ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mikroenkapsüle *Streptococcus Thermophilus* Serbest Hücre Süpernatantı ile Kekik Ekstraktı Kombinasyonunun Balık Bozucu ve Patojen Bakteriler Üzerindeki Antibakteriyel Özellikleri

Nagihan KAZGAN

Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Ana Bilim Dalı

Temmuz, 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ V
SİMGELER VE KISALTMALAR VI
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
2.1. Laktik Asit Bakterileri 5
2.1.1. *Streptococcus Thermophilus* 5
2.2. Kekik ve Antimikrobiyal Özellikleri 6
2.3. Enkapsülasyon 7
3. MATERYAL VE METOT 9
3.1. Materyal 9
3.1.1. Kekik Ekstraktı 9
3.1.2. Bakteriyel Üyeler 9
3.2. Metot 9
3.2.1. *S. thermophilus* Süpernatantının Hazırlanması 9
3.2.2. Mikroenkapsülasyon İşlemi 9
3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Analizi 11
3.2.4. İstatistik Analiz 12
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 13
4.1. Mikroenkapsülasyonun Morfolojik Özelliği 13
4.2. *Streptococcus Thermophilus* Serbest Hücre Supernatantının Kimyasal İçeriği 14
4.3. Mikroenkapsüle Örneklerin Antimikrobiyal Aktivite Analizleri 17
4.3.1. Örneklerin Inhibisyon Çapları 17
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 21
KAYNAKLAR 25
ÖZGEÇMİŞ 33

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mikroenkapsüle *Streptococcus Thermophilus* Serbest Hücre Süpernatantı ile Kekik Ekstraktı Kombinasyonunun Balık Bozucu ve Patojen Bakteriler Üzerindeki Antibakteriyel Özellikleri

Nagihan KAZGAN

Danışman: Prof. Dr. Esmeray KÜLEY

Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışmada mikroenkapsüle *Streptococcus thermophılus* serbest hücre süpernatantı ile kekik ekstraktı kombinasyonunun balık bozucu ve patojen bakteriler üzerindeki antibakteriyel özellikleri araştırılmıştır. Mikroenkapsüle etanolik kekik ekstraktı ile kombine *S.thermophilus* süpernatantı 1.11-11.39 µm partikül büyüklüğüne sahip olmuştur. *S. thermophilus* serbest hücre ekstraktında toplam 11 bileşik belirlenmiş olup, asetik asit (%39.64), methyl-d3 1-dideuterio-2-propenyl ether (%10.87) ve 7-octen-2-ol, 2-methyl-6-methylene (%10.46) ana bileşenler arasında yer almıştır. Kekik ekstraktı 7 bileşen içermiş olup, ana bileşeni %67.96 ile karvakrol ve %25.77 ile 1,2,3-propanetriol olmuştur. Ekstraktların bakteriler üzerindeki inhibisyon zonları bakımından önemli farklılıklar ($p<0.05$) gözlenmiştir. En yüksek inhibisyon etki mikroenkapsüle edilmeyen kekik ekstraktında gözlenmiştir ($p<0.05$). Kekik ekstraktının balık bozucu bakterileri üzerindeki engelleyici etkisi 25.00 mm (*P. damselae*) ve 41.67 mm (*V. vulnificus*) arasında değişkenlik göstermiştir. Mikroenkapsüle *S. thermophilus* extraktları bakterilere karşı mikroenkapsüle edilmeyen formlarına oranla daha düşük inhibisyon zonu sergilemiştir ($p<0.05$). Araştırmada özellikle %2 oranında kekik ekstraktı ile kombine edilerek hazırlanan *S. thermophilus* ekstraktının mikroenkapsül formlarının bakteriler üzerinde genel olarak daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Streptococcus thermophilus,* kekik ekstraktı, antimikrobiyaller, gıda kaynaklı bakteriler

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

Msc THESIS

Antimicrobial Properties of Microencapsulated Cell Free Supernatant of *Streptococcus Thermophilus* in Combination With Thyme Extract On Fish Spoilage Bacteria and Food-Borne Pathogens

Nagihan KAZGAN

Advisor: Prof. Dr. Esmeray KÜLEY

Department of Fisheries and Seafood Processing Technology

ABSTRACT

In this study, the antibacterial properties of the combination of microencapsulated *Streptococcus thermophilus* cell free supernatant and thyme extract on fish spoilage and pathogenic bacteria were investigated. The combined *S. thermophilus* supernatant with the microencapsulated ethanolic thyme extract had a particle size of 1.11-11.39 μm. A total of 11 compounds were determined in the cell free supernatant of *S. thermophilus*, acetic acid (39.64%), methyl-d3 1-dideuterio-2-propenyl ether (10.87%), and 7-octen-2-ol, 2-methyl-6-methylene (10.46%) were the main components. Thyme extract contained 7 components, the main component being carvacrol with 67.96% and 1,2,3-propanetriol with 25.77%. Significant differences ($p<0.05$) were observed in the inhibition zones of the extracts on bacteria. The highest inhibition effect was observed in raw thyme extract ($p<0.05$). The inhibitory effect of thyme extract on fish spoilage bacteria varied between 25.00 mm (*P. damselae*) and 41.67 mm (*V. vulnificus*). Microencapsulated *S. thermophilus* extracts showed lower inhibition zone against bacteria compared to their crude extracts ($p<0.05$). As a results, it was found that microencapsule forms of *S. thermophilus* extract prepared especially in combination with 2% thyme extract, generally showed a higher antimicrobial effect on bacteria.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, thyme extract, antimicrobials, Food-borne bacteria

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca geniş bilgi birikimi ve deneyimiyle bana ışık tutan değerli danışman hocam Prof. Dr. Esmeray KÜLEY'e, çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen ve tezin geliştirilmesine katkı sağlayan Prof. Dr. Gülsün ÖZYURT'a, Arş. Gör. Yetkin SAKARYA'ya, Doç. Dr. Mustafa DURMUŞ'a, bakteri temininde desteklerini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Yekta GEZGİNÇ'e, tezin geliştirilmesinde emeklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Esra BALIKÇI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam esnasında maddi destek veren Ç.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FYL-2021-14027) içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında bana yardımcı olan maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. *Streptococcus thermophilus* serbest hücre süpernatantının kimyasal içeriği 15
Çizelge 4.2. Kekik ekstraktının kimyasal içeriği 16
Çizelge 4.3. Ekstraktların bakteriler üzerindeki inhibisyon zonları 17
Çizelge 4.4. Ekstraktların minimum inhibisyon (MIK) ve bakterisit konsantrasyonu (MBK) (mg/mL) 18

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kekiğin genel görünümü.....6
Şekil 3.1. Sprey kurutucu.....10
Şekil 3.2. Taramali elektron mikroskobu (SEM, scanning electron microscope).....10
Şekil 3.3. Gaz kromotografisi-kütle spektrometresi (GC-MS).....11
Şekil.4. 1. Mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantının SEM görüntüsü.....13
Şekil.4.2. Mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantı ile kombine kekik ekstraktının (%1) SEM görüntüsü.....13
Şekil.4.3. Mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantı ile kombine kekik ekstraktının (%2) SEM görüntüsü.....14

SİMGELER VE KISALTMALAR

KE : Kekik ekstraktı

KOB : Koloni Oluşturan Birim

LAB : Laktik Asit bakterileri

MBK : Minimum Bakterisit Konsantrasyonu

MIK : Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

SE : *Streptococcus. thermophilus* supernatantı

1. GİRİŞ

Balıklar bakteriler açısından zengin bir ortamda yaşamakla birlikte patojenik veya fırsatçı mikroorganizmaların istilasına karşı oldukça savunmasızdırlar (Zhang ve ark., 2008). Su ürünlerinin bozulmasına enzimler, dehidrasyon, oksidasyon, mikrobiyal kontaminasyon ve fiziksel darbeler yol açmaktadır. Balıkta bozulma ilerledikçe sülfür, amonyak ve balık kokusu organoleptik değişimlere sebep olmaktadır (Gram ve ark., 2002). Balık bozulmasının ana sebebi ise kötü koku ve tada sebep olan amin, sülfit, aldehit, keton ve organik asit oluşumuna yol açan mikrobiyal gelişim ve metabolik aktivitedir (Robson ve ark., 2007; Wang ve ark., 2017).

Yeni avlanmış balık bakteri yükü bakımından hemen hemen yoksun olmakla birlikte, balık yüzeyi, solungaç ve iç organları önemli düzeyde bakteri içerebilmektedir. Balık öldüğünde, bu bakteriler balık etine hücum ederek bozulmaya ve istenmeyen bileşiklerin oluşumuna neden olurlar (Singh ve ark., 2011). Balığın bozulması, başlangıçtaki bakteri florasına, taşıma ve işleme sırasında ortaya çıkan floraya, balığın depolama ve işleme sırasında maruz kaldığı koşullara ve balığın kimyasal bileşimine bağlıdır (ICMSF, 1980).

Balık ve balık ürünleri *Bacillus, Clostridium, Escherichia, Serratia,* ve *Vibrio* gibi su ve topraktan bulaşan patojenik bakterileri içerebilmektedir. Gram-negatif aerobik, fakültatif anaerobik çubuklar ve koliformlar balık etinin bozulmasında en önemli bakteriyel üyeleri oluşturmaktadır (Erkmen ve Bozoglu, 2016). Taze ve hafif işlenmiş balık ürünleri büyük olasılıkla *Shewanella* sp. (*S. putrefaciens, S. baltica*), *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. (*P. fragi, P. fluorescens, P. Putida* ve *P. lundensis*), *Photobacterium* sp. (*P. phosphoreum, P. illiopiscarium*), *Enterobacteriaceae* (*Serratia proteomaculans, Hafnia alvei*) veya *Brochothrix thermosphacta* gibi psikrotrofik Gram negatif bakterilerle bozulmaya uğramaktadır (Gram ve Huss, 1996; Gram ve Dalgaard, 2002; Lovdal, 2015).

Gıdalarda mikrobiyal gelişimi engellemek ve gıda güvenliği sağlamak için çeşitli sentetik antimikrobiyaller kullanılmaktadır. Ancak, bu sentetik koruyucuların teratojenik, kanserojen veya başka şekilde toksik olabileceğine dair endişeler mevcuttur (Tzima ve ark., 2015). Bu sebeple, gıda korumada doğal ve geniş anmikrobiyal aktivite spektrumuna sahip gıda katkılarının araştırılması çok önemlidir (Holley ve Patel, 2005).

