanan amino asit parçasını (taurin, glisin) serbest bırakır. Serbest kalan amino asit bakteriler tarafından yaşama ve devamlılık için karbon ve azot kaynağı olarak yararlanılır (Li, 2012). Dekonjuge (serbest) safra asitlerinin çözünürlüğü safra tuzlarından daha az olduğu için ileumdan daha az emilir. Böylece bağırsak kanalından daha fazla safra asiti atılarak enterohepatik döngüye katılması engellenmiş olur (Tok ve Aslım, 2007).

Alsayadi Muneer and Belarbi (2011) üç probiyotik yoğurt bakterisiyle yaptığı çalışmada hücrelerin safra asiti varlığında laktozu karbon kaynağı olarak kullanarak EPS ürettiğini ve EPS konsantrasyonunun safra asit konsantrasyonuyla ilişkili olduğunu gözlemlemiştir. Bu çalışmaya paralel olarak Pigeon et al. (2002) yoğurt starter kültürü ile yaptıkları çalışmanın sonucunda LAB'nin konjuge safra asitlerini bağlayamadıklarını ancak LAB tarafından üretilen EPS'lerin serbest safra asitlerini bağlamakta bir etken olduğunu bildirmişlerdir (Tok ve Aslım, 2007).

Gıdalarda yapılan safra bağlama çalışmalarında diyet lifi içeriği arttıkça safra bağlama kapasitesinin de arttığı, ısıl işlemlerin ise kapasiteyi daha çok artırdığı işaret edilmektedir (Kahlon et al., 2007; Dziedzic et al., 2012; Kim and White, 2012; Kahlon et al., 2014) Tahıl bazlı gıdaların safra bağlama mekanizmalarından özellikle suda çözünür diyet lifi olan β -glukanın safra asitlerini bağladığı görüşü öne çıkmaktadır (Kim and White, 2010; Chen et al., 2011). Isı hasarı almış diyet liflerinin viskozitesi ve safra bağlama kapasitesi azalmaktadır (Zalcherl et al., 2011). Buna rağmen suda çözünmeyen diyet lifi fraksiyonlarının safra bağlamada daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Kahlon and Woodruff, 2003; Sayar et al., 2005; Dziedzic et al., 2012).

Kim and White (2012) yulaf ununun başlıca bileşenlerinden β -glukan, nişasta ve proteinin viskozite ile *in vitro* safra bağlama üzerine etkisini gözlemek için yaptıkları çalışmada, 90°C'de 10 dk ısıtılarak hazırlanan yulaf lapasının viskozitesine sırasıyla nişasta, β -glukan ve proteinin katkısı olduğunu, bunun yanında un içindeki nişasta α -amilaz ile ve protein proteinaz ile parçalandığında safra bağlama kapasitesinin %25,5'den %28,3'e yükseldiğini belirlemişlerdir. Ancak sadece β -glukanın likenaz ile parçalanmasının safra bağlama kapasitesini %23,7'ye düşürdüğünü gözlemlemiştir. Parçalanma sonrası β -glukanın viskozitesinin azalması safra asiti bağlama kapasitesinin düşmesine neden olarak gösterilmiştir. Sonuç olarak safra bağlamada en önemli etkenin viskoz matriks oluşturan β -glukan olduğuna karar verilmiştir.

Kahlon et al. (2014) yeşil mercimek, elma posası, şeker, tuz ve nişasta-protein takviyeleri ile geliştirdikleri ekstrüde fonksiyonel gıda formülasyonunun sadece mercimekten oluşan ekstrüde ürüne göre daha yüksek safra bağlama kapasitesine sahip olduğunu belirlemiştir. Bu değer oluşturulan formülasyon için %5,1 iken ekstrüde mercimek için %1'in altındadır.

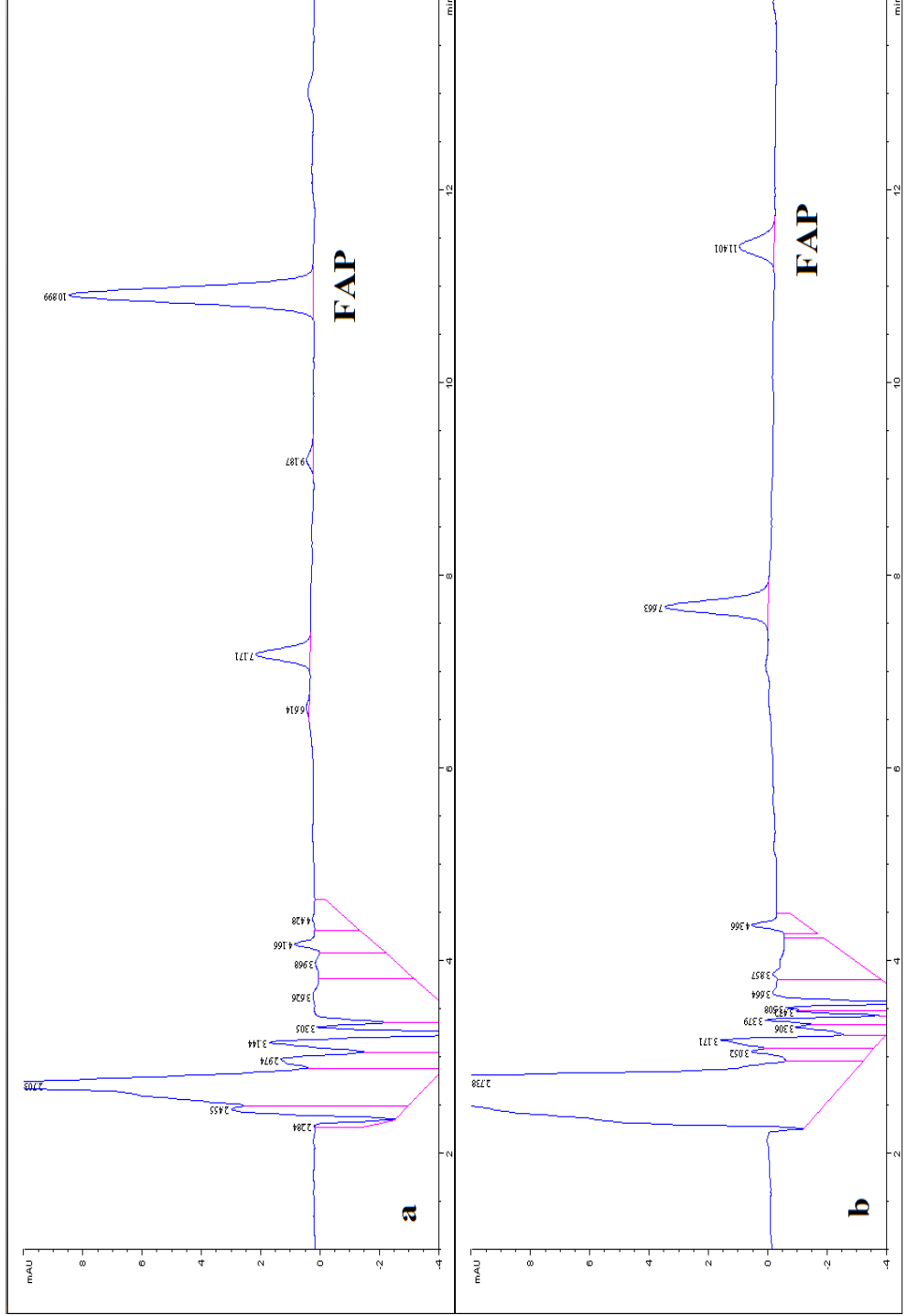
7.7 ADE İnhibisyon Aktivitesi

Anjiyotensin I dönüştürücü enzim (ADE, EC 3.4.15.1) anjiyotensin I'ın güçlü bir damar daraltıcı olan anjiyotensin II'ye dönüşümünü katalizleyerek ve de güçlü bir damar genişletici olan bradikininini inaktive ederek kan basıncının ayarlanmasında önemli bir role sahiptir. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan sentetik ADE inhibitörleri (Captopril, Enalapril, vb.) öksürme, deri döküntüleri, tat bozuklukları gibi yan etkilere sahiptir. Bu nedenle gıda alanında çalışmalara ve ADE inhibitör aktivitesine sahip bileşenlerin -özellikle peptitlerin- belirlenmesine ağırlık verilmektedir (Bamdad et al., 2009; Lahouge et al., 2010). Bu amaç doğrultusunda deneysel çalışmalarda süt, fermente süt, yumurta, balık, soya fasulyesi, mercimek, bezelye, nohut gibi proteince zengin hammaddeler tercih edilmektedir.

ADE inhibisyon aktivitesine sahip biyoaktif peptitler buldukları peptit dizinleri içerisinde inaktif durumdadır. Bu peptitler buldukları gıda kaynaklarından enzim hidrolizine ek olarak proteolitik kültürlerle fermentasyon ve sindirim enzimlerinin hidrolizi sonucu serbest kalmaktadır (Bamdad et al., 2009). Bu nedenle bu tez kapsamında oluşturulan sinbiyotik tozların ADE inhibisyon aktivite tayini *in vitro* sindirim uygulandıktan sonra yapılmıştır.

İki farklı yöntemle kurutulmuş fermente sinbiyotik tozun ADE inhibisyon aktivitesi için FAPGG substratı kullanarak yapılan HPLC-UV analizine ait kromatogramlar Şekil 7.5'de verilmiştir. ADE enzimi varlığında gerçekleştirilen 45 dakikalık inkübasyon sırasında FAPGG'den glisilglisin (GG) grubunun ayrılmasıyla oluşan FAP'nin yaklaşık 7. dk'da oluşturduğu pik alanının (Bkz. Şekil 7.5a) sinbiyotik tozun ortama eklenmesi sonucunda azaldığı görülmektedir (Bkz. Şekil 7.5b). Pik alanındaki bu azalma her iki yöntemle kurutulmuş sinbiyotik tozların ADE inhibitörü içermesinden dolayı inkübasyon sırasında GG grubunun hidrolizini engellediğinin ve bu nedenle oluşan FAP miktarının azaldığının göstergesidir.

Sinbiyotik toz varlığında ve yokluğundaki pik alanlarından hesaplanan IC_{50} değerleri Çizelge 7.6'da verilmiştir. Liyofilize örnek konvansiyonel kurutulmuş örnekten daha iyi IC_{50} değerlerine sahiptir ($p < 0,05$). Bu fark örneklerin protein miktarı ile doğru orantılıdır.



Şekil 7.5: Substrat FAPGG'nin ADE hidrolizi sonucu oluşan ürünü FAP'ın inhibitör (simbiyotik toz) yokluğunda (a) ve varlığında (b) sahip olduğu HPLC profilleri

Çizelge 7.6: Sinbiyotik tozların protein içerikleri ve ADE için IC₅₀ değerleri

Kurutma Yöntemi	Protein miktarı	IC ₅₀ değerleri	
	µg protein/g örnek*	µg protein/ml*	mg örnek*
Konvansiyonel	578,49±80,02 ^a	8,52±0,29 ^a	14,72±0,49 ^a
Liyofilizasyon	597,19±27,42 ^b	8,29±0,20 ^a	13,88±0,33 ^b

* Değerler Ortalama ± SD olarak verilmiş

^{a-b} Farklı harfler, aynı sütündeki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

Lahogue et al. (2010) sentetik ADE inhibitörü Captopril ve balık yan ürün hidrolizatının IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 0,19±0,09 ng ve 45±5 µg olduğunu belirlemiştir.

Hernandez-Ledesma et al. (2007) su ile hazırlanmış süt proteini bazlı su ile hazırlanmış bebek formüllerinin ve doğum yapmış bayanlardan 13-16 hafta sonra alınan sütlerin *in vitro* sindirimden sonra sırasıyla 3.36-8.11 mg/ml ve 4.23 mg/ml protein içerdikleri belirlemiştir. Örneklerin IC₅₀ değerlerini ise sırasıyla 60,11-198,11 µg protein/ml ve 240,10 µg protein/ml olarak tespit etmiştir.

Fermantasyon sırasında ADE inhibitör aktivitesine sahip biyoaktif peptitler, mikrobiyal proteazların ya da tohum organellerinde bulunan özelleşmiş protein gövdelerinden gelen proteazların aktivitesi sonucu serbest kalabilir. Torino et al. (2013) yeşil mercimek ununu *L.plantarum* ile sulu ortamda fermente etmiş ve ADE inhibisyon için IC₅₀ değerinin (200 µg protein/ml) yeşil mercimekten (440 µg protein/ml) daha yüksek olduğunu saptamıştır.

Çalışma kapsamında üretilen sinbiyotik toz ürünlerin *in vitro* sindirimden sonra sahip olduğu toplam proteinin yaklaşık %40'ı süt proteininden geldiği için fermente edilmiş hububatlardan daha iyi IC₅₀ değerlerine sahiptir.

8 SONUÇ

Probiyotikler, uygun miktarda tatbik edildiğinde konakçı üzerinde olumlu etkiler sağlayan, yaşayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmakta ve probiyotik ürünlerin sürekli tüketiminin gerekliliği vurgulanmaktadır. Yapılan birçok çalışmada probiyotik suşlarının gıda ürünlerine eklenmesiyle sağlık yararları gösteren ürünler elde edilmiştir. Süt ürünleri probiyotik gıda ürünü olarak hakim rol oynasa da laktoz intoleransı, sindirim problemleri, vejetaryenlik, süt ürünlerine erişim olmaması ve/veya süt ürünlerinin kolay bozulması nedeniyle süt içermeyen yeni probiyotik gıdalar geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyacın karşılanmasında liyofilize probiyotik hücrelerin gıda takviyesi olarak kullanılmasına karşılık probiyotik gıda ürünü elde edilmesinde en ekonomik yöntem gıdaların fermantasyonudur.

Dünya çapında çoğu yöresel ürün olan fermente gıda ürünlerinde fermantasyon ürünün sindirilebilirliğinin artırılması, antinütrientlerinin azaltılması, dokusu ve aromasından sorumlu iken bilimsel çalışmaların yönelimi ile fermantasyonun ürüne kattığı probiyotik özellikler önem kazanmaya başlamıştır. Bu çalışma kapsamında da fermantasyondan yararlanarak probiyotik ürün çeşitliliğini arttırmak amacıyla çorba, tatlı gibi gıda ürünlerinde kullanılabilecek yüksek çözünürlükte, kullanımı kolay, raf ömrü uzun sinbiyotik instant toz karışımı geliştirilmiştir. Bu amaçla tahıl-çimlendirilmiş bakliyat-kuruyemiş içeren karışım probiyotik *Lactobacillus plantarum* ile fermente edilmiş ve inülin-fruktooligosakkarit karışımı ile zenginleştirilmiştir. Probiyotiklerin mide-bağırsak ortamındaki canlılığı arttırmak amacıyla YST kullanılmış ve ürünün duysal kabuledilirliği değerlendirilmiştir. Bunlara ek olarak ürünün *in vitro* sindirimden sonra sahip olduğu anjiotensin dönüştürücü enzim inhibisyon aktivitesi ve safra bağlama kapasitesi analiz edilmiştir.