Laktik asit bakterileri bakteriyosin, organik asit ve hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal özelliklere sahip metabolitler üretebilme yeteneklerinden dolayı eski zamanlardan beri fermentasyon işlemlerinde ve koruyucu olarak kullanılmaktadır (Leroy ve De Vuyst, 2004). Bu metabolitler gıdalarda istenmeyen gıda kaynaklı patojenleri ve bozucu mikroorganizmaları inhibe etmesiyle gıda güvenliğini ve ürün raf ömrünü arttırmaktadır. Ayrıca bu bakteriler çeşitli enzimler, eksopolisakkaritler ve aroma bileşikleri üretmektedir (Jose ve ark., 2015). Laktik asit bakterisi serbest hücre ekstraktı saf probiyotik ekstrakta kıyasla depeolama süresince daha fazla stabilite, antipatojenik ve antioksidan etki sergilemiştir (Saadatzadeh ve ark., 2013). Gıda hazırlamada

antimikrobiyal içerik olarak laktik asit bakterileri serbest hücre ekstraktının kullanılması, özellikle soğutmaya tabi tutulan gıdalar gibi canlı mikroorganizmaların aşılanmasının mümkün olmadığı durumlarda patojenlerin önlenmesinde etkili olabilmektedir (Arena ve ark., 2016). Laktik asit serbest hücre ekstraktında bulunan antimikrobiyal bileşikler laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit ve diasetildir (Hor ve Liong, 2014).

Yıllardır gıda ürünlerinde güvenli kullanımlarından dolayı, *Streptococcus thermophilus* Amerikada genellikle güvenli kabul edilen (GRAS) ve Avrupa Biriliği'nde nitelikli güvenlik karinesi (Qualified Presumption of Safety; QPS) statüsünde yer alan bir laktik asit bakteri üyesidir (Martinovic ve ark., 2020). *S. thermophilus* peynir, yoğurt ve diğer kültür süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılan heterotrofik starter kültürdür (Hutkins ve Goh, 2014). *S. thermophilus* 0,7-0,9 μm çapında, oval ile oval arası hareketsiz bir koktur. Bakterinin optimum büyüme sıcaklığı 40–45 °C, minimum 20–25 °C ve maksimum 47–50 °C civarındadır (Harnett ve ark. 2011). *S. thermophilus* fermantasyon sırasında karakteristik yoğurt aromasından sorumlu olan laktik asit ve asetaldehit üretmek için *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ile simbiyotik olarak gelişir. Peynirlerde, *S. thermophilus*, sütün asitlenmesine ve olgunlaşma sırasında lezzete katkıda bulunur. *S. thermophilus* ayrıca hücre dışı polisakkaritlerin, bakteriyosinlerin ve vitaminlerin üretimi gibi bir dizi fonksiyonel aktiviteye sahiptir (Gobbetti ve Calasso, 2014)

Aromatik bitkiler, ekstraktları ve esansiyel yağları gıda, yem, tıp ve kozmetik sektöründe olası uygulamalara sahip çeşitli fonksiyonel biyoaktif bileşikleri içermektedir (Christaki ve ark., 2012). Bitkilerdeki biyoaktif bileşenler polifenoller, fenoller, flavonoidler, taninler, alkaloidler, terpenoidler, isothiosiyanatlar, lektinler, polipeptirler veya bunların oksijenli türevleri olmaktadır (Negi, 2012).

Kekik (*Thymus vulgaris*) *Lamiaceae* familyasına ait bir bitki olup, çeşitli gıdalarda, içecek ve şekerleme ürünlerinde aroma artırıcı ve parfümeri ve krem gibi kozmetikte koku bileşeni olarak kullanılır. Antiseptik, bronşiolitik, antispazmodik ve antimikrobiyal özelliklerine sahip olmasından dolayı kekik tıbbi bitki ve gıda koruyucu olarak bir popülariteye sahiptir (Nzeako ve ark., 2006). Kekik ekstraktının ana bileşenlerinin karvakrol (%52.3), linalool L (%16) ve timol (%9.6) olduğu bildirilmiştir (Sabzikar ve ark., 2020). Kekiğin etanolik ekstraktı *Bacillus subtilis, Shigella sonnei* ve *Escherichia coli* gelişimini önemli düzeyde inhibe etmiştir (Fan ve Chen, 2001; Kuley ve ark., 2018). Kekiğin sulu ekstraktı diğer ekstraktlara oranla daha düşük antimikrobiyal aktivite sergilemiş olup, sadece *Staphylococcus aureus*'a karşı aktif olmuştur (Nzeako ve ark., 2006). %10 ve %40 konsantrasyonundaki kekik ekstraktının *Staphylococcus aureus* (12.5 ve 23.3 mm) ve *Candida albicans'*a (7.0 ve 22.5 mm) karşı yüksek inhibisyon zon gösterdiği rapor edilmiştir (Sabzikar ve ark., 2020). *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus acidolactici* serbest hücre ekstraktının kekik ekstraktı ile birlikte kombine kullanımının soğuk depolanan fermente sardalyanın raf ömrünü arttırmada en etkili yol olduğu rapor edilmiştir (Kuley ve ark., 2018).

Bu çalışmada da antimikrobiyal özelliklerini arttırmak amacıyla, mikroenkapsüle *S. thermophilus* serbest hücre süpernatantı ile kekik kombinasyonlarının balıkta bozulma etmeni bakteriler ve gıda kaynaklı patojenler üzerindeki in vitro antibakteriyel etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), Gram pozitif, spor oluşturmayan ve aerotolerant ve glikozdan başlıca laktik asit üreten mikroorganizmalardır (Mokoena ve ark., 2017; Ayivi ve ark., 2020). LAB, bitki materyallerinden, süt ürünlerinden, gıdalar, tahıllar, pancar, meyve suları, insan ve hayvanların iç organlarından, fermente edilmiş ve salamura edilmiş ürünlerden izole edilebilir (Mokoena, 2017). LAB'ler hücresel morfoloji, glikoz fermantasyon tipi, çeşitlilik, büyüme sıcaklığı ve şeker kullanımı açısından kategorize edilir (Mokoena ve ark, 2021). LAB cinsleri *Acetilactobacillus, Amylolactobacillus, Agrilactobacillus, Apilactobacillus, Companilactobacillus, Bombilactobacillus, Dellaglioa, Fructilactobacillus, Holzapfelia, Furfurilactobacillus, Lactiplantibacillus, Lacticaseibacillus, Lactobacillus, Latilactobacillus, Lapidilactobacillus, Levilactobacillus, Lentilactobacillus, Ligilactobacillus, Limosilactobacillus, Loigolactobacilus, Liquorilactobacillus, Paralactobacillus Paucilactobacillus, Secundilactobacillus, Schleiferilactobacillus,* ve *Streptococcus* olmaktadır (Zheng ve ark, 2020; Ayivi ve ark., 2020). Ayrıca LAB üyeleri öncelikle homofermentatif ve heterofermentatif gibi iki gruba ayrılırlar. Fermentasyon süresince, homofermentatif LAB tarafından laktik asit oluşturulurken, asetik asit, laktik asit, alkol ve karbondioksit heterofermentatif LAB tarafından üretilir (Oliveira ve ark., 2017; Ng ve ark., 2020).

2.1.1. *Streptococcus Thermophilus*

S. thermophilus fakültatif anaerobik gram pozitif bir bakteridir. Homolaktik fermentasyon özelliği gösteren bu bakteri GRAS (tüketimi genellikle güvenli olarak tanınan) satüsünde yer almaktadır (Purwandari ve ark., 2007). *S. thermophilus* doğal olarak fermente sütlerde, peynir ve diğer süt ürünlerinde ve bazı bitkilerde bulunur (Huang ve ark., 2023). Fermantasyonundaki ana özelliği, hızlı asitleşme ve diğer mikroorganizmaların inhibisyonu ile sonuçlanan laktik asit üretimidir. *S. thermophilus* tarafından üretilen ikincil metabolitler olan asetaldehit ve ekzopolisakkaritler ürünün lezzetini ve dokusunu güçlü bir şekilde etkilemektedir (Markakiou ve ark., 2020).

S. thermophilus laktozun yanında sukroz, glukoz, galaktoz ve şekeri fermente edebilmektedir. Laktozu hızlıca fermente etme yeteneklerinden dolayı *S. thermophilus* fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak diğer LAB üyeleri ile birlikte simbiyortik olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *S. thermophilus* anti-enflamatuar aktivite, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite ve ayrıca immünomodülatör etkilerinden dolayı probiyotik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Uriot ve ark., 2017; Dargahi ve ark., 2021). Bu üye süt ürünlerinde *Lactococcus lactis*'den sonra en önemli endüstriyel starter kültürler arasında yer alır (Xu ve ark., 2023). Bazı *S. thermophilus* üyeleri termofilin denilen küçük peptitler üretebilmekte bu bakteriyosinler Gram-

pozitif patojenik *Enterococcus faecalis, Clostridium botulinum, Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı engelleyici etki sergilemektedir (Huang ve ark., 2023)

2.2. Kekik ve Antimikrobiyal Özellikleri

Kekik, güçlü aroma özelliğinden dolayı tüm dünyada baharat olarak kullanılan 60 farklı tür bitkiye verilen genel bir isimdir. Bu türler arasında özellikle *Thymus, Origanum, Satureja, Thymbra* ve *Coridothymus* üyeleri ekonomik olarak büyük önem taşımaktadır (Başer, 1994). *Origanum* üyelerinin %60'ı Türkiye'de yetiştirildiğinden, Türkiye *Origanum* cinsinin anavatanı durumundadır (Kintzios, 2002). Kekik *Lamiaceae* familyasına ait (Baytop, 1997) bir bitki olup (Resim 1), çeşitli gıdalarda, içecek ve şekerleme ürünlerinde aroma artırıcı, kozmetikte ise parfümeri ve krem gibi ürünlerde koku bileşeni olarak kullanılır. Antiseptik, bronşiolitik, antispazmodik ve antimikrobiyal özelliklerine sahip olmasından dolayı kekik tıbbi bitki ve gıda koruyucu olarak bir popülariteye sahiptir (Nzeako ve ark., 2006).