Üründe kullanılan maş fasulyesi ve yeşil mercimek birçok deneysel çalışma ile kanıtlanmış biyoaktif özelliklerin ve sindirilebilirliğin artırılması ve de antinütrientlerin azaltılması gibi sonuçlar elde edilmesi için çimlendirilmiştir. Referans alınan yöntemin modifiye edilmesi sonucu literatürdeki diğer uygulamalara göre en üstün kök uzunluğu ve ağırlık kaybı ölçümlerine ulaşılmıştır.

Başlangıçta sırasıyla $4,32 \cdot 10^8$ ve $6,65 \cdot 10^7$ kob/g canlılıkta olan liyofilize sinbiyotik toz ve kontrol örneğinde *in vitro* sindirim sonunda sırasıyla 2,42 ve 3,35 log kob/g canlılık azalması görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak ürüne YST

ve prebiyotiklerin eklenmesinin canlılığın mide-bağırsak koşullarında ve liyofilizasyon işlemlerinde korunmasında etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında her iki örnek de taşıdıkları mikroorganizma yükü nedeniyle probiyotik özellik taşımıştır ve uzatmalı inkübasyon sonucu prebiyotik içermeyen kontrol örneğinin de prebiyotik özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Sinbiyotik tozun rekonstitüsyon özellikleri zayıf olmakla birlikte yapılan duyuşal değerlendirme sonucu krem tatlıya %20 (a/a) oranında eklendiğinde yapısal ve ağız hissinde bozukluğa neden olmayacak fiziksel özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Ancak krem tatlının %20 oranında liyofilize sinbiyotik toz ile zenginleştirilmesi duyuşal olarak kabul edilmemiştir. Bunun yanında %5-10-15 oranında zenginleştirilmiş tatlılarda panelistlerin tercihi açısından bir farklılık görülmemiştir. Duyusal analiz sonuçlarına dayanarak tatlının %15 oranında sinbiyotik toz içermesi sonucunda 100 gramlık porsiyonunda 2,95 g sinbiyotik toz ürün ve $1,28 \cdot 10^7$ kob/g canlı *L.plantarum* bulundurarak probiyotik özellik kazandığı belirlenmiştir.

Hedeflenen sinbiyotik instant toz elde edildikten sonra gerçekleştirilen analizlerde, hammadde karışımının fitik asit içeriğinin sterilizasyon sonucu %64,7 oranında azalırken takip eden fermantasyon uygulamasının fitik asit içeriğini önemli düzeyde azaltmadığı belirlenmiştir. Fitik asit miktarındaki bu azalmanın sebepleri fermantasyon sırasında pH değerinin düşmesiyle hammaddelerin yapısında bulunan fitaz enziminin çalışması için uygun ortam oluşması ve sterilizasyon sırasında fitik asitin sıcaklık sonucu bozulması olarak değerlendirilmiştir.

Fermente karışımın konvansiyonel kurutma ve dondurarak kurutma sonucu elde edilen sinbiyotik tozların rölatif safra bağlama kapasiteleri farklılık göstermezken her iki ürün de literatüre geçmiş kuru madde bazında en yüksek rölatif safra bağlama kapasitesine sahip tahıl bazlı gıda olmuştur. Ancak söz konusu kapasitenin değerlendirilmesi sırasında tozun gıdalara farklı oranlarda eklenerek tüketileceği göz önünde tutulmalıdır. Örneğın duyuşal analiz için hazırlanan %15 oranında zenginleştirilmiş toz tatlıda safra bağlama kapasitesi 7 kat azalmaktadır.

Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotiklerin kanıtlanmış ve muhtemel sağlık yararları göz önünde tutulduğunda bunları içeren doğal ve doğala özdeş gıdaların tüketiminin yaygınlaştırılması sağlığı korumada ve gereksiz ilaç kullanımını