Şekil 2.1. Kekiğin genel görünümü

Origanum türlerinin esansiyel yağ içerikleri fazlaca çeşitlilik göstermektedir. Buna göre çoğu *Origanum* türü asıl bileşen olarak kavrakrol ve/veya timol içerirken gamma-terpinen ve p-simen bileşiklerine de çoğu bitkide rastlanmaktadır (Daouk ve ark., 1995; Sokovic ve ark., 2002; Esen ve ark., 2007). Kekik bitkisine kokusunu veren timol ve karvakrol maddeleridir. Bu maddeler kekik uçucu yağının ana bileşenlerini oluşturmaktadır. Timol güçlü bir antimikrobiyaldir (Akgül 1993). Kekiğin etanolik ekstraktı *Bacillus subtilis, Shigella sonnei* ve *Escherichia coli* gelişimini önemli düzeyde inhibe etmiştir (Fan ve Chen, 2001; Kuley ve ark., 2018). Kekiğin sulu ekstraktı diğer ekstraktlara oranla daha düşük antimikrobiyal aktivite sergilemiş olup, sadece *Staphylococcus aureus*'a karşı aktif olmuştur (Nzeako ve ark., 2006). %10 ve %40 konsantrasyonundaki kekik ekstraktının *Staphylococcus aureus* (12.5 ve 23.3 mm) ve *Candida albicans'*a (7.0 ve 22.5 mm)

karşı yüksek inhibisyon zon gösterdiği rapor edilmiştir (Sabzikar ve ark., 2020). *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus acidolactici* serbest hücre ekstraktının kekik ekstraktı ile birlikte kombine kullanımının soğuk depolanan fermente sardalyanın raf ömrünü arttırmada en etkili yol olduğu rapor edilmiştir (Kuley ve ark., 2018). Kekik esansiyel yağları *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibitör etki göstermektedir (Rasooli ve ark., 2006).

2.3. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, gıda bileşenleri, enzimler, mikroorganizmalar gibi katı veya sıvı yapılı maddelerin kaplama materyali ile kaplanıp çevresel şartlara karşı daha dirençli hale getirilmesi olarak tanımlanabilir (Fang ve Bhandari, 2010). Enkapsülasyon işlemi, biyoaktif bileşenleri farklı gıda ürünlerine kombine etmek ve bunları istenmeyen çevresel koşullardan korumak ve bu sebeple ürünün raf ömrünü artırmak amacıyla gıda endüstrisi tarafından uygulanmaktadır (Drosou ve ark., 2017).

Mikroenkapsüllenmiş malzemeler, üretim boyunca lipid oksidasyonu ve besinsel bozulma gibi olumsuz reaksiyonlara, kötü işleme ve kötü depolama koşullarına karşı korunur (Chen ve ark., 2013). Mikroenkapsülasyonun bir diğer önemli özelliği de uçucu bileşenlerin kayıplarına karşı koruma sağlamasıdır. Mikrokapsülasyonun gıda endüstrisinde uygulanması çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Bunlar ana bileşenin çevresel faktörlerden kaynaklanan reaktivitesini azaltmak, harici bileşenin ana bileşen malzemesine geçiş hızını azaltmak, enkapsülasyon ile daha kolay kullanımı teşvik etmek, ana bileşen maddesinin salınımını kontrol etmek, ana bileşenin tadını maskelemek ve çok az miktarda kullanıldığında ana bileşen malzemesini seyreltmektir (Shahidi ve Han, 1993; Durmus ve ark., 2023). Enkapsülasyon yöntemin amacı aktif olarak kullanılacak çekirdek malzemelerin nanometrik, mikrometrik veya milimetrik ölçülerde kaplama materyali içinde tutulmasını sağlamaktır (Rodrigues ve ark., 2018). En yaygın kullanılan enkapsülasyon yöntemleri, birkaç mikrometreden birkaç milimetreye değişen kapsüllerle sprey kurutma, dondurarak kurutma, ekstrüzyon, lipozom uygulamaları, hava süspansiyon kaplama ve kristalizasyon gibi yöntemlerdir (Gharsallaoui ve ark., 2007; Cavalheiro ve ark. 2019). Mikroenkapsülasyon 0.2 ile 5000 μm arasında değişen büyüklüğe sahip mikropartiküller olarak adlandırılır (Silva ve ark., 2014). Mikroenkapsülasyon için sprey kurutma, dondurarak kurutma, konservasyon, emülsiyona dayalı yöntemler, ekstrüzyon, süperkritik akışa dayalı yöntemler, spreysoğutma, ultrasounda dayalı yöntemler ve lipozomlar gibi çeşitli prosedürler kullanılır (Chawda ve ark., 2017). Saadatzadeh ve ark. (2013) depolama süresince probiyotik hücrelere kıyasla supernatantlarının antipatojenik etkilerinin ve stabilitesinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bu sebeple laktik asit bakteri supernatantlarının enkapsülasyonu antimikrobiyal olarak yeni bir potansiyel oluşturmaktadır.

Mikrokapsülleme işleminde kekik ekstraktının baskın fenolik bileşenleri yüksek sıcaklıklardan etkilendiğinden, mikrokapsülleme sonrası antioksidan aktivitenin püskürterek

kurutma ile büyük ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (Yesilsu ve Özyurt, 2019). Ancak, Özyurt ve ark. (2023) püskürtmeli kurutmada kaplama materyali olarak artan oranda maltodekstrin kullanımının üründeki esansiyel amino asit ve gamma linoleik yağ asit miktarını koruduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle kaplanması hedeflenen her bileşen için cihaz giriş ve çıkış sıcaklığı, akış besleme oranı, duvar malzemesinin seçimi ve oranı gibi uygun mikroenkapsülasyon şartlarının belirlenmesi önemlidir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kekik Ekstraktı

Çalışmada etanolik kekik *(Origanum vulgare*) ekstraktı kullanılmış olup Biomesi Bioagro Teknoloji AR-GE (Adana) Firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Bakteriyel Üyeler

Araştırmada *Streptococcus thermophilus* kullanılmış olup (Gezginç ve ark., 2015), bu bakteri Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesinden tedarik edilmiştir. Balıkta bozulma etmeni bakteriler olarak *Photobacterium damselea, Proteus mirabilis,* ve *Vibrio vulnificus* kullanılmıştır. Bu bakteriler bozulmuş hamsi, uskumru ve sardalya etinden izole edilmiştir (Kuley ve ark., 2017). Çalışmada gıda kaynaklı patojen bakteri olarak Gram pozitif *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) ve *Enterococcus faecalis* ATCC29212, Gram negatif olarak da *Salmonella* Paratyphi A (NCTC13) kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. *S. thermophilus* Süpernatantının Hazırlanması

Laktik asit bakteri süpernatantı modifiye edilmiş Lin ve Yen (1999) yöntemine göre yapılmıştır. *S. thermophilus* M17 broth'da (56156, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE, USA) 37 °C'de 48 saat geliştirildikten sonra, 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 4 °C'de 8.000 RPM'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst faz membran filtreden geçirilerek UV ile steril edildikten sonra (20 dk) analiz zamanına kadar 4 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Mikroenkapsülasyon İşlemi

Mikroenkapsülasyon işlemi modifiye edilmiş Marcela ve ark. (2016) yöntemine göre yapılmıştır. *S. thermophilus*'dan elde edilen süpernatantlar bireysel olarak mikroenkapsüle edilmiştir. Diğer gruplar % 1 ve 2 kekik ekstraktını içeren *S. thermophilus* süpernatantları ile birlikte mikroenkapsüle edilmiştir. Bütün gruplar kurutma işlemi öncesi %25 oranında maltodekstrin (DE: 18-20) Alfasol, Turkey) ile kaplanmıştır. Karışım Ultra-Turrax ile 10 dk karıştırılmıştır. Her bir gruptan 250 ml örnek alınrak mini spray-dryer (Buchi-290, Flawil, Switzerland) kullanılarak kurutulmuştur (Şekil 3.1). Sprey kurutma koşulları giriş sıcaklık 130 °C, çıkış sıcaklık 75 °C, aspirasyon oranı 30 m^3/saat, besleme oranı 20 mL/dk olmuştur. Sprey ~~altında~~ kurutma sonrası bütün örnekler ışık geçirmez plastik şişelere konularak analiz gününe kadar 4 °C'de depolanmıştır.



Şekil 3.1. Sprey kurutucu

Mikropartiküllerin morfolojik özellikleri

Sprey kurutma ile elde edilen partiküllerin morfolojisi Quanta 650 field emission scanning electron microscopy (SEM, FEI company, Hillsborn, OR, US) kullanarak karakterize edilmiştir (Şekil 3.2). SEM görüntüleri oda sıcaklığında ve 20 kv voltajda elde edilmiş ve 10000 ve 20000 büyütme ile sonuçlar görsel olarak kaydedilmiştir.