önlemede etkili olabilir. Ancak probiyotik gıda ürünlerinin geliştirilmesinde *in vivo* çalışmalarla teorilerin desteklenmesine ihtiyaç vardır. Probiyotikler üzerinde ileride yapılacak araştırmalarda probiyotik etkili bakterilerin detaylı olarak yararlarının ve vücut ile etkileşimlerinin net olarak ortaya konması sayesinde giderek riskli hale gelen antibakteriyel direnç oluşumuna karşı kullanılmasının yaygınlaşacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. and Vinas, I.,** 2008, Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments, *Int. J. Food Microbiol*, 123:121–129 pp.
- Abebea, Y., Bogalea, A., Hambidgeb, K.M., Stoecker, B.J., Baileyd, K. and Gibson, R.S.,** 2007, Phytate, zinc, iron and calcium content of selected raw and prepared foods consumed in rural Sidama, Southern Ethiopia, and implications for bioavailability, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20:161–168 pp.
- Adams, C.A.,** 2010, The probiotic paradox: Live and dead cells are biological response modifiers, *Nutrition Research Reviews*, 23(1):37–46 pp.
- Agerholm-Larsen, L., Raben, A., Haulrik, N., Hansen, A.S., Manders, M. and Astrup, A.,** 2000, Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 54:288–297 pp.
- Aguirre, M. and Collins, M.D.,** 1993, Lactic acid bacteria and human clinical infection, *Journal of Applied Bacteriology*, 62:473–477 pp.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T. and Mattila-Sandholm, T.,** Wright, A., 1999, Resistance of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption, *Appl Enviromen Microbial*, 65(1): 351-354 pp.
- Alp, M., Kahraman, R., Kacobağlı, N., Eren, M. ve Şenel, H.S.,** 1993, Lactiferm-L5 ve bazı antibiyotiklerin broyler performansını, abdominal yağ ve ince bağırsak ağırlığı ile kan kolesterolüne etkileri, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2):145-147 pp.
- Alsayadi Muneer, M.S. and Belarbi, M.,** 2011, Production of exopolysaccharides by probiotic bacteria in the presence of bile acids, *Yemeni Journal for Medical Sciences*, 5:15-22 pp.
- Altuğ, T. ve Elmacı, Y.,** 2005, Gıdalarda Duyusal Değerlendirme, Meta Basım, İzmir, 50s.
- Ambrosini, V.M., Gonzales, S., Holgado, A.P.R. and Oliver G,** 1998, Study of the morphology of the cell walls of some strains of lactic acid bacteria and related species, *J Food Prot*, 61(5):557-562 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Anal, A. K. and Singh, H.**, 2007, Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends in Food Science & Technology*, 18:240–251 pp.
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C.D. and Stapley, A.G.F.**, 2007, Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray-drying, *Drying Technology*, 25:799–807 pp.
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C.D., and Stapley, A.G.F.**, 2010, Spray-freeze-drying of whey proteins at sub-atmospheric pressures, *Dairy Sci Technol*, 90:321–34 pp.
- Anderson, M.D. and Gilliland, S.E.**, 1999, Effect of fermented milk (yoghurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans, *J Am College of Nutr*, 18(1):43-50 pp.
- Andersson, H., Asp, N.G., Bruce, Å., Roos, S., Wadstrom, T. and Wold, A.E.**, 2001, Health effects of probiotics and prebiotics. A literature review on human studies, *Scand. J. Nutr/Naringsforskning*, 45:58–75 pp.
- Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva, R. and Hristozova, T.**, 2006, Development of a new oat-based probiotic drink, *Int. J. Food Microbiol*, 112:75–80 pp.
- Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., Akimoto, M., Kanai, S. and Miki, T.**, 1998, *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation, *J. Food Sci.*, 63:544–547 pp.
- Augustin, M. A. and Hemar, Y.**, 2009, Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients, *Chemical Society Reviews*, 38:902–912 pp.
- Bamdad, F., Dokhani, S., Keramat, J. and Zareie R.**, 2009, The impact of germination and *in vitro* digestion on the formation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from lentil proteins compared top whey proteins, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 49:39-46 pp.
- Barbosa-Canovas, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P. and Yan, H.**, 2005, Food Powders: Physical properties, processing and functionality, *Kluwer Academic*, 199-219 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Berni-Canani, R., Cirillo, P., Terrin, G., Cesarano, L., Spagnuolo, M.I., De Vicenio, A., Albano, F., Passariello, A., De Marco, G., Manguso, F. and Guarino, A.,** 2007, Probiotics for treatment of acute diarrhea in children: randomized clinical trail of five different preparations, *BMJ*, 335–340 pp.
- Bhandari, B., Bansal, N., Zhang, M. and Schuc, P.,** 2013, Handbook of Food Powders: Processes and Properties, Woodhead Publishing Limited, 381p.
- Biourge, V., Vallet, C., Levesque, A., Sergheraert, R., Chevalier, S. and Roberton, J.,** 1998, The use of probiotics on the diet of dogs, *J Nutr*, 128:2730-2732 pp.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D. and Webb, C.,** 2003, Review. Cereal-based fermented foods and beverages, *Food Res. Int.*, 36:527–543 pp.
- Boye, J.I., Roufik, S., Pesta, N. and Barbana, C.,** 2010, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS–PAGE of red lentil protein hydrolysates, *Food Science and Technology*, 43:987–991 pp.
- Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B. and Reinheimer, J.A.,** 2004, Incorporation of *Bifidobacteria* into cheeses: Challenges and rewards, *International Dairy Journal*, 14:375–387 pp.
- Bradford, M.M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 7(72):248-254 pp.
- Brown, A.C. and Valiere, A.,** 2004, Probiotics and medical nutrition therapy, *Nutr. Clin.Care*, 7:56–68 pp.
- Burbano, C., Muzquiz, M., Osagie, A., Ayet, G. and Cuadrado, C.,** 1995, Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology, *Food Chemistry*, 52:321-325 pp.
- Burgain, J., Gaiani, C., Cailliez-Grimal, C., Jeandel, C. and Scher, J.,** 2013, Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19:233–242 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Burgaina, J., Gaiania, C., Franciusb, G., Revol-Junellesa, A.M., Cailliez-Grimala, C., Lebeerc, S., Tytgatc, H.L.P. , Vanderleydenc, J. and Schera, J.,** 2013b, In vitro interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104:153– 162 pp.
- Campbell-Platt, G.,** 1994, Fermented foods: a world perspective, *Food Research International*, 27, 253 p.
- Capela, P., Hay, T.K.C. and Shah, N.P.,** 2006, Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt, *Food Research International*, 39:203–211 pp.
- Capela, P., Hay, T.K.C. and Shah, N.P.,** 2007, Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria, *Food Research International*, 40:1261–1269 pp.
- Caplice, E. and Fitzgerald, G.F.,** 1999, Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 50:131–149 pp.
- Caric, M. and Milanovic, S.,** 2002, Milk powders: Physical and functional properties of milk powders, *In Encyclopedia of Dairy Sciences*, 1874–1880 pp.
- Cataloluk, O. and Gogebakan, B.,** 2004, Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey, *FEMS Microbiology Letters*, 236(1):7–12 pp.
- Champagne, C.P. and Fustier, P.,** 2007, Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2):184-190 pp.
- Chan, E.S. and Zhang, Z.,** 2005, Bioencapsulation by compression coating of probiotic bacteria for their protection in an acidic medium, *Process Biochemistry*, 40(10):3346-3351 pp.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. and Webb, C.,** 2002, Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates, *J. Appl. Microbiol.*, 92:851–859 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chavan, J.K. and Kadam, S.S.**, 1989, Critical reviews in food science and nutrition, *Food Sci.*, 28:348–400 pp.
- Chávarri, M., Marañón, I. and Villarán, M.C.**, 2012, Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria, Probiotics, Prof. Everlon Rigobelo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0776-7, InTech, DOI: 10.5772/50046. Available from: <http://www.intechopen.com/books/probiotics/encapsulation-technology-to-protect-probiotic-bacteria>
- Chen, Z., Ma, K.Y., Liang, Y., Peng, C. and Zuo, Y.**, 2011, Role and classification of cholesterol-lowering functional foods, *Journal of Functional Foods*, 3:61–69 pp.
- Chiu, H.H., Tsai, C.C., Hsieh, H.Y. and Tsen, H.Y.**, 2007, Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the Salmonella invasion in mice, *J. Appl. Microbiol.*, 104:605–612 pp.
- Collado, M.C., Meriluoto, J. and Salminen, S.**, 2008, Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains, *Eur. Food Res. Technol.*, 226:1065–1073 pp.
- Conway, P.L.**, 1996, Selection criteria for probiotics microorganisms, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 5:10–14 pp.
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D. and Khutoryanskiy, V.V.**, 2012, Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery, *Journal of Controlled Release*, 162:56–67 pp.
- Daly, C.**, 1991, Lactic acid bacteria and milk fermentations, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 51:544–548 pp.
- Desai, K. G. H. and Park, H. J.**, 2005, Recent developments in microencapsulation of food ingredients, *Dry. Technol.*, (23):1361–1394 pp.
- Dilber, A., Türker, S. ve Ergün, A.**, 2003, Çimlendirilmiş bir buğday ürünü olan azık üzerine araştırmalar, *Gıda*, 28:409-414 s.
- Ding, W.K. and Shah, N.P.**, 2009, Effect of Homogenization Techniques on Reducing the Size of Microcapsules and the Survival of Probiotic Bacteria Therein, *Journal of Food Science*, 6(74):231-236 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dolly, P., Anishaparvin, A., Joseph, G. S. and Anandharamakrishnan, C.,** 2011, Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (mtcc 5422) by spray-freeze-drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions, *Journal of Microencapsulation*, 28(6): 568–574 pp.
- Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, P., Vasiljevic, T. and Shah, N.P.,** 2007, Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage, *International Dairy Journal*, 17:657–665 pp.
- Dost, K. and Tokul, O.,** 2006, Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 558:22–27 pp.
- Dupont, D., Mandalari, G., Daniel Mollé, D., Julien Jardin, J., Odile Rolet-Répécaud, O., Gabriel Duboz, G., Joëlle Léonil, J., Clare E. N. Mills, C.E.N. and Mackie, A.R.,** 2010, Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion, *Mol Nutr Food Res*, 54(11):1677–89 pp.
- Dziedzic, K., Górecka, D., Kucharska, M. and Przybylska, B.,** 2012, Influence of technological process during buckwheat groats production on dietary fibre content and sorption of bile acids, *Food Research International*, 47:279–283 pp.
- Erbas, M., Uslu, M.K., Erbas, M.O. and Certel, M.,** 2006, Effects of fermentation and storage on the organic and fatty acid contents of tarhana, a Turkish fermented cereal food, *J. Food Compos. Anal*, 19: 294–301 pp.
- Erkaya, Z. ve Kabak, B.,** 2010, Gıda mikrobiyolojisi, Prof. Dr. Osman erkmen (Ed.), Eflatun Basım Bağıtım Yayıncılık Danışmanlık Yatırım ve Tic. Ltd. Şti, ISBN: 978-605-4334-02-5
- Esser, P., Lund, C. and Clemensen, J.,** 1983, Antileukemic effects in mice from fermentation products of *Lactobacillus bulgaricus*, *Milchwissenschaft*, 38:257–260 pp.
- Fang, Y., Selomulya, C. and Chen, X. D.,** 2008, On measurement of food powder reconstitution properties, *Drying Technology*, 26: 3–14 pp.
- Fowler, A. and Toner, M.,** 2006, Cryo-injury and Biopreservation, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066:119–35 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Freudig, B., Hogekamp, S. and Schubert, H.,** 1999, Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel, *Chemical Engineering and Processing*, 38:525–532 pp.
- Fritzen-Freire, C.B., Prudêncio, E.S., Amboni, R.D.M.C., Pinto, S.S., Negrão-Murakami, A.N. and Murakam, F.S.,** 2012, Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics, *Food Research International*, 45: 306–312 pp.
- Fuller, R.,** 1989, A Review. Probiotics in man and animals, *J.Appl. Bact.*, 66:365-378 pp.
- Fuse, K., Bamba, T. and Hosoda, S.,** 1989, Effects of pectins on fatty acids and glucose absorption and on thickness of unstirred water layer in rat and human intestine, *Digestive Diseases and Sciences*, 34(7):1109–1116 pp.
- Garcia-Esteva, R.M., Guerra-Hernandez, E. and Garcia-Villanova, B.,** 1999, Phytic acid content in milled cereal products and breads, *Food Research International*, 32: 217-221 pp.
- Gbassi, G.K., Vandamme, T., Ennahar, S. and Marchioni, E.,** 2009, Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins, *International Journal of Food Microbiology*, 129:103–105 pp.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. and Saurel, R.,** 2007, Applications of spraydrying in microencapsulation of food ingredients, *Food Research International*, 40: 1107–1121 pp.
- Ghavidel, R.A. and Prakash, J.,** 2007, The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds, *LWT*, 40:1292–1299 pp.
- Gibson G.R. And Fuller, R.,** 2000, Aspects of *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use, *J Nutr*, 130: 391-395 pp.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B.,** 1995, Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *J Nutr*, 125:1401-1412 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gomes, A.M.P. and Malcata, F.X.**, 1999, *Bifidobacterium* spp., and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, *Trends Food Sci. Technol.*, 10:139–157 pp.
- Gotcheva, V., Hristozova, E., Hrostozova, T., Guo, M., Roshkova, Z. and Angelov, A.**, 2002, Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains, *Food Biotechnol*, 16:211–225 pp.
- Gökmen, S., Palamutoğlu, R. ve Sariçoban, C.**, 2012, Gıda Endüstrisinde Enkapsülasyon Uygulamaları, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1(7):36-50 s..
- Graham, G.G., Glover, D.V., Lopez De Romana, G., Morales, E. ve Maclean, W.J.**, 1980, Nutritional value of normal, opaque and sugary maize hybrids for infants and children 1: digestibility and utilization, *J. Nutr.*, 110:1061-1069 pp.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G. ve Faria, J.A. F.**, 2010, Functional foods and non-dairy probiotic product food development: Trends, concepts and products, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9:202–302 pp.
- Green, C.**, 1997, Fibre in Enteral Nutrition, *Nutricia Research Communications, Netherlands*, 28 p.
- Guarner, F., Khan, A.G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Lemair, T., Kaufmann, P., de Paula, J.A., Fedorak, R., Shanahan, F., Sanders, M.E., Szajewska, H., Ramakrishna, B.S., Karakan, T. and Kim, N.**, 2012, World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Probiotics and Prebiotics, *J Clin Gastroenterol*, 46(6):468-481 pp.
- Gunness, P., Flanagan, B.M., Shelat, K., Gilbert, R.G. and Gidley, M.J.**, 2012, Kinetic analysis of bile salt passage across a dialysis membrane in the presence of cereal soluble dietary fibre polymers, *Food Chemistry*, 134:2007–2013 pp.
- Guo, M., Fox, P.F., Flynn, A. and Kindstedt, P.S.**, 1995, Susceptibility of α -lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin, *Journal of Dairy Science*, 78:2336-2344 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gupta, S. and Abu-Ghannam, N.**, 2012, Probiotic fermentation of plant based products: Possibilities and opportunities, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:183–199 pp.
- Gülmez, M. ve Güven, A.**, 2002, Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotikler, *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 8(1):83-89 s.
- Hagen, M. and Narvhus, J.A.**, 1999, Production of ice cream containing probiotic bacteria. *Milchwissenschaft*, 54:265–268 pp.
- Hamoudi, L., Goulet, J. and Ratti, C.**, 2007, Effect of protective agents on the viability of *Geotrichum candidum* during freeze-drying and storage, *Journal of Food Science*, 72(2):45–49 pp.
- Hanson, L., Dahlman-Höglund, A. and Karlsson, M.**, 1999, Normal microbial flora of the gut, In: Hanson L, Yolken R (eds), Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora, Nestle Nutrition Workshop Series, Lippincott-Raven Publishers, 42:217-228 pp, USA
- Harlander, S.**, 1992, Food biotechnology, In J. Lederberg (Ed.), Encyclopaedia of microbiology, 191–207pp, New York: Academic Press
- Heller, K.J.**, 2001, Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms, *Am. J. Clin. Nutr.*, 73:374–379 pp.
- Hernandez-Ledesma, B., Quiros, A., Amigo, L. and Recio, I.**, 2007, Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin, *International Dairy Journal*, 17:42–49 pp.
- Hirahara, T.**, 1998, Functional food science in Japan, In T. Mattila-Sandholm, and K. Kauppila (Eds.), Functional food research in Europe, 19–20 pp. Finland: Julkaisija-Utgivare
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W. and Chi, L.**, 2008, The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs?, *Peptides*, 29:1062–1071 pp.
- Hooper, R.**, 1990, Probiotics-Intestinal Inoculants for Production Animals, In: Probiotics in Animal Nutrition Of Animals, Sbornik Prednasek.19-21 November 1990: 69-88 pp.
- Horn, P.J. and Schwartz, H.M.**, 1961, Kar-corn malting and brewing studies 9: amino acid composition of kañr corn grain and malt, *J. Food Sci*, 40:65 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Imasse, K., Tanaka, A., Tokunaga, K., Sugano, H., Ishida, H. and Takahashi, S.,** 2007, *Lactobacillus reuteri* tablets suppress *Helicobacter pylori* infectionda doubleblind randomised placebo-controlled cross-over clinical study, *Kansenshogakuzasshi. J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, 81:387–393 pp.
- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H. and Mojgani, N.,** 2014, Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products, *Food Science and Technology*, 58: 355-359 pp.
- Ishibashi, W. and Shimamura, S.,** 1993, Bifidobacteria: Research development in Japan, *Food Technol*, 46:126–35 pp.
- İnanç, N., Şahin, H. ve Çiçek, B.,** 2005, Probiyotik ve prebiyotiklerin sağlık üzerine etkileri, *Erciyes Tıp Dergisi*, 27(3):122-127 s.
- Jagannath, A., Raju, P.S. and Bawa, A.S.,** 2010, Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria, *Food Science and Technology*, 43:1197-1203 pp.
- Jansen, G.R.,** 1974, Amino acid fortification of cereals, In *New Protein Foods* (Vol. 1). New York: Academic Press.
- Jernigan, M.A., Miles, R.D. and Arafa, A.S.,** 1985, Probiotics in Poultry Nutrition. A Review, *World's Poultry Science*, 41(2):99-107 pp.
- Jha, A.,** 2002, Physico-chemical properties of instant Kheer mix, *Lait*, 82:501–513 pp.
- Jones, C.D. and Thomas, C.N.,** 1987, The maintenance of strain specificity and bile tolerance when producing stable bacteria, *Biotechnology In The Feed Industry* (Ed. T.P.Lyons), Alltech Technical Publication, Kentucky, 157-166 pp.
- Jyothi, N.V.N., Prasanna, M., Prabha, S., Seetha-Ramaiah, P., Srawan, G. and Sakarkar, S.N.,** 2009, Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency: A Review, *The Internet Journal of Nanotechnology*, 27(3):187-197 pp.
- Kahlon, T. S. and Woodruff, C. L.,** 2003, In vitro binding of bile acids by rice bran, oat bran, barley and β -glucan enriched barley, *Cereal Chem*, 80:260–263 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kahlon, T.S. and Woodruff, C.L.**, 2002, In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten, *Food Chemistry*, 79:425–429 pp.
- Kahlon, T.S., Berrios, J.J., Chiu, M.C. and Pan, J.L.**, 2014, Relative Bile Acid Binding Potential of Extruded Lentil Snacks, *Food and Nutrition Sciences*, 5:361-365 pp.
- Kahlon, T.S., Chiu, M.M. and Chapman, M.H.**, 2007, Steam cooking significantly improves in vitro bile acid binding of beets, eggplant, asparagus, carrots, green beans, and cauliflower, *Nutrition Research*, 27:750–755 pp.
- Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. and Isolauri, E.**, 2001, Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebocontrolled trial, *Lancet*, 357:1076–1079 pp.
- Katina, K., Liukkonen, K.H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S.M., Lampi, A.M., Pihlava, J.M. and Poutanen, K.**, 2007, Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye, *J. Cereal Sci.*, 46:348–355 pp.
- Kedia, G., Wang, R., Patel, H. and Pandiella, S.S.**, 2007, Used of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties, *Process. Biochem*, 42:65–70 pp.
- Kent, R.M. and Doherty, S.B.**, 2014, Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality, *Food Research International*, 64:567–576 pp.
- Khalil, A.H. and Mansour, E. H.**, 1995, The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans, *Food Chemistry*, 54:177-182 pp.
- Kim, E.H.J., Dong Chen, X. and Pearce, D.**, 2002, Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26:197–212 pp.
- Kim, H.J. and White, P.J.**, 2010, *In vitro* bile-acid binding and fermentation of high, medium, and low molecular weight β -Glucan, *J. Agric. Food Chem.*, 58:628–634 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, H.J. and White, P.J.**, 2012, Interactional effects of β -glucan, starch, and protein in heated oat slurries on viscosity and in vitro bile acid binding, *J. Agric. Food Chem.*, 60:6217–6222 pp.
- Kim, H.S.**, 1988, Characterization of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* as applied to dietary adjunct, *Cultured Dairy Products Journal*, 23:6-9 pp.
- Kinsella, J.E. and Morr, C.V.**, 1984, Milk proteins: Physiochemical and functional properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21(3):197–262 pp.
- Klaenhammer, T.R.**, 2000, Probiotic bacteria: today and tomorrow, *J Nutr.*, 130: 415-416 pp.
- Koç, M., Sakin, M. ve Kaymak-Ertekin, F.**, 2010, Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 1(16):77-86 s.
- Kramer, A. and Twigg, B. A.**, 1984, Quality Control for The Food Industry, Avi Publishing Company Inc., Westport, Connecticut, 1:505-508 pp.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H.**, 2003, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt: A Review, *International Dairy Journal*, 13(1):3-23 pp.
- Kuipers, O.P., Buist, G. and Kok, J.**, 2000, Current strategies for improving food bacteria, *Res Microbial*, 151:815-822 pp.
- LaClair, C. E. and Etzel, M.R.**, 2010, Ingredients and pH are key to clear beverages that contain whey protein, *J Food Sci.*, 75(1):21-7 pp.
- Lahogue, V., Réhel, K., Taupin, L., Haras, D. and Allaupe, P.**, 2010, A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, *Food Chemistry*, 118:870–875 pp.
- Laroia, S. and Martin, J.H.**, 1991, Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts, *Cultured Dairy Prod. J.*, 26:13–21 pp.
- Ledesma, R.G.G., Santos, F.F. and Briagas, K.B.**, 2005, Spectrophotometric determination of phytic acid levels in plant feedstuff for get-excel tilapia feed formulation, National Fisheries Research and Development Institute, Metro Manila