Şekil 3.2. Taramali elektron mikroskobu (SEM, scanning electron microscope)

Gaz Kromotografisi -Kütle Spekrometresi (GC-MS) Analizi

GC-MS analizi mass-spectrometer (MS) sistemli Agilent 7890A Gaz Kroomatografisi kullanarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.3). Polar olmayan (%5- Phenyl)-methylpolysiloxane kolon (30 m × 250 µm × 0.25 µm, Agilent 1901S-433HP-5MS) kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum (Linde, Munich, Germany) kullanılıp, akış oranı 1.5 mL/dk olmuştur. Başlangıç fırın sıcaklığı 50 °C olup, 2°C/dk oranı ile 240 °C final sıcaklığa ulaşmıştır. Enjeksiyon miktarı 1 µL olmuştur. GC analizi 105 dk da gerçekleşmiştir. GC-MS çalışma süresi 105 dk olmuştur. GC-MS'de tespit edilen pikler NIST/EPA/NIH (version 2.0) ticari kütüphane ile kontrol edilmiştir. Her bir bileşiğin nispi % değeri ortalama pik alanı ile toplam alan karşılaştırılarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.3. Gaz kromotografisi-kütle spektrometresi (GC-MS)

3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Analizi

Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi

Araştırmada *S. thermophilus* serbest hücre supernatantı ve kekik kombinasyonunun (1%) saf ve mikroenkapsülasyonlarının in vitro antimikrobiyal aktivite düzeyi Mueller-Hinton Agar (MHA, Merck 1.05437, Darmstadt, Germany) kullanarak modifiye edilmiş Hwanhlem ve ark. (2017)'nın uyguladığı well difüzyon metoduna göre belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite testi için, mikroenkapsüle örnekler 1:2 oranında distile su ile çözdürülmüştür. Balık bozucu bakteriler Nutrient broth'da (Merck 1.05443, Darmstadt, Germany) 37 °C'de 24 saat geliştirildikten sonra, 0.5 Mcfarland hücre yoğunluğuna (10^8) standardize edilmiştir. Her bir bakteriyel hücre kültürü (100 µL) 20 mL Muller Hilton agar içeren petri kutusuna aşılanmıştır. Katı besiyeri içerisinde 5 mm'lik 5 adet kuyucuklar oluşturulmuştur. 4 kuyucuğa 50 µl saf ya da mikroenkapsüle ekstrakt aşılanmıştır. Diğer kuyucuğa kontrol olarak distile su ya da maltodekstrin aktarılmıştır. Sonrasında

petri kutuları 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası herbir kuyucuğun çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpas yardımıyla mm olarak ölçülmüştür.

Minimum Inhibisyon (MIK) ve Bakterisit Konsantrasyonu (MBK)

Çalışmada minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIK) ve minimum bakterisit konsantrasyonu (MBK) CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2006) mikrodilüsyon metoduna göre belirlenmiştir. 37 ºC'de 24 saat inkübe edilen test mikroorganizmaları 0.5 MacFarland hücre yoğunluğuna standardize edilmiştir. Besiyeri olarak Mueller-Hinton Broth (MHB, Oxoid, CM0405) kullanılmıştır. 50 mg/ml olarak saf ve mikroenkapsüle ekstraktlardan hazırlanan stok solüsyon steril tüpler içerisinde 0.19 µg/ml düzeyine kadar seyreltilmiştir. İçerisinde sadece stok solüsyon ya da saf kültür bulunan tüp kontrol olarak değerlendirilmiş olup, MHB içeren diğer tüpler test mikroorganizmalarını ve seyreltik stok solüsyonları içermiştir. Kullanılacak olan tüpler tekrarlı hazırlanarak, 37 ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir. Test tüplerindeki bakteriyel gelişimler kontrol tüplere göre kıyaslanarak, bakteriyel gelişimde en düşük inhibisyon gözlenen tüpler MIK olarak kaydedilmiştir. MIK sonuçları doğrultusunda, bakteriyel gelişim göstermeyen tüplerden Mueller Hinton Agar yüzeyine aşılama yapılarak, petri kutuları 37 ºC'de 24 saat inkübe edilerek MBK değerleri kaydedilmiştir.

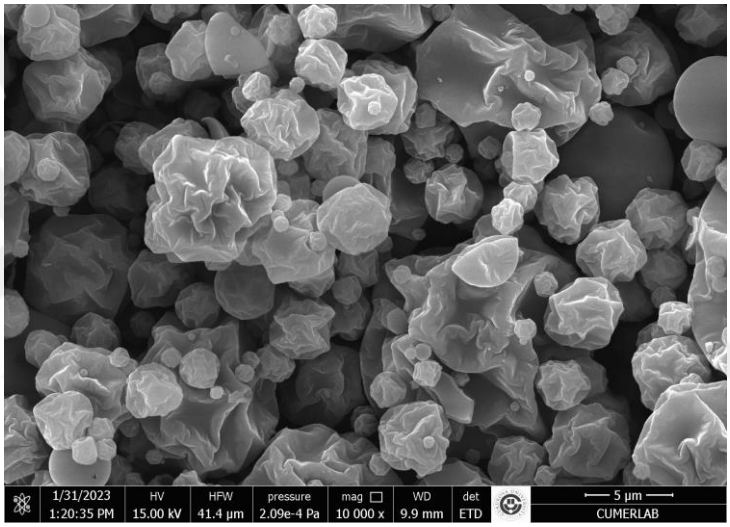
3.2.4. İstatistik Analiz

İstatistik analizler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan'ın Çoklu karşılaştırma Testi (SPSS 22, Chicago, Illinois, USA) kullanılmıştır. $P<0.05$ karşılaştırma sonucu gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirtmiştir.

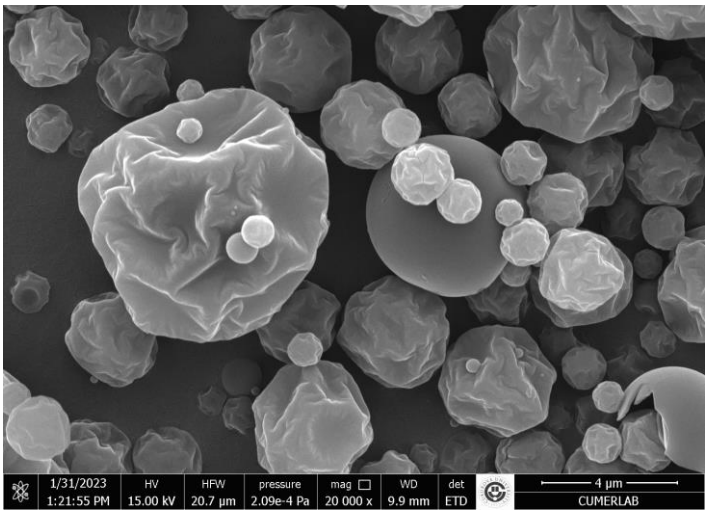
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Mikroenkapsülasyonun Morfolojik Özelliği

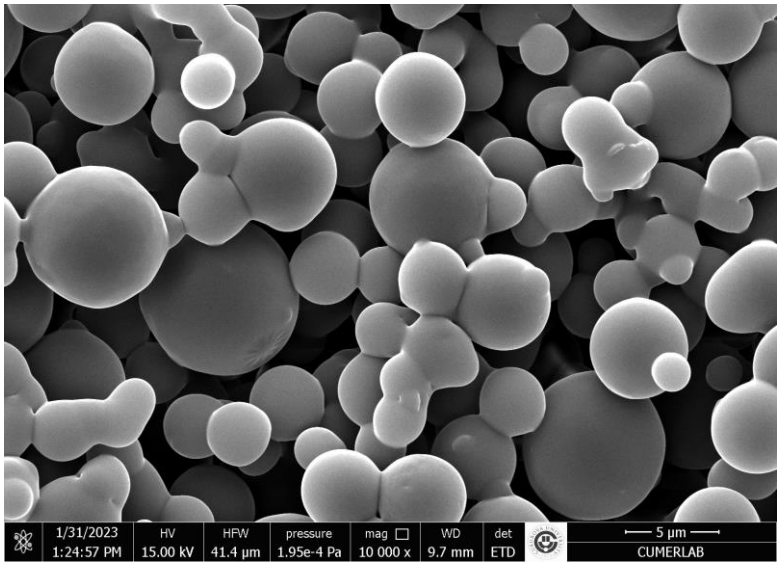
Mikroenkapsülasyonlar 0.2 ile 5,000 µm arasındaki büyüklükteki mikropartiküller olarak tanımlanmaktadır (Silva ve ark., 2014). Bu çalışmada mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantı 1.15 – 14.08 µm, mikroenkapsüle %1 etanolik kekik ekstraktı ile kombine *S.thermophilus* süpernatantı 1.11-11.50 µm ve mikroenkapsüle %2 etanolik kekik ekstraktı ile kombine *S.thermophilus* süpernatantı 2.71-11.39 µm partikül büyüklüğüne sahip olmuştur (Şekil 4.1-4.3). Sprey kurutma ile elde edilen partiküllerin büyüklükleri kaplama materyali, enkapsüle materyalin miktarı ve vizkozitesi ile kurutma koşullarına bağlı olarak (Wyspiańska ve ark., 2019) değişiklik göstermiştir.



Şekil 4.1. Mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantının SEM görüntüsü



Şekil 4.2. Mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantı ile kombine kekik ekstraktının (%1) SEM görüntüsü



Şekil 4.3. Mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantı ile kombine kekik ekstraktının (%2) SEM görüntüsü

Mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantı buruşuk yapıda küresel forma sahip olmuştur (Şekil 4.1). Süpernatanda kekik katkısı buruşuk formda azalmaya yol açmıştır. Özellikle %2 kekik katkısına sahip mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantı tamamiyle küresel yapı arz etmiştir (Şekil 4.3). Spray kurutma koşullarındaki farklılıklar partiküllerin küresel formunu etkileyebilmektedir (Piñón-Balderrama ve ark., 2020). Bu çalışmadan farklı olarak mikroenkapsüle *Lactobacillus plantarum* serbest hücre ekstraktı propolis ekstraktı varlığında daha buruşuk form sergilemiştir (Kuley ve ark., 2021). Mikroenkapsüllerde meydana gelen çökmeler kuruma süresi boyunca nemin taşınabilme olasılığından kaynaklanabilmektedir (Mis Solval ve ark., 2016; Yeşilsu ve Özyurt, 2019).

4.2. *Streptococcus Thermophilus* Serbest Hücre Supernatantının Kimyasal İçeriği

Çizelge 4.1. *Streptococcus thermophilus* serbest hücre süpernatantının kimyasal içeriğini göstermektedir. *Streptococcus thermophilus* serbest hücre süpernatantında toplam 11 bileşik belirlenmiş olup, asetik asit (%39.64), methyl-d3 1-dideuterio-2-propenyl ether (%10.87) ve 7-octen-2-ol, 2-methyl-6-methylene (%10.46) ana bileşenler arasında yer almıştır. Propane, 2-fluoro-2-methyl- (%8.92), imidodicarbonic diamide (%7.64), tetrahydro-1,3-oxazine-2-thione (%7.21), 1,2,3-propanetriol (% 5.8) ve 2-methyl-1,3-oxathiolany-propionic acid ethyl ester (%5.42) *S. thermophilus* serbest hücre süpernatantında bulunan diğer önemli bileşenler olmuştur.

Çizelge 4.1. *Streptococcus thermophilus* serbest hücre süpernatantının kimyasal içeriği

	Bileşikler	**RT**	**%**
1.	Methyl-d3 1-dideuterio-2-propenyl ether	2.125	10.87
2.	7-Octen-2-ol, 2-methyl-6-methylene	2.176	10.46
3.	Acetic acid	2.686	39.64
4.	Imidodicarbonic diamide	3.143	7.64
5.	Tetrahydro-1,3-oxazine-2-thione	3.647	7.21
6.	2-methyl-1,3-oxathiolany-propionicacid ethyl ester	3.927	5.42
7.	Butanoic acid, 3-methyl- (isovaleric acid)	4.522	0.28
8.	(R*,S*)-2-(1'-Nitroethyl)-2-methyl- 1,3-oxathiolane	7.978	0.94
9.	Methanamine, N-methoxy-	8.470	2.82
10.	Propane, 2-fluoro-2-methyl-	8.636	8.92
11.	1,2,3-Propanetriol	8.762	5.8

Laktik asit bakterilerinin serbest hücre supernatantının antimikrobiyal aktivitesi başlıca laktik asit ve asetik asitten kaynaklanmaktadır. Karbon metabolizması ürünü olan asetik asit diğer asitlere oranla daha yüksek pKa değerinden (4.87) dolayı, bakteri, küf ve mayalara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004; Mani-Lopez ve ark., 2022). *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* 0.031-6.491 mg/ml laktik asit; 0.372 – 0.863 mg/ml protein; 0.009–0.029 mg/ml hidrojen peroksit 0.450–0.662 mg/ml diasetil üretmiştir (George-Okafor ve ark., 2020). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen biyoaktif maddeler kültürel koşullara ve bakteriyel üyelerin fizyolojik özelliklerine göre değişkenlik gösterebilmektedir (George-Okafor ve ark., 2020).

Çizelge 4.2 kekik ekstraktının kimyasal içeriğini vermektedir. Kekik ekstraktı 7 bileşen içermiş olup, ana bileşeni %67.96 ile phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl) (karvakrol) ve %25.77 ile 1,2,3-propanetriol (Glycerin) oluşturmuştur. Ayrıca kekik ekstratında propane, 2-fluoro-2-methyl- % 3.97 oranında bulunmuş olup, diğer bileşenler %0.5'in altında olmuştur. Karvakrol ve timol kekik esansiyal yağında bulunan önemli antifungal bileşenler olmaktadır (Shokri ve ark., 2012; Abbaszadeh ve ark., 2014).

Çizelge 4.2. Kekik ekstraktının kimyasal içeriği

	Bileşikler	RT	%
1.	Ethane, 1,1-diethoxy-	3.149	0.04
2.	1,1-Diethoxy-2-methylpropan-2-ol	7.749	0.07
3.	1,2,3,4-Tetrahydroxybutane	8.310	0.04
4.	1,2,3-Propanetriol (Glycerin)	8.362	25.77
5.	Propane, 2-fluoro-2-methyl-	8.499	3.97
6.	Thymol	19.411	0.05
7.	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl) (Karvakrol)	19.726	67.96

Timol taze bitkide (%73.21), karvakrol ise kurutulmuş bitkide bulunan (% 62.87) başlıca bileşendir (Saleem ve ark., 2004). Kekik (*Zataria multiflora*) ekstraktında ana bileşenler karvakrol (52.32%), linalool L (%15.96), timol (%9.59), 1-methylpyrroline (%3.53) ve trans-caryophyllene (%3.43) olmuştur (Sabzikar ve ark., 2020). Mehrabi ve ark. (2021) kekikteki ana bileşenlerin timol (25.30%), δ-2- carene (8.825%) ve karvakrol (8.43%) olduğunu bildirmiştir. Mohammadigholami (2016) kekik esansiyal yağında 45 bileşen bulunduğu bunların başlıcalarının karvakrol (%52.4), γ-trpynen (%12.1) ve timol (%10.4) olduğunu bildirmiştir. Fadil ve ark. (2018) kekik esansiyel yağındaki majör bileşiklerin timol (37.54%), p-cymene (14.49%), γ-terpinene (11.15%), linalool (4.71%) ve karvakrol (4.62%) olduğunu rapor etmiştir. *Thymus migricus, Thymus eriocalyx, Thymus serpylum, Zataria multiflora* ve *Thymus kotschyanus* gibi kekik bitkilerindeki dominant bileşikler linalool (41.8%), geraniol (61.8%), para cymene (23.8%), karvakrol (57.7%) ve uulegone (37.2%) olmuştur (Mehran ve ark., 2016). Süper kritik akış CO_2 ekstraksiyonu ile elde edilen kekik ekstraktı bileşenlerinin timol (45.16 %), phytol isomer (7.17 %), karvakrol (5.2 %), 9-octadecenal (4.84 %), caryophyllene oxide (4.27 %) ve trans-β-caryophyllene (2.86 %) olduğu bildirilmiştir (Morsy ve ark., 2020). Kekiğin (*Zataria multiflora*) yapraklarından ve dallarından elde edilen etanolik ekstrede tanımlanan ana bileşenler karvakrol (%52,32), linalool (%15,96), timol (%9,59), 1-metilpirolin (%3,53) ve trans-karyofillen (%3.43) olmuştur (Saleem ve ark. 2004). *Thymus linearis* yaprak ekstraktının GC-MS ile belirlenen fitokimyasal bileşikleri ethyl (9z, 12z)-9, 12-octadecadienoate (22.58%), palmitic acid (11.95%), ethyl palmitate (9.89%), phytol (5.03%), stigmast-5-En-3-Ol, (3.Beta.)- (4.54%), (Z, Z)-6, 9-Cis-3, 4-epoxy-nonadecadiene (3.60%), karvakrol (3.59%), cryptomeridiol (3.22%), heptadecanoic acid, ethyl ester (2.03%) ve naphthalene, decahydro-(1.28%) olmuştur (Shah ve ark., 2021). Coğrafik koşullar, kültür farklılıkları, bitki gelişim aşaması, kurutma metotları ve ekstraksiyon metotları gibi çeşitli faktörler bir bitkideki biyoaktif bileşenlerinin kantitatif özelliklerinin yanında kalitatif özlleiklerini de etkilemektedir (Sabzikar ve ark. 2020; Fournomiti ve ark., 2015; Mehrabi et al., 2021).

4.3. Mikroenkapsüle Örneklerin Antimikrobiyal Aktivite Analizleri

4.3.1. Örneklerin Inhibisyon Çapları

Çizelge 4.3 STE ekstraktının mikroenkapsülasyon öncesi ve farklı oranlarda kekik ekstraktı ilavesiyle mikroenkapsülasyon sonrası balık bozucu ve patojen bakteri üzerindeki inhibisyon zonlarını göstermektedir. Ekstraktların bakteriler üzerindeki inhibisyon zonları bakımından önemli farklılıklar ($p<0.05$) gözlenmiştir. En yüksek inhibisyon etki ekstraktının direk uygulandığı grupta gözlenmiştir ($p<0.05$). Kekik ekstraktının balık bozucu bakterileri üzerindeki engelleyici etkisi 25.00 mm (*P. damselae*) ve 41.67 mm (*V. vulnificus*) arasında değişkenlik göstermiştir. Gıda kaynaklı patojenler üzerinde kekik ekstraktının en yüksek inhibisyon zonu 27.33 mm ile *Salmonella* Paratyphi A gelişimi üzerinde gerçekleşmiştir. Kekik esansiyel yağının *S. aureus* ATCC 9144 gibi gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı güçlü antibakteriyel etki göstermesine karşın ekstraktlarının herhangi bir antimikrobiyal aktivite sergilemediği belirtilmiştir (Gedikoglu ve ark., 2019). Sabzikar ve ark. (2020) kekikin etanolik ektraktının, *S. aureus* ve *C. albicans*'ın gelişim inhibisyonuna karşı oldukça aktif olup, iyi bir antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bir başka araştırmada *Streptococcus macedonicus* serbest hücre süpernatantının *Micrococcus luteus*'a karşı 13.5 mm inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir (Musnadi ve ark., 2021).

Çizelge 4.3. Ekstraktların bakteriler üzerindeki inhibisyon zonları

			Mikroenkapsüle gruplar		
	***S. thermophilus* extraktı (STE)**	**Kekik ekstraktı (KE)**	**STE**	**STE+%1KE**	**STE+%2KE**
Balık bozucu bakteriler					
Photobacterium damselae	7.33±0.58*^{b}	25.00±1.41^{a}	4.50±0.71^{c}	6.00±0.00^{bc}	6.00±0.00^{bc}
Proteus mirabilis	15.25±0.71^{b}	32.00±1.41^{a}	7.50±0.71^{d}	7.50±0.71^{d}	10.50±0.71^{c}
Vibrio vulnificus	17.33±0.58^{b}	41.67±0.58^{a}	8.25±1.06^{e}	11.00±1.41^{d}	13.50±0.71^{c}
Gıda kaynaklı patojenler					
Enterococus faecalis	14.00±1.00^{b}	25.33±1.53^{a}	7.00±0.00^{cd}	7.50±0.71^{cd}	9.50±0.71^{c}
Staphylococcus aureus	13.25±0.87^{b}	25.50±1.53^{a}	6.50±0.50^{d}	7.25±0.35^{cd}	8.50±0.71^{c}
Salmonella Paratyphi A	13.50±0.50^{b}	27.33±1.53^{a}	6.25±0.25^{d}	7.00±0.00^{d}	9.38±0.13^{c}

*Ortalama değer±Standart sapma (n=3). Aynı satırdaki farklı harflerle belirtilen ($^{a–d}$) değerler bakımından gruplar arasında önemli fark ($p < 0.05$) vardır. STE+%1KE: enkapsüle *S. thermophilus* ve kekik extraktı (%1) kombinasyonu, STE+%2KE: enkapsüle *S. thermophilus* ve kekik extraktı (%2) kombinasyonu

Photobacterium damselae 7.33 mm inhibisyon zonu ile *S. thermophilus* ekstraktına en dirençli bakteri olmuştur. *S. thermophilus* ekstraktına karşı en hassas tür kekik ekstraktında olduğu gibi *V. vulnificus* (17.33 mm) olmuştur. Mehrabi ve ark. (2021) *Lactobacillus acidophilus* KMP, *Lactobacillus plantarum* KMP ve *Pediococcus pentosaceus* KMP'den elde edilen serbest hücre ekstraktının zamana bağlı olarak patojenik *E. coli*'nin gelişimini engellediği rapor etmiştir. *L. plantarum* KMP'nin *E. coli*'ye karşı 8, 10, 12, 14 ve 16 saatlik inkübasyon sonrasında inhibisyon zonları sırasıyla 26.6, 24.9, 22.5, 20.3 ve 17.9 mm olmuştur.

Mikroenkapsüle *S. thermophilus* ekstraktları bakterilere karşı mikroenkapsüle edilmeyen formlarına göre daha düşük inhibisyon zonu sergilemiştir ($p<0.05$). Mikroenkapsülasyon öncesi veya sonrasında *S. thermophilus* extraktları en düşük *Photobacterium damselae* en yüksek *Vibrio vulnificus'*a karşı inhibisyon etki sergilemiştir. Kuley ve ark. (2021) *Lactobacillus plantarum'*dan elde edilen ham ve mikroenkapsüle serbest hücre ekstraktların test edilen bakteriler arasında en düşük antimikrobiyal etkiyi 8.33 ve 8.00 mm inhibisyon zonuyla *Proteus mirabilis* üzerinde gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.4. Ekstraktların minimum inhibisyon (MIK) ve bakterisit konsantrasyonu (MBK) (mg/mL)

	S. *thermophilus* extraktı (STE)		**Kekik ekstraktı (KE)**		**Mikroenkapsüle gruplar**					
					STE		**STE+%1KE**		**STE+%2KE**	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
Balık bozucu bakteriler										
Photobacterium damselae	100	>100	25	100	>100	>100	100	>100	100	>100
Proteus mirabilis	25	100	50	100	>100	>100	100	>100	50	>100
Vibrio vulnificus	12.5	100	25	50	100	>100	100	>100	50	100
Gıda kaynaklı patojenler										
Enterococcus faecalis	100	>100	50	50	>100	>100	100	>100	50	100
Staphylococcus aureus	100	>100	50	100	>100	>100	100	>100	100	>100
Salmonella Paratyphi A	100	>100	50	50	>100	>100	100	>100	50	100

*Ortalama değerSTE+%1KE: enkapsüle *S. thermophilus* ve kekik extraktı (%1) kombinasyonu, STE+%2KE: enkapsüle *S. thermophilus* ve kekik extraktı (%2) kombinasyonu

Çizelge 4.4 mikroenkapsüle edilmeyen ve mikroenkapsüle örneklerin minimum inhibisyon ve bakterisit konsantrasyonunu vermektedir. *S. thermophilus* extraktı *V. vulnificus* ve *Proteus mirabilis*'e karşı düşük bir inhibisyon konsatrasyonu (sırasıyla 12.5 ve 25 mg/mL) sergilemiştir. Serbest hücre ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi laktik, asetik asit, uzun zincirli yağ asitleri ve esterleri, proteinli bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Mani-Lopez ve ark., 2021). *L. plantarum*

serbest hücre ekstraktı balık bozucu bakterilere karşı 50 mg/ mL MIK değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Kuley ve ark., 2021). *Streptococcus salivarius* M18 bakterisinden elde edilen serbest hücre ekstraktı varlığında *P. aeruginosa* ATCC 27853'ün gelişimi 37°C'de 6 saatlik inkübasyondan sonra yaklaşık %60 oranında azalma olduğu ve 24 saatlik inkübasyondan sonra neredeyse tamamen inhibe edildiği rapor edilmiştir (Tunçer ve Karaçam, 2020).

Kekik ekstraktının en düşük MIK değeri ise 25 mg/mL ile *P. damselae* ve *V. vulnificus*'da gözlenmiştir. Kekik ekstraktının diğer bakteriler üzerindeki bakteriyostatik konsantrasyonu 50 mg/ mL olmuştur. *S. thermophilus* extraktının MBK değerleri *P. damselae* ve *V. vulnificus* bakterileri dışında >100 mg/mL'nin üzerinde olmuştur. Kekik ekstraktının bakterisit konsantrasyonu *Vibrio vulnificus, Enterococus faecalis* ve *Salmonella* Paratyphi A için 50 mg/mL iken, diğer bakteriler üzerinde 100 mg/ mL olmuştur. *S. thermophilus* extraktının mikroenkapsülasyonu ham haline kıyasla daha yüksek MIK değeri göstermiş olup,

Vibrio vulnificus (100 mg/ mL) dışında tüm bakterilere karşı MIK değeri 100 mg/ mL'den daha fazla olmuştur. %1 ve 2 kekik ekstraktı katkısı içeren mikroenkapsüle *S. thermophilus* extraktı genellikle bakterilere karşı 100 mg/ mL bakteriyostatik konsantrasyonuna sahip olmuştur. Ancak %2 kekik ekstraktı katkısı içeren mikroenkapsüle *S. thermophilus* extraktı *V. vulnificus, Proteus mirabilis, S. aureus* ve *S*. Paratyphi A'a karşı düşük bir inhibisyon konsatrasyonuna sahip olmuştur (50 mg/ mL). %2 kekik ekstraktı katkısı içeren mikroenkapsüle *S. thermophilus* extraktı dışında, mikroenkapsüle örneklerin test edilen tüm bakterilere karşı bakterisit değeri >100 mg/ mL olmuştur. Bu çalışmaya benzer olarak, Gedikoğlu ve ark. (2019) kekik ekstrakt konsantrasyonunun %10' dan %40' a çıkarılmasıyla ekstraktın *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*' a karşı inhibisyon etkisinin arttığını bildirmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada mikroenkapsüle bireysel *S. thermophilus* süpernatantı ile farklı dozdaki etanolik kekik ekstraktı kombinasyonlarının gıda kaynaklı patojenler ve balıkta bozulma etmeni bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıda belirtildiği şekilde sırası ile verilmiştir.

1. Bu çalışmada mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantı 1.15 – 14.08 µm, mikroenkapsüle %1 etanolik kekik ekstraktı ile kombine *S.thermophilus* süpernatantı 1.11-11.50 µm ve mikroenkapsüle %2 etanolik kekik ekstraktı ile kombine *S.thermophilus* süpernatantı 2.71-11.39 µm partikül büyüklüğüne sahip olmuştur. Mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantı buruşuk yapıda küresel forma sahip olmuştur. Süpernatanda kekik katkısı buruşuk formda azalmaya yol açmıştır. Özellikle %2 kekik katkısına sahip mikroenkapsüle *S.thermophilus* süpernatantı tamamiyle küresel yapıya sahip olmuştur.
2. GC-MS analizi sonuçlarına göre *S. thermophilus* serbest hücre ekstraktında toplam 11 bileşik belirlenmiş olup, asetik asit (%39.64), methyl-d3 1-dideuterio-2-propenyl ether (%10.87) ve 7-octen-2-ol, 2-methyl-6-methylene (%10.46) ana bileşenler arasında yer almıştır. Propane, 2-fluoro-2-methyl- (%8.92), imidodicarbonic diamide (%7.64), tetrahydro-1,3-oxazine-2-thione (%7.21), 1,2,3-propanetriol (% 5.8) ve 2-methyl-1,3-oxathiolany-propionicacid ethyl ester (%5.42) *S. thermophilus* serbest hücre ekstraktında bulunan diğer önemli bileşenler olmuştur.
3. Kekik ekstraktı 7 bileşen içermiş olup, ana bileşeni %67.96 ile phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl) (karvakrol) ve %25.77 ile 1,2,3-propanetriol (Glycerin) olmuştur. Propane, 2-fluoro-2-methyl- % 3.97 olup, diğer bileşenler %0.5'in altında olmuştur.
4. Ekstraktların bakteriler üzerindeki inhibisyon zonları bakımından önemli farklılıklar ($p<0.05$) gözlenmiştir. En yüksek inhibisyon etki kekik ekstraktının direk uygulandığı grupta gözlenmiştir ($p<0.05$). Kekik ekstraktının balık bozucu bakterileri üzerindeki engelleyici etkisi 25.00 mm (*P. damselae*) ve 41.67 mm (V. *vulnificus*) arasında değişkenlik göstermiştir.
5. Gıda kaynaklı patojenler üzerinde kekik ekstraktının en yüksek inhibisyon zonu 27.33 mm ile *Salmonella* Paratyphi A gelişimi üzerinde gerçekleşmiştir. *Photobacterium damselae* 7.33 mm inhibisyon zonu ile *S. thermophilus* extraktına en dirençli bakteri olmuştur. *S. thermophilus* extraktına karşı en hassas tür kekik ekstraktında olduğu gibi *V. vulnificus* (17.33 mm) olmuştur.

6. Mikroenkapsüle *S. thermophilus* ekstraktları bakterilere karşı mikroenkapsüle edilmeyen ekstraktlarına oranla daha düşük inhibisyon zonu sergilemiştir ($p<0.05$). Mikroenkapsülasyon öncesi veya sonrasında *S. thermophilus* extraktları en düşük *P. damselae* en yüksek *V. vulnificus'*a karşı inhibisyon etki sergilemiştir.

7. *S. thermophilus* extraktı *V. vulnificus* ve *Proteus mirabilis*'e karşı düşük bir inhibisyon konsatrasyonu (sırasıyla 12.5 ve 25 mg/mL) sergilemiştir.
8. Kekik ekstraktının en düşük MIK değeri ise 25 mg/mL ile *P. damselae* ve *V. vulnificus*'da gözlenmiştir. Kekik ekstraktının diğer bakteriler üzerindeki bakteriyostatik konsantrasyonu 50 mg/ mL olmuştur. *S. thermophilus* ekstraktının MBK değerleri *P. damselae* ve *V. vulnificus* bakterileri dışında 100 mg/mL'nin üzerinde olmuştur. Kekik ekstraktının bakterisit konsantrasyonu *Vibrio vulnificus, Enterococus faecalis* ve *Salmonella* Paratyphi A için 50 mg/mL iken, diğer bakteriler üzerinde 100 mg/ mL olmuştur. *S. thermophilus* ekstraktının mikroenkapsülasyonu direk formuna kıyasla daha yüksek MIK değeri göstermiş olup, *Vibrio vulnificus* (100 mg/ mL) dışında tüm bakterilere karşı MIK değeri 100 mg/ mL'den daha fazla olmuştur.
9. %1 ve 2 kekik ekstraktı katkısı içeren mikroenkapsüle *S. thermophilus* ekstraktı genellikle bakterilere karşı 100 mg/ mL bakteriyostatik konsantrasyonuna sahip olmuştur. Ancak %2 kekik ekstraktı katkısı içeren mikroenkapsüle *S. thermophilus* ekstraktı *V. vulnificus, Proteus mirabilis, S. aureus* ve *S*. Paratyphi A'a karşı düşük bir inhibisyon konsatrasyonuna sahip olmuştur (50 mg/ mL). % 2 kekik ekstraktı katkısı içeren mikroenkapsüle *S. thermophilus* ekstraktı dışında, mikroenkapsüle örneklerin test edilen tüm bakterilere karşı bakterisit değeri >100 mg/ mL olmuştur.

Çalışma sonucunda mikroenkapsüle *S. thermophilus* süpernatantı ile kekik ekstraktı kombinasyonlarının balıkta bozulma etmeni bakteriler üzerine etkilerinin bakteri türlerine göre değişkenlik göstermesine karşın, birçok bakteride yüksek bir antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Mikroenkapsülasyonda, *S. thermophilus* supernatantı ile birlikte kekik ekstraktının kombine kullanımı balık etindeki bozulma etmeni bakteriler ve gıda kaynaklı bakteriler üzerinde genel olarak daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. %2 oranında kullanılan kekik ekstraktı %1 oranına kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Bu nedenle bu mikroenkapsüle ekstraktlar gıdalarda alternatif antimikrobiyal olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Bu çalışmada kullanılan bakteriler bozulmuş balık etinden izole edilen Gram-negatif bakterilerdir. Çalışmada ayrıca 3 farklı gıda kaynaklı patojen kullanılmıştır. Bilindiği gibi ekstraktların etkisi bakteri hücre duvarının yapısına göre de farklılıklar gösterebilmektedir. Ayrıca bu çalışmada bakteri supernatantı olarak sadece tek tür laktik asit bakterisi (*S. thermophilus*) test

edilmiştir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler bakteri türüne göre değişkenlik gösterebileceği için diğer çalışmalarda farklı türlerin çalışılması gerekmektedir. Kekik ekstraktı bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal aktivite sergilemektedir. Bu çalışmada kekik ekstaktı serbest hücre ekstraktında %1 ve 2 oranında kullanılmıştır. Diğer çalışmalarda, daha etkin bir antimikrobiyal madde eldesi için, kekik ekstraktının özellikle daha yüksek konsantrasyonlarının denenmesi önerilmektedir. Ayrıca bu çalışmada sadece kekiğin etanolik ekstraktı kullanılmıştır. Diğer çalışmalarda ultrasonik destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve süper kritik akışkan ekstraksiyonu gibi farklı ekstraksiyon tipleri denenerek antimikrobiyal aktivite bakımından en uygun ekstraksiyon tipi araştırılabilir. İleriye dönük çalışmalarda bu ekstraktların farklı konsantrasyonu kullanılarak in vitro olarak Gram pozitif bakterileri de içeren daha geniş bakteri gruplarında ve in vivo düzeyde balık kalitesi üzerindeki etkisinin araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de mycologie medicale*, *24*(2), e51-e56.

Akgül A. 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:15; 101-104

Arena, M.P., Silvaın, A., Normanno, G., Grıeco, F., Drider, D., Spano, G., and Fıocco, D. 2016. Use of *Lactobacillus plantarum* Strains As A Bio-Control Strategy Against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. Frontiers in Microbiology, 7 (464).

Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., ... & Ibrahim, S. A. 2020. Lactic acid bacteria: food safety and human health applications. *Dairy*, *1*(3), 202-232.

Başer K.H.C. 1994. Essential oils of Labiatae from Turkey: Recent results. Lamiales Newsletter 3, 6-11.

Baytop T.1997. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Türk Dil Kurumu Yayınları No:578

Cavalheiro, C. P., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., Pintado, T., de Menezes, C. R., & Fries, L. L. M. 2019. Effect of different strategies of *Lactobacillus plantarum* incorporation in chorizo sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(15), 6706-6712.

Chawda, P. J., Shi, J., Xue, S., & Young Quek, S. 2017. Co-encapsulation of bioactives for food applications. *Food Quality and Safety*, *1*(4), 302-309.

Chen, Q., McGillivray, D., Wen, J., Zhong, F., & Quek, S. Y. 2013. Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. Journal of Food Engineering, 117(4), 505-512.

Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. 2012. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, *2*(3), 228-243.

Clınıcal and Laboratory Standards Instıtute, 2008. Methods For Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow Aerobically. CLSI: Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: CLSI.

Daouk, R.K., Dagher, S.M., Sattout, E.J. 1995. Antifungal Activity of The Essential oil of *Origanum syriacum* L. Journal of Food Protection, 58, 1147.

Dargahi, N., Johnson, J. C., & Apostolopoulos, V. 2021. Immune modulatory effects of probiotic *Streptococcus thermophilus* on human monocytes. Biologics, 1(3), 396-415.

Drosou, C. G., Krokida, M. K., & Biliaderis, C. G. 2017. Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying technology*, *35*(2), 139-162.

Durmus, M., Özogul, Y., Ozyurt, G., Ucar, Y., Kosker, A. R., Yazgan, H., ... & Özogul, F. 2023. Effects of citrus essential oils on the oxidative stability of microencapsulated fish oil by spray-drying. Frontiers in Nutrition, 9, 978130.

Erkmen, O., and Bozoglu, T., 2016. Spoilage of Fish and Other Seafoods. Food Microbiology: Principles into Practice, 301-306.

Esen, G., Azaz, A.D., Kurkcuoglu, M., Baser, K.H.C., Tinnaz, A., 2007. Essential Oil and Antimicrobial Activity of Wild and Cultivated *Origanum vulgare* L. subsp. Hirtum (Link) Letswaart from the Marmara Region, Turkey. Flavour and Fragrance Journal 22, 371–376.

Fadil, M., Fikri-Benbrahim, K., Rachiq, S., Ihssane, B., Lebrazi, S., Chraibi, M., ... & Farah, A. 2018. Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., Rosmarinus officinalis L. and Myrtus communis L. essential oils against *Salmonella typhimurium:* Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *126*, 211-220.

Fan, M., and Chen, J. 2001. Studies on Antimicrobial Activity of Extracts from Thyme. Acta Microbiologica Sinica, 41: 499-504.

Fang, Z., Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 510-523.

Ferrandız, M., Capablanca, L., Franco, E., and Mira, E. 2016. Microencapsulation of L-ascorbic acid by Spray Drying using Sodium Alginate as Wall Material. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences, 6:1, 1.

Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., Papaemmanouil, V., ... & Alexopoulos, A. 2015. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano *(Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial ecology in health and disease*, *26*(1), 23289.

Gedikoğlu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. 2019. Evaluation of *Thymus vulgaris* and Thymbra spicata essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food science & nutrition*, *7*(5), 1704-1714.

George-Okafor, U., Ozoani, U., Tasie, F., & Mba-Omeje, K. 2020. The efficacy of cell-free supernatants from *Lactobacillus plantarum* Cs and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 for the preservation of home-processed tomato-paste. *Scientific African*, *8*, e00395.

Gezginc, Y., Topcal, F., Comertpay, S., & Akyol, I. 2015. Quantitative analysis of the lactic acid and acetaldehyde produced by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* strains isolated from traditional Turkish yogurts using HPLC. *Journal of dairy science*, *98*(3), 1426-1434.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food research international*, *40*(9), 1107-1121.

Gobbetti, M., and Calasso, M. 2014. *Streptococcus: Streptococcus thermophilus* in Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). Academic Press.

Gram, L., and Dalgaard, P., 2002. Fish Spoilage Bacteria–Problems And Solutions. Current Opinion in Biotechnology, 13:262-266.

Gram, L., Huss, and H.H., 1996. Microbiological Spoilage of Fish and Fish Products. International Journal of Food Microbiology, 33:121-137.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., and Givskov, M. 2002. Food Spoilage—Interactions Between Food Spoilage Bacteria. International Journal of Food Microbiology, 78(1-2): 79-97.

Harnett, J., and Pearce L. 2011. Lactic Acid Bacteria: *Streptococcus thermophilus* in Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), Acedemic Press.

Holley, R. A., & Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food microbiology*, *22*(4), 273-292.

Hor, Y.Y., and Liong, M.T. 2014. Use of Extracellular Extracts of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria for the inhibition of Dermatological Pathogen *Staphylococcus aureus*. Dermatologica Sinica, 32(3), 141–147

Huang, Y. Y., Lu, Y. H., Liu, X. T., Wu, W. T., Li, W. Q., Lai, S. Q., ... & Zeng, X. A. 2023. Metabolic Properties, Functional Characteristics, and Practical Application of *Streptococcus thermophilus*. Food Reviews International, 1-22.

Hutkins, R. and Goh, Y.J. 2014. *Streptococcus: Streptococcus thermophilus* in Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Acedemic Press.

Hwanhlem, N., Ivanova, T., Haertle, T., Jaffres, E., and Dousset, X. 2017. Inhibition of Food-Spoilage and Foodborne Pathogenic Bacteria by A Nisin Z-Producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* KT2W2L. LWT-Food Science and Technology, 82: 170-175.

ICMSF 1980. Microbial Ecology of Foods. Food Comodities. Vol.2. New York. Academic Press.

Iyer, R., Tomar, S. K., Maheswari, T. U., and Singh, R. 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional Lactic Acid Bacteria. International Dairy Journal, 20(3): 133-141.

Jose, N, Bunt C., and Hussain, M. 2015. Comparison of Microbiological and Probiotic Characteristics of Lactobacilli Isolates from Dairy Food Products and Animal Rumen Contents. Microorganisms, 3(2): 198-212

Kintzios S.E. 2002. The biotechnology of oregano (*Origanum* sp. and *Lippia* sp.). In: Kintzios SE (ed) Medicinal andaromatic plants-Industrial profiles, Oregano. The genera Origanum and Lippia, vol 25.Taylor and Francis, London, pp 237–242.

Kuley, E., Durmus, M., Ucar, Y., Kosker, A. R., Tumerkan, E. T. A., Regenstein, J. M., and Ozogul, F. 2018. Combined Effects of Plant and Cell-Free Extracts of Lactic Acid Bacteria on Biogenic Amines and Bacterial Load of Fermented Sardine Stored at 3±1° C. Food Bioscience, 24: 127-136.

Kuley, E., Kuscu, M. M., Durmus, M., & Ucar, Y. 2021. Inhibitory activity of Co-microencapsulation of cell free supernatant from *Lactobacillus plantarum* with propolis extracts towards fish spoilage bacteria. LWT, 146, 111433.

Leroy, F., and De Vuyst, L. 2004. Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation İndustry. Trends in Food Science & Technology,15(2): 67-78.

Lin, M. Y., & Yen, C. L. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. Journal of Agricultural and Food chemistry, 47(4), 1460-1466.

Lovdal, T., 2015. The microbiology of Cold Smoked Salmon. Food Control, 54:360-373.

Mani-Lopez, E., Arrioja-Bretón, D., & López-Malo, A. 2022. The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 21(1), 604-641.

Marcela, F., Lucía, C., Esther, F., & Elena, M. 2016. Microencapsulation of L-ascorbic acid by spray drying using sodium alginate as wall material. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences, *6*(01), 1.

Markakiou, S., Gaspar, P., Johansen, E., Zeidan, A. A., & Neves, A. R. 2020. Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new bio technological applications. Current opinion in biotechnology, 61, 142-152.

Martinović, A., Cocuzzi, R., Arioli, S., & Mora, D. 2020. *Streptococcus thermophilus:* to survive, or not to survive the gastrointestinal tract, that is the question!. *Nutrients*, *12*(8), 2175.

Mehrabi, A., Mahmoudi, R., Khedmati Morasa, H., Mosavi, S., Kazeminia, M., Attaran Rezaei, F., ... & Vahidi, R. 2021. Study of chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of thyme leaves and stems essential oil. Journal of Medicinal plants and By-product.

Mehran, M., Hosseini, H., Hatami, A. R., Taghizade, M., & Safaei, A. R. 2016. Investigation of seven species of essential oils of thyme and comparison their antioxidant properties. *Journal of Medicinal Plants*, *15*(58), 134-140.

Mis Solval, K., Bankston, J. D., Bechtel, P. J., & Sathivel, S. 2016. Physicochemical properties of microencapsulated ω-3 salmon oil with egg white powder. Journal of Food Science, 81(3), E600-E609.

Mohammadigholami, A. 2016. Study of antifungal properties and chemical composition of essential oil of *Thymus kotscuyanus* Boiss. & Hohen. Iranian Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 1(2), 52-62.

Mokoena, M. P. 2017. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, *22*(8), 1255.

Mokoena, M. P., Omatola, C. A., & Olaniran, A. O. 2021. Applications of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins against Food Spoilage Microorganisms and Foodborne Pathogens. Molecules, *26*(22), 7055.

Morsy, N. F. 2020. Production of thymol rich extracts from ajwain *(Carum copticum L.*) and thyme (*Thymus vulgaris L.*) using supercritical CO2. Industrial crops and products, *145*, 112072.

Musnadi, A. A., Khayyira, A. S., & Malik, A. 2021. Bioactive Fractions from *Streptococcus Macedonicus* MBF 10-2 Produced In an Optimized Plant-Based Peptone Medium. Indonesian Journal of Pharmacy/Majalah Farmasi Indonesia, 32(1).

Negi, P. S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International journal of food microbiology*, *156*(1), 7-17.

Ng, Z. J., Zarin, M. A., Lee, C. K., & Tan, J. S. 2020. Application of bacteriocins in food preservation and infectious disease treatment for humans and livestock. *RSC Advances*, *10*(64), 38937-38964.

Nzeako, B. C., Al-Kharousi, Z. S., Al-Mahrooqui, Z. 2006. Antimicrobial Activities of Clove and Thyme Extracts. Sultan Qaboos University Medical Journal, 6(1), 33.

Oliveira, A. S., Weinberg, Z. G., Ogunade, I. M., Cervantes, A. A., Arriola, K. G., Jiang, Y., ... & Adesogan, A. T. 2017. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. Journal of Dairy Science, 100(6), 4587-4603.

Ortiz, P., I. Fernandez. 1992. Microscopic study of honey and apiary pollen from the province of Seville. Departmento de Biologia Vegetal, Ecologia Facultad de Biologia, Apdo, Spain.

Ouwehand, A., & Vesterlund, S. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen, A., von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), Lactic acid bacteria, microbiological and functional aspects (3rd ed., pp. 375–396). Marcel Dekker, Inc

Özyurt, G., Uslu, L., Durmuş, M., Sakarya, Y., Uzlaşir, T., & Küley, E. 2023. Chemical and physical characterization of microencapsulated Spirulina fermented with *Lactobacillus plantarum*. Algal Research, 73, 103149.

Piñón-Balderrama, C. I., Leyva-Porras, C., Terán-Figueroa, Y., Espinosa-Solís, V., Álvarez-Salas, C., & Saavedra-Leos, M. Z. 2020. Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. Processes, 8(8), 889.

Purwandari, U., Shah, N. P., & Vasiljevic, T. 2007. Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. *International Dairy Journal*, *17*(11), 1344-1352.

Rasooli Iraj, Rezaei Mohammad Bagher and Allameh Abdolamir 2006-a. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. International Journal of Infections Diseases 10(3)236-241

Robson, A. A., Kelly, M. S., & Latchford, J. W. 2007. Effect of Temperature on the Spoilage Rate of Whole, Unprocessed Crabs: *Carcinus maenas*, *Necora puber* and *Cancer pagurus*. Food Microbiology, 24(4): 419-424.

Rodrigues, F. J., Cedran, M. F. & Garcia, S. 2018. Influence of linseed mucilage incorporated into an alginate-base edible coating containing probiotic bacteria on shelf-life of fresh-cut yacon (*Smallanthus sonchifolius*). Food and Bioprocess Technology, 11 (8), 1605-1614.

Saadatzadeh, A., Fazelı, M. R., Jamalıfar, H., and Dınarvand, R. 2013. Probiotic properties of lyophilized cell free extract of *Lactobacillus casei*. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 8: 131–137.

Sabzikar, A., Hosseinihashemi, S. K., Shirmohammadli, Y., & Jalaligoldeh, A. 2020. Chemical composition and antimicrobial activity of extracts from thyme and rosemary against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. BioResources, 15(4): 9656.

Saleem, M., Nazli, R., Afza, N., Sami, A., & Shaiq Ali, M., 2004. Biological significance of essential oil of Zataria multiflora Boiss. Natural Product Research, 18(6), 493-497.

Shah, S., Hashmi, M. S., Qazi, I. M., Durrani, Y., Sarkhosh, A., Hussain, I., & Brecht, J. K. 2021. Pre-storage chitosan-thyme oil coating control anthracnose in mango fruit. Scientia Horticulturae, 284: 110139.

Shahidia, F., & Han, X. Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 33(6): 501-547.

Shokri, H., Sharifzadeh, A., & Tamai, I. A., 2012. Anti-Candida zeylanoides activity of some Iranian plants used in traditional medicine. Journal de Mycologie Médicale, 22(3): 211-216.

Silva, P. T. D., Fries, L. L. M., Menezes, C. R. D., Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., ... & Silva, C. D. B. D., 2014. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. Ciência Rural, 44: 1304-1311.

Singh, P., Danish, M., Saxena, A., 2011. Spoilage of fish-process and its prevention. Department of Fishery Biology, College of Fisheries, GB Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, Uttrakhand, India.

Sokovic, M., Tzakou, O., Pitarakoli, D., Couladis, M., 2002. Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in greece. Nahrung/Food 46 (5), 317–320.

Tunçer, S., & Karaçam, S. 2020. Cell-free supernatant of *Streptococcus salivarius* M18 impairs the pathogenic properties of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*. Archives of Microbiology, 202(10): 2825-2840.

Tzima, K., Makris, D., Nikiforidis, C. V., & Mourtzinos, I., 2015. Potential use of rosemary, propolis and thyme as natural food preservatives. J. Nutr. Health, 1(6).

Uriot, O., Denis, S., Junjua, M., Roussel, Y., Dary-Mourot, A., & Blanquet-Diot, S., 2017. *Streptococcus thermophilus*: from yogurt starter to a new promising probiotic candidate?. Journal of Functional Foods, 37: 74-89.

Wang, F., Fu, L., Bao, X., and Wang, Y., 2017. The Spoilage Microorganisms in Seafood with the Existed Quorum Sensing Phenomenon. J Food Microbiol, 1(1): 14-19.

Wyspiańska, D., Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., & Kolniak-Ostek, J. 2019. Effect of microencapsulation on concentration of isoflavones during simulated in vitro digestion of isotonic drink. Food Science & Nutrition, 7(2), 805-816.

Xu, Y. Q., Hu, J. S., Liu, D. M., Tang, J., Liang, M. H., Wu, J. J., & Xiong, J. 2023. Assessment of the safety and metabolism characteristics of *Streptococcus thermophilus* DMST-H2 based on complete genome and phenotype analysis. LWT, 114907.

Yeşilsu, A. F., & Özyurt, G., 2019. Oxidative stability of microencapsulated fish oil with rosemary, thyme and laurel extracts: A kinetic assessment. Journal of Food Engineering, 240: 171-182.

Zhang, Y. X., Zou, A. H., Manchu, R. G., Zhou, Y. C., and Wang, S. F. 2008. Purification and Antimicrobial Activity of Antimicrobial Protein from Brown-Spotted Grouper, *Epinephelus fario*. *J Zool Syst Evol Res*, *29*, 627-632.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(4): 2782-2858.

Zirnstein G., and Hutkins R., 1999. *Streptococcus: Streptococcus thermophilus* in Encyclopedia of Food Microbiology. Acedemic Press.

ÖZGEÇMİŞ

Nagihan KAZGAN, İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2010 yılında Niğde Üniversitesi Biyoloji bölümünde başladığı lisans eğitimini 2015 yılında tamamladı. 2020 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Evli ve iki çocuk annesidir.