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leenhardt, F., Levrat-Verny, M.A., Chanliaud, E. and Remesy, C.,** 2005, Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity, *J. Agric. Food Chem.*, 53:98–102 pp.
- Lehrfeld, J.,** 1994, HPLC separation and quantification of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42:2726-2731 pp.
- Leroy, F. and Vuyst, L.D.,** 2004, Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends in Food Science & Technology*, 15:67–78 pp.
- Li, G.,** 2012, Intestinal probiotics: Interactions with bile salts and reduction of cholesterol, *Procedia Environmental Sciences*, 12:1180 – 1186 pp.
- Lin, M.Y. and Chang, F,** 2000, Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Digest, *Dis Sci*, 45(8):1617-1622 pp.
- Liserre, A.M., Re, M.I. and Franco, B.D.G.M.,** 2007, Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions, *Food Biotechnology*, 2:11-16 pp.
- Livney, Y.D.,** 2010, Milk proteins as vehicles for bioactives, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1-2): 73-83 pp.
- Lopez, H., Krspine, V., Guy, C., Messenger, A., Demigne, C. and Remesy, C.,** 2001, Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium, *J. Agric. Food Chem.*, 49:2657–2662 pp.
- Lorri, W.,** 1993, Nutritional and microbiological evaluation of fermented cereal weaning foods, Ph.D. Thesis, Chalmers University of Technology, Gotenborg, Sweden
- Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B.C.,** 2001, Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products, *Food Res. Int.*, 34:791–796 pp.
- Lyons, T.P.,** 1987, The Role of biological tools in the feed industry, *Biotechnology in The Feed Industry*, *Alltech Technical Publications*, 1-49 pp, Kentucky

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mårtenson, O., Oste, R. and Holst, O.,** 2002, The effect of yogurth culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products, *Food Res. Int.*, 35:775–784 pp.
- Martin-Cabrejas M.A., Diaz, M.F., Aguilera, Y., Benitez, V., Mollaa, E. and Esteban, R.M.,** 2008, Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes, *Food Chemistry*, 107:1045–1052 pp.
- Mattila-Sandholm, T.,** 1998, VTT on lactic acid bacteria, *VTT Symposium*, 156:1–10 pp.
- McKay, L.L. and Baldwin, K.A.,** 1990, Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 87:3–14 pp.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P. Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Menard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S., Weitschies, W. and Brodkorb, A.,** 2014, A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus, *Food Funct.*, 5(6):1113-1124 pp.
- Miransaria, M. And Smithc, D.L.,** 2014, Plant hormones and seed germination, *Environmental and Experimental Botany*, 99:110–12 pp.
- Morelli, L.,** 2000, *In vitro* selection of probiotic Lactobacilli: a critical appraisal curr, *Issues Intest. Microbiol.*, 1(2): 59-67. pp.
- Moshfegh, A., Friday, J., Goldman, J. and Ahuja, J.,** 1999, Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans, *J Nutr*, 129: 1407-1411 pp.
- Mottet, T. and Michetti, P.,** 2005, Probiotics: wanted dead or alive, *Dig. Liver Dis.*, 37:3–6 pp.
- Muneer, A. and Belarbi S.E.,** 2011, Production of exopolysaccharides by probiotic bacteria in the presence of bile acids, *Yemeni Journal For Medical Sciences*, 5:15-22 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Müntz, K., Belozersky, M.A. and Dunaevsky, Y.E.,** 2001, Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth, *Journal of Experimental Botany*, 52:1741–1752 pp.
- Nemeskery, T.,** 1983, Probiotics for young animals, *Feed International*, 46-48 pp.
- Ninesse, K.,** 1999, Inulin and oligofructose: What are they?, *J Nutr*, 129:1402-1406 pp.
- Nomoto, K.,** 2005, Review prevention of infections by probiotics, *J. Biosci. Bioeng.*, 100:583–592 pp.
- Nout, M.J.R. and Motarjemi, Y.,** 1997, Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: a joint FAO/WHO workshop, *Food Control*, 8:221–226 pp.
- Nualkaekul, S., Deepika, G. and Charalampopoulos, D.,** 2012, Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices, *Food Research International*, 48:627–633 pp.
- Oberman, H. and Libudzisz, Z.,** 1996, Fermented milks, In J. B. Woods (Ed.), *Microbiology of fermented foods*, 308–350 pp, London: Blackie Academic
- Okagbue, R.N.,** 1995, Microbial biotechnology in Zimbabwe: current status and proposals for research and development, *Journal of Applied Science in Southern Africa*, 1:148–158 pp.
- Okarter, N. and Liu, R. H.,** 2010, Health benefits of whole grain phytochemicals, *Trends in Food Science & Technology*, 50:193–208 pp.
- Oliveira, A.C., Moretti, T.S., Boschini, C., Baliero, J.C.C., Freitas, L.A.P. and Freitas, O.,** 2007a, Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying, *Drying Technology*, 25:1687-93 pp.
- Oliveira, A.C., Moretti, T.S., Boschini, C., Baliero, J.C.C., Freitas, L.A.P., Freitas, O. and Favaro-Trindade, C.S.,** 2007b, Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying, *Journal of Microencapsulation*, 24:685-93 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Onwulata, C.**, 2005, Encapsulated and Powdered Foods, CRC Press, Taylor & Francis Group, Broken Sound Parkway NW
- Oyewole, O.B.**, 1997, Lactic fermented foods in Africa and their benefits, *Food Control*, 8:289–297 pp.
- Ozdemir, S., Gocmen, D. and Kumral, A.Y.**, 2007, A traditional Turkish fermented cereal food: Tarhana, *Food Rev. Int.*, 23:107–121 pp.
- Paez, R., Lavari, L., Vinderola G., Audero G., Cuatrin A., Zaritzky N. and Reinheimer, J.**, 2012, Effect of heat treatment and spray drying on *Lactobacilli* viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion, *Food Research International*, 48:748–754 pp.
- Park, M.S., Min, J.K. and Geun, E.J.**, 2007, Assessment of lipopolysaccharide-binding activity of *Bifidobacterium* and its relationship with cell surface hydrophobicity, autoaggregation, and inhibition of interleukin-8 production, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17:1120–1126 pp.
- Paseephol, T. and Sherkat, F.**, 2009, Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage, *Journal of Functional Foods*, 1:311–318 pp.
- Penna, A.L.B., Rao-Gurram, S. and Barbosa-Ca'novas, G.V.**, 2007, Effect of milk treatment on acidification, physicochemical characteristics, and probiotic cell counts in low fat yogurt, *Milchwissenschaft*, 62:48–52 pp.
- Penner, P.**, 2005, Probiotics and nutraceuticals: Non medicinal treatments of gastrointestinal diseases, *Curr Opin Pharmacol*, 5:596–603 pp.
- Picot, A. and Lacroix, C.**, 2004, Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *Int Dairy J*, 14:505–15 pp.
- Pigeon, R.M., Cuesta, E.P. and Gilliland, S.E.**, 2002, Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria, *Journal of Dairy Science*, 11(85) 2705–2710 pp.
- Poutanen, K., Flander, L. and Katina, K.**, 2009, Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective, *Food Microbiology*, 26:693–699 pp.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A. and Soccol, C.R.**, 2008, Trends in non-dairy probiotic beverages, *Food Research International*, 41:111–123 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G.S. and Anandharamakrishnan, C.**, 2012, Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, *Journal of functional Foods*, 4:891-898 pp.
- Reddy, B.S.**, 1999, Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth, *J Nutr*, 129:1478-1482 pp.
- Reddy, B.S., Hamid, R. and Rao, C.V.**, 1997, Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition, *Carcinogenesis*, 18:1371-1374 pp.
- Rhou, J. R. and Erdman, J. V.**, 1995, Phytic acid in health and disease, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35:495-508 pp.
- Rivera-Espinoza, Y. and Gallardo-Navarro, Y.**, 2010, Non-dairy probiotic products, *Food Microbiology*, 27:1–11 pp.
- Roberfroid, M.B.**, 2000, Prebiotics and probiotics: Are they functional foods?, *Am J Clin Nutr*, 71:1682-1687 pp.
- Rolfe R.D.**, 2000, The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health, *J Nutr*, 130:396-402 pp.
- Roy, F., Boye, J.I. and Simpson, B.K.**, 2010, Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil, *Food Research International*, 43:432–442 pp.
- Salovaara, H.**, 1996, The time of cereal based functional food is here: introducing yosa, a vellie, In G. Skrede, & E. M. Magnus (Eds.), *The Nordic cereal industry towards year 2000*, 195–202 pp, Norway: Haugesund.
- Sandberg, A.S., Carlsson, N.G. and Svanberg, U.**, 1989, Effects of inositol tri-, tetra-, penta-, hexaphosphates on *in vitro* estimation of iron availability, *Journal of Food Science*, 54:159-186 pp.
- Sanders, M. and Huis in't Veld, J.**, 1999, Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues, *Antonie van Leeuwenhoek*, 76:293–315 pp.
- Sanni, A.I., Onilude, A.A. and Ibidapo, O.T.**, 1999, Biochemical composition of infant weaning food fabricated from fermented blends of cereal and soybean, *Food Chemistry*, 65:35-39 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sarıca, Ş.**, 1999, Kanatlı hayvan beslemede probiyotik kullanımı, *Hayvansal Üretim*, 39-40:105-112 s.
- Sathyabama, S., Kumar, M.R., Brunthadevi,S.H. and Vijayabharathi, R.**, 2014, Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment, *Food Science and Technology*, 57:419-425 pp.
- Saxelin, M.**, 2000, Clinical documentation, product development and marketing of *Lactobacillus* GG., *Scand. J. Nutr.*, 44:102 pp.
- Sayar, S., Jannink, J.L. and White, P.J.**, 2005, In vitro bile acid binding offlours from oat lines varying in percentage and molecular weight distribution of β -glucan, *J. Agric. Food Chem*, 53:8797–8803 pp.
- Scannel, A.G.M., Ross, R.P., Hill, C. and Arendt, E.K.**, 2000, An effective lacticin biopreservative in fresh pork sausage, *J Food Prot*, 63(3):370-375 pp.
- Schillinger, U., Guigas, C. and Holzapfel, W.H.**, 2005, *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products, *Int. Dairy J.*, 15:1289–1296 pp.
- Schrezenmeir, J. and de Vrese, M.**, 2001, Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition, *Am. J. Clin. Nutr.*, 77:361–364 pp.
- Schubert, H.**, 1980, Processes and properties of instant powdered foods, In Link, P., Milky, Y., Lockup, J. and Laminar, J. (Eds.), *Food Processing Engineering*, pp. 657–684, London: Elsevier Applied Science Publisher Ltd.
- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N. and Shimoni, E.**, 2010, Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying, *Food Research International*, 43:193–202 pp.
- Seo, J., Chang, H., Ji, W., Lee, E., Choi, M., Kim, H., Kim, J.**, 1996, Aroma components of traditional Korean soy sauce and soy bean paste fermented with the same meju, *Journal of Microbial Biotechnology*, 6:278–285 pp.
- Shah, N.P.**, 2001, Functional foods from probiotics and prebiotics, *Food Technol.*, 55:46–53 pp.
- Shah, N.P.**, 2007, Functional cultures and health benefits, *Int. Dairy J.*, 17:1262–1277 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shahani, K.M. and Ayebo, A.D.**, 1980, Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology, *The Am. J. Clinical Nutr.*, 33:2448-2457 pp.
- Sheu, T.Y. and Rosenberg, M.**, 1998, Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates, *Journal of Food Science*, 3(93): 491-494
- Shima, M., Matsuo, T., Yamashita, M. and Adachi, S.**, 2009, Protection of *Lactobacillus acidophilus* from bile salts in a model intestinal juice by incorporation into the inner-water phase of a W/O/W emulsion, *Food Hydrocolloids*, 23:28-15 pp.
- Shittu, T.A. and Lawal, M.O.**, 2007, Factors affecting instant properties of powdered cocoa beverages, *Food Chemistry*, 100:91–98 pp.
- Simango, C.**, 1997, Potential use of traditional fermented foods for weaning in Zimbabwe, *Journal of Social Science and Medicine*, 44:1065–1068 pp.
- Skeggs, Jr., Kahn, J. R. and Shumway, N. P.**, 1957, The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme, *The Journal of Experimental Medicine*, 103:295–299 pp.
- Sokrab, A.M., Ahmed, I.A.M. and Babiker, E.E.**, 2012, Effect of germination on antinutritional factors, total, and extractable minerals of high and low phytate corn (*Zea mays* L.) genotypes, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11:123–128 pp.
- Stapley, A.G.F.**, 2008, Freeze drying, Evans JA (ed) *Frozen Food Science and Technology*, Oxford: Blackwell, pp 248–75.
- Steinkraus, K.H. and** 1998, Bio-enrichment: production of vitamins in fermented foods, In J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods*, 603–619 pp, London: Blackie Academic and Professional
- Suskovic, J., Kos, B., Matosic, S. and Maric, V.**, 1997, Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* L4, *Food Technology and Biotechnology*, 35:107–112 pp.
- Szulc, K. and Lenart, A.**, 2012, Water vapour adsorption properties of agglomerated baby food powders, *Journal of Food Engineering*, 109:135–141 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Takashi, S. and Seibi, P. A.**, 1988, Paste and gel properties of prime corn and wheat starches with and without nitric liquids, *Cereal Chemistry*, 65:474 pp.
- Talamond, P., Gallon, G., Guyot J.P., Lape, I.M. and Tache, S.**, 1998, Comparison of high-performance ion chromatography and absorptiometric methods for the determination of phytic acid in food samples, *Analisis*, 26:396-400 pp.
- Talwalkar, A., Miller, C.W., Kailasapathy, K. and Nguyen, M.H.**, 2004, Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt, *International Journal of Food Science and Technology*, 39:605–611 pp.
- Tamime, A.Y. and McNulty, D.**, 1999, Kishk: a dried fermented milk/cereal mixture, 4. *Microbiological quality. Lait*, 79:449–456 pp.
- Teller, E. and Vanbelle, M.**, 1991, Probiotics facts and fiction, *Med. Fac. Landbow. Rijksuniv. Gent*, 56:1591-1599 pp.
- Thantsha, M.S., Cloete, T.E., Moolman, F.S. and Labuschagne, P.W.**, 2009, Supercritical carbon dioxide interpolymer complexes improve survival of *B. longum* Bb-46 in simulated gastrointestinal fluids, *International Journal of Food Microbiology*, 129:88-92 pp.
- Tian, B., Xie, B., Shi, J., Wua, J., Cai, Y., Xu, T., Xue, S. and Deng, Q.**, 2010, Physicochemical changes of oat seeds during germination, *Food Chemistry*, 119:1195–1200 pp.
- Toit, M.D., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T. and Holzaplet, W.H.**, 2000, Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces, *J App. Microbial*, 88:482-494 pp.
- Tok, E. ve Aslım, B.**, 2007, Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 37(1):62-68 s.
- Torino, M.I., Limón, R.I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C. and Frias, J.**, 2013, Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils, *Food Chemistry*, 136:1030–1037 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Trachoo, N., Boudreaux, C. and Moongngarm, A.,** 2006, Effect of germinated rough rice media on growth of selected probiotic bacteria, *Pakistan J. Biol. Sci.*, 9:2657–2661 pp.
- Tripathi, M.K. and Giri, S.K.,** 2014, Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *Journal of Functional Foods*, 9:225–241 pp.
- Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği,** Yayımlandığı Resmi Gazete:29.12.2011-28157, 3. Mükerrer.
- Urbano, G., Lopez-Jurado, M., Femandez, M., Moreu, M., Porres-Foulquie, J., Frias, J. and Vidal-Valverde, C.,** 1999, Ca and P bioavailability of processed lentils as affected by dietary fiber and phytic acid content, *Nutrition Research*, 1(19):49-64 pp.
- Ünal, E. ve Erginkaya, Z.,** 2010, Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu, *GIDA*, 35(4):297-304 s.
- Vanbelle, N., Teller, E. and Focant, M.,** 1990, Probiotics in animal nutrition. A Review, *Archiv Animal Nutrition*, 40:543-567 pp.
- Vanderhoof, A. and Rosemary, Y.,** 2002, Probiotics in pediatrics, *Pediatrics*, 109(5):956-958 pp.
- Varnam, A.H. and Surherland, J.P.,** 1994, Milk Powder Technology: Evaporation and Spray Drying, NIRO A=S, Denmark
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A.,** 2003, Lactic acid bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance, *Food Res. Int.*, 36:895–904 pp.
- Vitaglione, P., Napolitano, A. and Fogliano, V.,** 2008, Cereal dietary fibre: A natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut, *Trends in Food Science & Technology*, 19:451–463 pp.
- Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. and Sikkem, J.,** 2010, Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components, *International Dairy Journal*, 20:292–302 pp.
- Vrese, M. and Schrezenmeir, J.,** 2008, Probiotics, prebiotics, and synbiotics, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111:1–66 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M. and Vos, W.M.,** 2006, *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract, *International Dairy Journal*, 16:1018–1028 pp.
- Wang, C., Wu, S., Fang, J., Wang, Y. and Shyu, Y.,** 2012, Cardiovascular and intestinal protection of cereal pastes fermented with lactic acid bacteria in hyperlipidemic hamsters, *Food Research International*, 48:428–434 pp.
- Whistler, R.L.,** 1991, Microporous granular starch matrix composition, Lafayette Applied Chemistry, Inc.
- Wood, E.J.,** 1991, Protein purification methods: A practical approach; Edited by E.L.V. Harris and S. Angel. p 317. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Yağcı, R.,** 2002, Prebiyotikler ve probiyotikler, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 45(4):337-344 s.
- Yalçın, S. ve Yurdakök, K.,** 2000, Gastrointestinal sistem hastalıklarında probiyotik kullanımı, *Katkı Pediatri Dergisi*, 21(1): 122-138 pp.
- Yalçın, S., Çiftçi, İ., Önal, A.G. ve Yılmaz, A.,** 1996, Tuyem “3. Uluslararası Yem Kongresi Ve Yem Sergisi”, 30-33 s.
- Young, J.,** 1998, European market developments in prebiotic- and probioticcontaining foodstuffs, *Br. J. Nutr.*, 80:231–233 pp.
- Zacherl, C., Eisner, P. and Engel, K.H.,** 2011, *In vitro* model to corrolate viscosity and bile acid-binding capacity of digested water-soluble and insoluble fibres, *Food Chemistry*, 126:423-428 pp.
- Zubaidahl, E. and Akhadiana, W.,** 2013, Comparative study of inulin extracts from dahlia, yam and gembili tubers as prebiotic, *Food and Nutrition Sciences*, 4:8-12 pp.

ÖZGEÇMİŞ

18.02.1989 tarihinde İstanbul'da doğan Özlem KARAGÜL, ilkokula Üsküdar Fatih İlköğretim Okulu'nda başlamış ve Koruköy İlköğretim Okulu'nda tamamlamıştır. 2007 yılında Yalova Şehit Osman Altinkuyu Anadolu Lisesi'nde lise eğitimini tamamlamış ve Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nü kazanmıştır. 2011 yılında buradan mezun olmuş, aynı yıl Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır.