

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EKŞİ HAMUR İZOLATLARININ GABA ÜRETİM VE PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MODEL GIDA
UYGULAMALARI

ZÜHAL ALKAY

DOKTORA TEZİ
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Bölümü

Danışman
Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK

Eş Danışman
Doç. Dr. Enes DERTLİ

Kasım, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EKŞİ HAMUR İZOLATLARININ GABA ÜRETİM VE PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MODEL GIDA
UYGULAMALARI

Zühal ALKAY tarafından hazırlanan tez çalışması 26/11/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Enes DERTLİ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. M. Zeki DURAK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN, Üye
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi

Doç. Dr. Ömer Said TOKER, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Furkan Türker SARICAOĞLU, Üye
Bursa Teknik Üniversitesi

Danışman Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Ekşi Hamur İzolatlarının Gaba Üretim ve Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi Ve Model Gıda Uygulamaları başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Zühal ALKAY

İmza

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FDK-2020-3885 numaralı projesi ile finanse edilmiştir. Zühal ALKAY, YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı ile desteklenmiştir.

Biricik Aileme

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının; planlanmasında, yürütülmesinde katkı sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK' a ve yüksek lisanstan doktora serüvenime kadar yanımda olan ve karşılaştığım tüm zorlukların üstesinden gelmemi sağlayan, tez çalışmam sırasında her konuda desteğini aldığım, bana fikir ve düşünceleri ile yol gösteren, gerek akademi anlamda gerekse hayat tecrübesi noktasına bana öncülük eden, hiçbir zaman hakkını ödeyemeyeceğim eş danışman hocam Doç. Dr. Enes DERTLİ' ye teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince her türlü çalışma ortamı sağlayıp, manevi desteğini hissettiğim dekanımız Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ' a,

Analizlerim sırasında yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olup beni motive eden sırdaşım, canım dostum Öğretim görevlisi Dr. Hümeysra İSPİRLİ' ye ve optimizasyon konusunda yardımlarını bizden esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Abdullah Tahir ŞENSOY' a,

Danadolu Ekşi Hamurlarının toplanmasını sağlayıp bu anlamda tez çalışmama katkısı olan Hakan DOĞAN ve Danadolu Ekibine çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmem için her türlü fedakarlığı yapan, maddi-manevi olarak desteklerini gördüğüm, bana olan güvenlerini hiçbir zaman kaybetmeyen, her konuda arkamda duran biricik aileme ve özellikle canım ablacığım Remziye ALKAY' a sonsuz teşekkürler.

Zühal ALKAY

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	x
KISALTMA LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ	xvi
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez	4
2 EKŞİ HAMUR ORJİNLİ LAB VE MAYALARIN İZOLASYONU, GABA ÜRETİMİ İÇİN ORTAM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU	5
2.1 Giriş.....	5
2.1.1 Ekşi Hamur Çeşitleri	7
2.1.2 Ekşi Hamur Üzerinde Etkili Olan Faktörler	8
2.1.3 Ekşi Hamur Mikrobiyotası.....	10
2.1.4 Ekşi Hamurun Sağlık Açısından Önemi	14
2.1.5 Ekşi Hamurun Ticarileştirilmesi	17
2.1.6 Ekşi Hamurun Ekmek Hamuru ve Ekmek Üzerindeki Etkisi.....	20
2.2 GABA (Gamma aminobütirik asit) ve Etki Mekanizması.....	22
2.2.4 GABA'nın Sağlık Üzerine İşlevleri	34
2.3 Materyal ve Yöntem.....	35
2.3.1 Ekşi Hamur Örneklerinin Kaynakları.....	35
2.3.2 Mikrobiyolojik Analiz.....	36
2.3.3 Laktik asit bakterileri ve Mayaların İzolasyonu.....	37
2.3.4 Ekşi Hamur İzolatlarının FT-IR ile Tanımlanıp Seçiminin Yapılması	37
2.3.5 LAB'ler İçin Fenotipik Tanımlama (Basit Boyama) Metodu	38
2.3.6 Katalaz Testi.....	39
2.3.7 Genotipik Olarak LAB ve Mayaların Tanımlanması	39
2.3.8 Yüksek GABA Üreticisine Sahip <i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869 Suşunun Ortam Koşullarının Optimize Edilmesi	42
2.3.9 İstatistiksel Analiz	43

2.4 Araştırma Bulguları ve Tartışma	43
2.4.1 Ekşi Hamurdan İzole Edilen LAB ve Mayaların Mikrobiyolojik Sayım Sonuçları.....	43
2.4.2 LAB'lerin <i>gad</i> Gen Bölgelerinin Belirlenmesi ve RAPD-PCR Tekniği İle Türler Arasında Ayırımın Gerçekleştirilmesi	46
2.4.3 FT-IR (Fourier-Transform Kızılötesi Spektroskopi) ve PCR Tekniği Kullanılarak LAB Tanımlanması	50
2.4.4 FT-IR (Fourier-Transform Kızılötesi Spektroskopi) ve PCR Tekniği Kullanılarak Mayaların Tanımlanması	54
2.4.5 Ekşi Hamurdan İzole Edilen <i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869 Suşunun GABA Optimizasyonu	57
2.4.6 GABA Optimizasyonu Üzerinde Etkili Olan Parametreler	61
3YÜKSEK GABA ÜRETİCİSİ <i>L. brevis</i> ATCC 14869 ve <i>L. plantarum</i> JCM 1149 SUŞLARI İLE BOZA ÜRETİMİ	67
3.1 Giriş.....	67
3.1.1 Boza Görünümü ve Kompozisyonu.....	68
3.1.2 Boza Üretiminde Kullanılan Tahıl Kaynakları.....	68
3.1.3 Bozanın Mikrobiyotası.....	70
3.1.4 Ticari Boza Üretim Aşaması	72
3.1.5 Ev tipi Boza Üretimi	73
3.1.6 Bozanın Depolanması	74
3.1.7 Bozanın Sağlık Üzerine Etkisi.....	74
3.2 Materyal ve Yöntem.....	76
3.2.1 Bakteri Kültürlerinin Geliştirilmesi	76
3.2.2 Ham Boza Yapımı	77
3.2.3 Boza Üretimi	77
3.2.4 Boza Örneklerinde Mikrobiyolojik Analizlerin Yapılması	79
3.2.5 pH ve Titre Edilebilir Asitlik (TTA).....	79
3.2.6 GABA Üretim Miktarlarının HPLC Analizi ile Belirlenmesi	79
3.2.7 Boza Örneklerinin Viskoelastik Özelliklerinin Reometre ile Belirlenmesi	80
3.2.8 Renk Analizi	80
3.2.9 Boza Örneklerindeki Şeker İçeriğinin HPLC ile Belirlenmesi	80
3.2.10 Duyusal Değerlendirmenin Yapılması.....	81
3.2.11 İstatistiksel Analiz	81
3.3 Araştırma Bulguları ve Tartışma	81
3.3.1 Mikrobiyolojik Analiz.....	81

3.3.2 pH ve TTA Değişimi	84
3.3.3 Boza Örneklerindeki GABA İçeriğinin Belirlenmesi	86
3.3.4 Dinamik Reolojik Özellik	90
3.3.5 Renk Analizi	92
3.3.6 Şeker İçeriğinin Belirlenmesi	94
3.3.7 Duyusal Analiz	97
4 <i>L. brevis</i> ATCC 14869 ve <i>L. plantarum</i> JCM 1149 YARDIMCI KÜLTÜRLERLE YOĞURT ÜRETİMİ	99
4.1 Giriş	99
4.1.1 Yoğurt Kültürleri	101
4.1.2 Yoğurt Bakterilerinin Simbiyotik Yaşamı	101
4.1.3 Yoğurt Jelinin Oluşumundaki Fiziksel-Kimyasal Mekanizmalar	102
4.1.4 Yoğurt Tüketimi ve Sağlık Üzerindeki Etkileri	103
4.2 Materyal ve Yöntem	105
4.2.1 Bakteri Kültürlerinin Geliştirilmesi	105
4.2.2 Yoğurt Üretimi	105
4.2.3 Mikrobiyolojik Analiz	106
4.2.4 pH ve TTA	107
4.2.5 Sinerezis	107
4.2.6 Su Tutma Kapasitesi	107
4.2.7 Su Aktivitesi (aw)	107
4.2.8 Renk Ölçümü	107
4.2.9 Yoğurtların Viskoelastik Özelliklerinin Belirlenmesi	107
4.2.10 Yoğurtlardaki GABA Miktarlarının HPLC ile Belirlenmesi	108
4.2.11 Duyusal Değerlendirme	108
4.2.12 İstatistiksel Analiz	108
4.3 Araştırma Bulguları ve Tartışma	108
4.3.1 Mikrobiyolojik Analiz	108
4.3.2 pH ve TTA	110
4.3.3 Sinerezis ve Su Tutma Kapasitesi	111
4.3.4 Su Aktivitesi	113
4.3.5 Renk Ölçümü	114
4.3.6 Reolojik Özelliklerin Belirlenmesi	115
4.3.7 Yoğurt Örneklerindeki GABA Miktarlarının Belirlenmesi	117
4.3.8 Duyusal Analiz	118

5EKŞİ HAMUR ORJİNİ MAYALARIN PROBİYOTİK NİTELİKLERİNİN BELİRLENMESİ	120
5.1 Giriş.....	120
5.1.1 Probiyotiklerin Seçilmesinde Belirlenen Kriterler.....	120
5.1.2 Probiyotik Olarak Mayalar.....	121
5.1.3 Probiyotik Mayaların Sağlık Üzerine Etkisi	126
5.2 Materyal ve Yöntem.....	128
5.2.1 Oto-agregasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi	128
5.2.2 Hidrofobisite Testi.....	128
5.2.3 Antibiyotik/Antifungal Disklerine Karşı Direnç	129
5.2.4 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	129
5.2.5 Düşük pH ve Safra Tuzuna Direnç	130
5.2.6 Antifungal Aktivite.....	130
5.2.7 İstatistiksel Analiz	130
5.3 Araştırma Bulguları ve Tartışma	131
5.3.1 Oto-agregasyon ve Hidrofobisite Yeteneklerinin Değerlendirilmesi.....	131
5.3.2 Antibiyotik / Antifungal Dirençleri.....	134
5.3.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	135
5.3.4 Düşük pH ve Safra Tuzuna Direnç	137
5.3.5 Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi	140
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	142
KAYNAKÇA	147
A SEKANSLANAN LAB'LERİN 16S rDNA GEN DİZİMLERİ	161
B SEKANSLANAN MAYALARIN 26S rDNA GEN DİZİMLERİ	164
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	167

SİMGE LİSTESİ

pH	Asitlik veya Bazlık Derecesini Gösteren Ölçü Birimi
rpm	Dakikada devir sayısı
g	Gram
a*	Kırmızılık
L	Litre
Log	Logaritma
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
L*	Parlaklık
Tm	Primerin erime sıcaklığı
h	Saat
°C	Santigrat Derece
b*	Sarılık
NaCl	Sodyum klorür
OD	Optik yoğunluk
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AAB	Asetik asit bakterileri
AM	Ampicillin
AMB	Amphotericin B
APT	All purpose Tween Agar
BBD	Box-Behnken Dizayn
CAGR	Compound Annual Growth
CLT	Clotrimazole
CO ₂	Karbondioksit
Dak	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetat
FLU	Flucanazole
FT-IR	Fourier-transform kızılötesi spektroskopi
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
g	Gram
GABA	Gamma-amino bütirik asit
<i>gad</i>	Glutamatik asit dekarboksilaz
GIT	Gastro İntestinal Sistem
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
K	kanamycin
kob	Koloni oluşturan birim
KTC	Ketoconazole
L.	<i>Lactobacillus</i>
LAB	Laktik Asit Bakterileri
M	Molar
MRS	DeMan Rogosa Sharpe
MSG	Monosodyum glutamat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NY	nystatin
P	penicillin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Potato Dekstroze Agar
RAPD-PCR	Rastgele amplifiye polimorfik DNA

rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TTA	Titre edilebilir asitlik
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık �rg�t�
YGC	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Ekşi hamur faydalarını gösteren harita [4]	6
Şekil 2.2 Uygulamalı teknolojiye göre ekşi hamur fermentasyon çeşitleri	7
Şekil 2.3 Ekşi hamur alt kültürleri işlemleri sırasındaki bakteriyel topluluk.....	12
Şekil 2.4 Ekşi hamur çevresinde meydana gelen ana etkileşimler. A) Besinler için rekabet(glukoz) B) Amensalizm (BAL, mayaların büyümesini engelleyen antimikrobiyal peptitleri üretir); C) Kommensalizm D) Mutualizm.	14
Şekil 2.5 Tahıl ve tahıl bazlı ürünlerin besin kalitesini değiştirmek için ekşi hamur fermentasyonunun potansiyeli.	16
Şekil 2.6 Glutamatın glutamat dekarboksilaz ile GABA'ya dekarboksilasyonu.....	22
Şekil 2.7 Mikroorganizmalarda GABA biyosentezi ve yıkımının ana metabolik yolları (Koyu renkli oklar GABA üretimi için öncüllerin biyosentezi için metabolik yolları ifade ederken, noktalı oklar EMP yolu, TCA döngüsü ve GABA şantı'nı ifade eder).	26
Şekil 2.8 Ekşi hamur örneklerinin toplandığı bölgeler	36
Şekil 2.9 a) Ekşi hamur, b) İzole edilen ve saflaştırılan bakteri, c) maya görüntüsü	37
Şekil 2.10 Bakteri ve mayaların FT-IR okuması.....	38
Şekil 2.11 a) İzole edilen maya, b) İzole edilen ve saflaştırılan bakteri mikroskop görüntüsü	38
Şekil 2.12 Ekşi hamur örneklerine ait LAB sayım (log kob/g) sonuçları.....	44
Şekil 2.13 6 farklı bölgeden toplanan ekşi hamurdan izole edilen mayanın hücresel yoğunluğu (log kob /g).....	45
Şekil 2.14 Manisa bölgesine ait ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin <i>gad</i> gen bölgelerine ait jel görüntüsü.....	47
Şekil 2.15 Ankara bölgesine ait ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin <i>gad</i> gen bölgelerine ait jel görüntüsü.....	47
Şekil 2.16 Kıbrıs bölgesine ait ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin <i>gad</i> gen bölgelerine ait jel görüntüsü.....	47
Şekil 2.17 Bilecik bölgesine ait ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin <i>gad</i> gen bölgelerine ait jel görüntüsü.....	48
Şekil 2.18 Bozcaada bölgesine ait ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin <i>gad</i> gen bölgelerine ait jel görüntüsü	48
Şekil 2.19 <i>Gad</i> geni pozitif çıkan suşlara ait RAPD-PCR jel görüntüsü	49
Şekil 2.20 <i>Gad</i> geni pozitif çıkan Bilecik ve Bozcaada suşlarına ait RAPD-PCR jel görüntüsü	49
Şekil 2.21 <i>Gad</i> geni pozitif çıkan Manisa bölgesi suşlarına ait RAPD-PCR jel görüntüsü	49

Şekil 2.22 <i>Gad</i> geni pozitif çıkan Kıbrıs bölgesi suşlarına ait RAPD-PCR jel görüntüsü	50
Şekil 2.23 Tüm bölgelerdeki ekşi hamur LAB izolatlarının FT-IR cluster ağacı.....	52
Şekil 2.24 16S sekanslarına bağlı olarak filogenetik ilişkisini gösteren Neighbour-joining metodu ile oluşturulmuş dendogram.....	54
Şekil 2.25 FT-IR analizine dayalı olarak taranan maya suşlarının dendogramı	55
Şekil 2.26 26 s gen bölgeleri belirlenmiş mayaların cluster analiz dendogramı	56
Şekil 2.27 Farklı stokastik optimizasyon çalışmalarını gösteren diyagram	64
Şekil 2.28 Proses parametrelerinin yanıt yüzey çizimleri.....	65
Şekil 2.29 Standartlaştırılmış etkilerin Pareto grafiği.....	66
Şekil 3.1 Ham boza yapım aşamaları.....	77
Şekil 3.2 MSG içeren boza yapım aşamaları	78
Şekil 3.3 MSG içermeyen (kontrol) boza yapım aşamaları.....	78
Şekil 3.4 Boza üretimine ait görüntüler	82
Şekil 3.5 <i>L.plantarum</i> +MSG içeren boza ürünündeki GABA üretim miktarına ait HPLC Kromatogramı	89
Şekil 3.6 HPLC sonucu boza örneklerindeki fruktoz, glukoz ve sukroz miktarlarını gösteren harita (A: <i>L. brevis</i> +MSG, B: <i>L. brevis</i> , C: <i>L. plantarum</i> + MSG, D: <i>L. plantarum</i> , 1:0.saat, 2:24.saat, 3: 48.saat, 4:72.saat, 6:0.gün, 7:3.gün, 8:6.gün, 9:9.gün)	95
Şekil 3.7 <i>Lb.brevis</i> +MSG boza örneklerinin 0 th ile 72 th ait HPLC kromatogramları. HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 7.53-7.90 dk olarak, fruktozun alıkonma süresi 7.04-7.40 dk olarak, sukrozun alıkonma süresi ise 11.55-11.58 dk olarak gelmiştir.....	95
Şekil 3.8 <i>Lb.brevis</i> +MSG boza örneklerinin 0.gün ile 9.güne ait HPLC kromatogramları. HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 7.91-8.03 dk olarak, fruktozun alıkonma süresi 6.99-7.30 dk olarak, sukrozun alıkonma süresi ise 11.51-11.65 dk olarak gelmiştir.	96
Şekil 3.9 <i>Lb.plantarum</i> +MSG boza örneklerinin 0 th ile 72 th ait HPLC kromatogramları. HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 7.93-7.95 dk olarak, fruktozun alıkonma süresi 7.48-7.93 dk olarak, sukrozun alıkonma süresi ise 11.55-11.58 dk olarak gelmiştir.	96
Şekil 3.10 <i>Lb.plantarum</i> +MSG boza örneklerinin 0.gün ile 9.güne ait HPLC kromatogramları. HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 7.91-7.97 dk olarak, fruktozun alıkonma süresi 7.06-7.08 dk olarak, sukrozun alıkonma süresi ise 11.60-11.51 dk olarak gelmiştir.	97
Şekil 3.11 Boza örneklerine ait duyuusal değerlendirme	98
Şekil 4.1 Çalışmada yapılan yoğurt örnekleri	106
Şekil 4.2 Çalışmada kullanılan agarların görselleri	106
Şekil 4.3 Depolama süresinde meydana gelen mikrobiyal değişim (log kob / g).109	

Şekil 4.4 Yoğurt örneklerinin depolama zamanına bağlı olarak pH değişimleri ..	110
Şekil 4.5 Yoğurt örneklerinin depolama zamanına bağlı olarak TTA değişimleri	111
Şekil 4.6 Yoğurtların sinerezis (%) miktarları	112
Şekil 4.7 Yoğurtların su tutma kapasiteleri (%)	113
Şekil 4.8 Yoğurt örneklerinin depolama zamanına bağlı olarak su aktivitesi değerleri	114
Şekil 4.9 Yoğurtların viskoelastik özelliklerini gösteren reogramlar	116
Şekil 4.10 Yoğurt ürünlerine uygulanan duyu analizi puanlama testi (a: <i>L. brevis</i> ko-kültür, b: <i>L. plantarum</i> ko-kültür, c: Kontrol)	118
Şekil 5.1 İnsan sağlığı ve beslenmesi üzerine probiyotiklerin faydaları	128
Şekil 5.2 Ekşi hamur izolasyonundan seçilen maya kültürlerinin oto-agregasyon yüzdelikleri (BOZ-1 <i>S. pastorianus</i> , BOZ-2 <i>K. lactis</i> , BOZ-5 <i>D. hansenii</i> , 11G-6 <i>P. kluyveri</i> , 11G-10 <i>D. hansenii</i> , 11G-11 <i>P. membranifaciens</i> , 06B-30 <i>Sc. cerevisiae</i> , 06B-36 <i>S. pastorianus</i> , 16BO-37 <i>S. bayanus</i> , 16BO-39 <i>T. delbrückii</i> , 45MK-18 <i>P. membranifaciens</i> , 45MK-19 <i>S. cerevisiae</i> , KCO-60 <i>K. humilis</i> , KCO-63 <i>K. polysporus</i>)	132
Şekil 5.3 Ekşi hamur izolasyonundan seçilen maya kültürlerinin hidrofobisite yüzdelikleri	133
Şekil 5.4 0., 24., 48., ve 72. saatlerde ölçülen mayaların düşük pH ve safra direnci. (<i>S. pastorianus</i> BOZ-1, <i>K. lactis</i> BOZ-2, <i>D. hansenii</i> BOZ-5, <i>P. kluyveri</i> 11G-6, <i>D. hansenii</i> 11G-10, <i>P. membranifaciens</i> 11G-11, <i>S. cerevisiae</i> 06B-30, <i>S. pastorianus</i> 06B-36, <i>S. bayanus</i> 16BO-37, <i>T. delbrückii</i> 16BO-39, <i>P. membranifaciens</i> 45MK-18, <i>S. cerevisiae</i> 45MK-19, <i>K. humilis</i> KCO-60 ve <i>K. polysporus</i> KCO-63)	139

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Farklı ülkelerde pazarlanan tip III ekşi hamurlar [20].	17
Tablo 2.1 Farklı ülkelerde pazarlanan tip III ekşi hamurlar [20] (Devamı).	18
Tablo 2.1 Farklı ülkelerde pazarlanan tip III ekşi hamurlar [20] (Devamı).	19
Tablo 2.2 GABA üretimi için farklı yöntemlerin rekabet gücü ve sınırlamaları [35]	24
Tablo 2.3 Farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen GABA miktarı [39]	28
Tablo 2.3 Farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen GABA miktarı [39] (Devamı)	29
Tablo 2.4 İnsanlar ve hayvanlarda test edilen GABA'nın fizyolojik işlevi [36]	35
Tablo 2.5 Toplanan ekşi hamurlara ait bilgiler	36
Tablo 2.6 Gad geninin amplifikasyonu için oluşturulan PCR şartları [55].	40
Tablo 2.7 16s rRNA ile 26s amplifikasyonu için oluşturulan PCR şartları	41
Tablo 2.8 Box-Behnken Deneme Dizaynı için deneme şartları	42
Tablo 2.9 Gad gen bölgesi belirlenen izolat sayısı ve pozitif çıkma durumu	46
Tablo 2.10 BBD tabanlı deney tasarımı ve karşılık gelen yanıt değerleri	58
Tablo 2.11 İndirgenmiş kuadratik modelin varyans analizi (ANOVA) sonuçları ...	59
Tablo 3.1 Boza üretiminde sıklıkla kullanılan tanelerin kimyasal bileşimi [89]. ...	69
Tablo 3.2 Boza örneklerinin fermentasyon zamanı ve depolama günlerindeki LAB sayımı (log kob /mL)	83
Tablo 3.3 Boza örneklerine ait pH ve TTA değişimleri	85
Tablo 3.4 Boza örneklerinin GABA üretim miktarları (mg/mL)	87
Tablo 3.5 Boza örneklerinin power-law modeline göre viskoelastik özellikleri	91
Tablo 3.6 Boza örneklerine ait renk değerleri (L^* , a^* , b^*)	93
Tablo 4.1 Tam yağlı süt, yağsız süt ve muadil yoğurtların besin bileşimi (100 g) [116].	104
Tablo 4.2 Yoğurt örneklerinin 3,7,14,21 ve 28.gün 4 ± 1 °C'de depolama sonrası renk değerleri	115
Tablo 4.3 Yoğurt örneklerine power-law model uygulanarak viskoelastik özelliklerin belirlenmesi	117
Tablo 5.1 Probiyotik mayaların sağlık üzerine olumlu etkileri [156].	126
Tablo 5.2 Antibiyotik / antifungal duyarlılığı (Sonuçlar iki paralelin ortalaması olarak mm cinsinden verildi)	135
Tablo 5.3 Mayaların antifungal aktiviteleri	140

EKŞİ HAMUR İZOLATLARININ GABA ÜRETİM VE PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MODEL GIDA UYGULAMALARI

Zühal ALKAY

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK

Eş-Danışman: Doç. Dr. Enes DERTLİ

Ekşi hamurda gerçekleşen maya ve laktik asit bakterilerinin (LAB) metabolik aktiviteleri ekşi mayalı ürünlerin kalitesini geliştirmektedir. Fermente gıdaları GABA açısından zenginleştirmek için ise fermentasyon ortamına GABA üretebilen LAB ve mayalar katılmaktadır. Bu bağlamda bu tez çalışmasının ilk aşamasında **i)** Türkiye'nin 6 farklı bölgesinden toplanan yerel ekşi hamur örneklerinden GABA üreticisi LAB türlerinin izolasyonu, tanımlanması, GABA üretim miktarı yüksek olan suşların seçilmesi **ii)** *gad* (Glutamik Asit Dekarboksilaz) gen bölgelerinin belirlenmesi ve GABA üretim miktarlarının HPLC ile ortaya konması, **iii)** GABA üretim miktarı yüksek olarak belirlenmiş *Levilactobacillus brevis* suşunun yüksek GABA verimi için ortam koşullarının optimizasyonu **iv)** Yüksek GABA üreticisi olarak belirlenmiş *Lb. brevis* ve *Lb. plantarum* suşları ile GABA açısından zengin yoğurt ve boza üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, *Lb. brevis* suşunun GABA üretim verimini artırmak için ortam koşullarının optimizasyonu sağlanmıştır. Maksimum GABA verimini elde etmek için optimizasyon parametreleri sıcaklık (30,35,40 °C), MSG konsantrasyonu (50,225,400 mM), pH (4.5,5.75,7.0), inkübasyon süresi (24,48,72 saat) olarak alınmıştır. Maksimum GABA verimine izin veren en iyi proses parametrelerinden sıcaklığın 30 °C, MSG konsantrasyonunun 130.71, pH'nın 4.74 ve

sürenin 72 saat olması gerektiği görülmüştür. İkinci aşama olarak ise ekşi hamurlardan izole edilen toplam 62 maya izolatlarından 14 maya suşu FT-IR tanımlama ile ayırt edilerek probiyotik aday olma potansiyeli araştırılmıştır. En yüksek otoagregasyon değeri BOZ-2 *Kluyveromyces lactis* suşunda gözlemlenirken, n-heksadekan ve dietileter hidrokarbonlara karşı en yüksek hidrofobiklik değerlerine sırasıyla BOZ-1 *S. pastorianus* (%43.7) ve 06B-36 *S. pastorianus* (%44.8) suşunun sahip olduğu görülmüştür. 14 maya suşu antibakteriyel disklere direnç gösterdiğinden veri verilmemiştir. Ayrıca tüm maya izolatının patojen bakterilere karşı inhibisyon sağlamadığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızdaki bir diğer parametre antifungal aktivitelerinin belirlenmiş olmasıdır. KCO-60 *Kazachstania humilis* maya kültürünün tüm küflere karşı en düşük etkiyi göstermiştir. Son olarak tüm maya kültürlerinin pH (2.5)'te 24 saat hayatta kaldığı, ancak BOZ-2 *Kluyveromyces lactis*, BOZ-5 *Debaryomyces hansenii*, KCO-60 *Kazachstania humilis*, KCO-63 *Kluyveromyces polysporus* mayasının direncinin düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ekşi hamur, laktik asit bakterisi, gaba, maya, probiyotik

DETERMINATION OF GABA PRODUCTION AND PROBIOTIC PROPERTIES OF SOURDOUGH ISOLATES AND MODEL FOOD APPLICATIONS

Zühal ALKAY

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Muhammed Zeki DURAK

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Enes DERTLİ

Metabolic activities of yeast and lactic acid bacteria (LAB) in sourdough improve the quality of sourdough products. In order to enrich fermented foods in terms of GABA, LAB and yeasts that can produce GABA are added to the fermentation medium. In this context, in the first stage of this thesis study, **i)** isolation and identification of GABA producer LAB species from local sourdough samples collected from 6 different regions of Turkey, selection of strains with high GABA production **ii)** determination of *gad* (glutamic acid decarboxylase) gene regions and the determination of GABA production amounts by HPLC, **iii)** Optimization of environment conditions for high GABA yield of *Levilactobacillus brevis* strain determined to have high GABA production **iv)** yogurt and boza rich in GABA were produced *Lb. brevis* and *Lb. plantarum* strains determined to have high GABA production. Also, optimization of environment conditions was provided to increase the GABA production efficiency of the *Lb. brevis* strain. In order to obtain the maximum GABA efficiency, the optimization parameters were taken as temperature (30,35,40 °C), MSG concentration (50,225,400 mM), pH (4.5,5.75,7.0), incubation time (24,48,72 h). It was seen that the best process parameters

that allow maximum GABA yield should be 30 °C, MSG concentration 130.71, pH 4.74 and time 72 h. As a second step, 14 yeast strains from a total of 62 yeast isolates isolated from sourdoughs were distinguished by FT-IR identification and their potential as probiotic candidates were investigated. While the highest autoaggregation value was observed in BOZ-2 *Kluyveromyces lactis* strain, the highest hydrophobicity values against n-hexadecane and diethylether hydrocarbons were respectively BOZ-1 *S. pastorianus* (43.7%) and 06B-36 *S. pastorianus* (44.8%) strain. Data are not given as 14 yeast strains are resistant to antibacterial discs. In addition, it was observed that all yeast isolates did not provide inhibition against pathogenic bacteria. Another parameter in our study was the determination of their antifungal activities. KCO-60 *Kazachstania humilis* yeast culture showed the lowest effect against all molds. Finally, it was observed that all yeast cultures survived for 24 hours at pH (2.5), but the resistance of BOZ-2 *Kluyveromyces lactis*, BOZ-5 *Debaryomyces hansenii*, KCO-60 *Kazachstania humilis*, KCO-63 *Kluyveromyces polysporus* yeast was low.

Keywords: Sourdough, lactic acid bacteria, gaba, yeast, probiotic

1.1 Literatür Özeti

Gıda fermantasyonu, en eski ve ekonomik, gıda işleme ve muhafaza yöntemlerinden biridir. Ayrıca, modern biyoteknolojinin öncüsü olarak karşımıza çıkmaktadır [1]. Mikroorganizmaların (bakteri, maya ve misel mantarları) ve enzimlerinin etkisi ile fermente yiyecek ve içecekler üretilmektedir. Fermantasyon, biyokimyasal olarak karbonhidratların ve ilgili bileşiklerin, herhangi bir harici elektron alıcısının yokluğunda enerji salınımı ile kısmen oksitlenen metabolik sürece denilmektedir. Nihai elektron alıcıları ise, doğrudan karbonhidratların parçalanmasından üretilen organik bileşikler olmaktadır. Ana bileşikte oksidasyon meydana gelerek işlem sırasında fermantasyon ürünlerinin ve az miktarda enerjinin açığa çıkmasına sebebiyet verir [2]. Aynı zamanda, dünyanın farklı yerlerinde geleneksel olarak farklı tahıllardan çeşitli ürünler elde etmek için kullanılmaktadır ve;

- Matriks işleme sırasında enerji tasarrufu,
- beslenme iyileştirmesi için istenen biyokimyasal değişiklikler,
- gıda güvenliği,
- ürün raf ömrü ve
- gelişmiş duyuşal özellikler dahil olmak üzere gıda üzerinde birçok olumlu etki sağlar [3].

Bu özelliklere ek olarak, fermantasyon, gıda maddelerinin mikroorganizmalar tarafından bozulmadan korunmasına yardımcı olmasının yanı sıra, fermantasyon işlemi sırasında esansiyel asitler ve vitaminlerin sentezi yoluyla gıdanın besin değerini arttırmanın doğal bir yolunu da sağlamaktadır. Ayrıca, beslenme açısından genellikle sindirimi zor olan gıdaların sindirilebilirliğini arttırdığı, taşınacak malzemelerin hacmini azaltmaya ve gıdaların pişirilmesi için gereken enerjiyi azaltmaya yardımcı olduğu bilinen parametreler arasındadır. Son olarak,

fermantasyon ayrıca fitatlar, tanenler gibi çiğ gıdalarda bulunan istenmeyen maddelerin detoksifikasyonu ve yok edilmesi ile sonuçlanabilmektedir [2].

Dünyanın farklı yerlerinde geleneksel tahıllardan elde edilen farklı fermente ürünler ve içecek türleri görülebilmektedir [2]. Bu ürünlerin arasında ekşi hamur, boza ve yoğurt da görülebilmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Günümüzde, gıda tüketiminin odak noktası memnun olmaktan, iyi ve sağlıklı bir yaşamı teşvik etmeye doğru kaymaktadır. İnsanların sağlıklarına daha fazla önem vermeye başlamasıyla gıda endüstrisinde fonksiyonel gıdalar ön plana çıkmaya başlamış olup bu eğilim artarak devam etmektedir. Fonksiyonel gıda üretimindeki önemli uygulamalardan bir tanesi de laktik asit bakterileri (LAB) kullanılarak gama-aminobütirik asit (GABA) içeriği zenginleştirilmiş gıdaların üretilmesi olmuştur. GABA doğal olarak düşük miktarlarda bulunduğundan dolayı, araştırmacılar çoğunlukla GABA miktarı yüksek ürünler üretmeye odaklanmıştır. Araştırmalar, GABA'nın sağlık üzerine olan yararlarını daha yaygın bir şekilde elde etmek için fonksiyonel gıda ürünlerinde GABA'yı artırmak için bakteri kullanmanın birçok yolunu açmıştır. Çalışmaların çoğunlukla izole edilen GABA'dan ziyade GABA üreten mikroorganizmaya odaklandığı ve en önemli GABA üreticilerinin ise LAB ve mayalar olduğu gözlemlenmiştir. Bakteriyel GABA üretimi glutamik asit dekarboksilaz (*gad*) enzimlerinin faaliyetleri ile gerçekleşmektedir. Aktif olarak GABA üreticisi bakterilerden birinin *Lactobacillus spp.*'lar olduğu ve bunların kolayca tüketilen birçok gıdada aktif olduğu görülmüştür.

Fermente gıdaları GABA açısından zenginleştirmek için fermentasyon ortamına GABA üretebilen LAB ve mayaların katılması ile tamamen doğal ve fonksiyonel gıdalar geliştirilmesi çalışmaları son zamanlarda önem kazanan bir çalışma alanı olmuştur. Bunlar arasında LAB, gram pozitif bakterilerin önemli bir grubunu oluşturduğu, çevrede yaygın şekilde yer aldığı, fermente gıdalarda, sebzelerde, insan ve hayvanların bağırsaklarında sıklıkla bulunduğu bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalar, çeşitli bakteri suşlarının birçok ortamda GABA'nın sentezlenmesinde faydalı olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca LAB kullanarak maksimum GABA üretimi için ideal koşulları bulmaya odaklanıp, bu ürünlerin çoğunun sağlık üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Bazı LAB suşlarının GABA üretirken, bazılarının

üretmediği, bu nedenle de GABA üreten LAB suşlarını izole etmek ve bunun fermente gıdalara uygulamalarını genişletmek için daha fazla çalışmanın gerektiği vurgulanmaktadır.

Bu hususlar dikkate alındığında, bu bağlamda tez çalışmasında ekşi hamurdan izole edilen LAB arasında yüksek GABA üreticisi suşlar bulmak, bu suşların *gad* genini belirlemek, yüksek GABA üretim optimizasyonu sağlamak ana hedef olmuştur. Ayrıca yüksek GABA üreticisi LAB'ler ile boza ve yoğurt üretimi gerçekleştirmek bir diğer hedef arasında olmuştur. Çalışmada, optimizasyonun sağlanması ile yüksek GABA üretimi gerçekleştirmenin, model gıda uygulamasında olumlu yönde gelişme göstereceği amaçlanmıştır. Bir diğer amacımız ise ekşi hamurdan izole ettiğimiz mayaların probiyotik aday olma potansiyelinin araştırılması olmaktadır.

Hedeflediğimiz amaç doğrultusunda planlanan aşamalar şu şekilde olmaktadır:

- 1) Türkiye'nin 6 farklı bölgesinden toplanan ekşi hamur örneklerinden LAB ve mayaların izolasyonunun gerçekleştirilmesi ve mikroorganizmaların moleküler metotlarla tanımlanması (FTIR ve PCR),
- 2) GABA üretiminden sorumlu *gad* geninin LAB'lerde tespit edilmesi, HPLC analizi ile GABA üretim miktarlarının belirlenmesi ve yüksek üretici suşun/suşların tespit edilmesi,
- 3) Yüksek GABA üreticisi olan suşlardan biri olan *L. brevis* kültürünün besin ve ortam koşullarının optimizasyonu,
- 4) GABA üretimi yüksek bulunan KCO-48 *L. brevis* ATCC 14869 ve 45MK-30 *L. plantarum* JCM 1149 suşlarıyla boza ve yoğurt üretiminin gerçekleştirilmesi,
- 5) KCO-48 *L. brevis* ATCC 14869 ve 45MK-30 *L. plantarum* JCM 1149 starterleri ile yapılan boza ve yoğurtlardaki ortak analizler olarak mikrobiyolojik analiz, pH ve titre edilebilir asitliğin (TTA) belirlenmesi, GABA üretim miktarlarının HPLC analizi ile ortaya konması, reolojik açıdan viskoelastik özelliklerinin değerlendirilmesi
- 6) Genotipik metotlarla tanımlanmış ve seçilmiş maya suşlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi,

Bu amaç doğrultusunda ekşi hamurdan izole edilen LAB ve mayaların farklı yönleri ele alınıp, her iki mikroorganizma türünün sergilediği davranışlar incelenmiştir.

1.3 Hipotez

Dünyadaki hızlı nüfus artışına paralel olarak insanların ihtiyaç duydukları gıda miktarı da her geçen gün artmaktadır. Son yıllarda bazı besinlerin “doğal” yollardan hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin bilimsel olarak ortaya konması, insan ve hayvan sağlığının korunmasında beslenme desteğinin önemini artırmıştır. Beslenme ve gıda konusunda geliştirilen yanlış konseptler, görünüm açısından çekici fakat besin değeri açısından fakir ürünlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bunun sonucunda edinilen yanlış beslenme alışkanlıkları ve yetersiz beslenmeye bağlı olarak sağlık riskleri artmıştır. Bu nedenle her kesimden tüketicinin sağlıklı besinlere yönelmeleri ile fonksiyonel gıdalara talep her geçen gün artmıştır. Daha önce tartışıldığı gibi, çalışmalar GABA ile zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdalar yoluyla insan diyetindeki GABA'yı artırmanın yollarını aramaya öncülük etmiş ve birçok ortam LAB'leri kullanarak GABA'yı başarıyla ürettiğini kanıtlamıştır. Daha fazla GABA ile zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdalar üretilirken, bu gıdaları tüketmenin belirli sağlık yararlarını hedefleyen ve inceleyen daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmuştur. GABA, farmasötiklerde ve fonksiyonel / fermente gıdalarda aktif bileşen olarak kullanılır. GABA ve türevleri, piyasada aminobutirik asit enjeksiyonu, pirasetam, oksirasetam ve anirasetam gibi ilaçlar olarak piyasaya sürülmüştür. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında kimyasal GABA'nın doğal ve güvenilir olmadığı düşünülmektedir. Bunun yerine araştırmalar LAB'lerin kullanılmasının daha güvenli olduğunu vurgulamıştır. Piyasada birçok sentetik ilaç mevcuttur ve bunlar öncelikle GABA reseptörleri ile etkileşime girer. Doğal GABA ve sentetik L-GABA takviyeleri karşılaştırılmış olup, sentetik GABA'nın klinik olarak etkili olmadığı doğrulanmıştır. Sentetik GABA moleküllerinin şekillerindeki küçük farklar bulunmasından dolayı, doğal GABA gibi GABA reseptör bölgelerine bağlanmakta iktidarsız olabileceği; bu nedenle, tüm GABA reseptörlerinin etkinleştirilemeyeceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçların tümü göz önüne alındığında doğal GABA üretiminin daha güvenilir olduğu ve GABA'ca zengin fonksiyonel ürün elde etmenin doğal yolu anlamına gelmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkıldığında bu çalışmanın hipotezi, yerel ekşi hamur izolatları arasından yüksek GABA üreticisi suşların tanımlanması ve bu suşların GABA açısından zengin fermente ürünlerde kullanılmasıdır. Ek olarak ekşi hamur izolatları arasından mayaların probiyotik niteliklerinin belirlenmesi olmuştur.

EKŞİ HAMUR ORJİNLİ LAB VE MAYALARIN İZOLASYONU, GABA ÜRETİMİ İÇİN ORTAM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

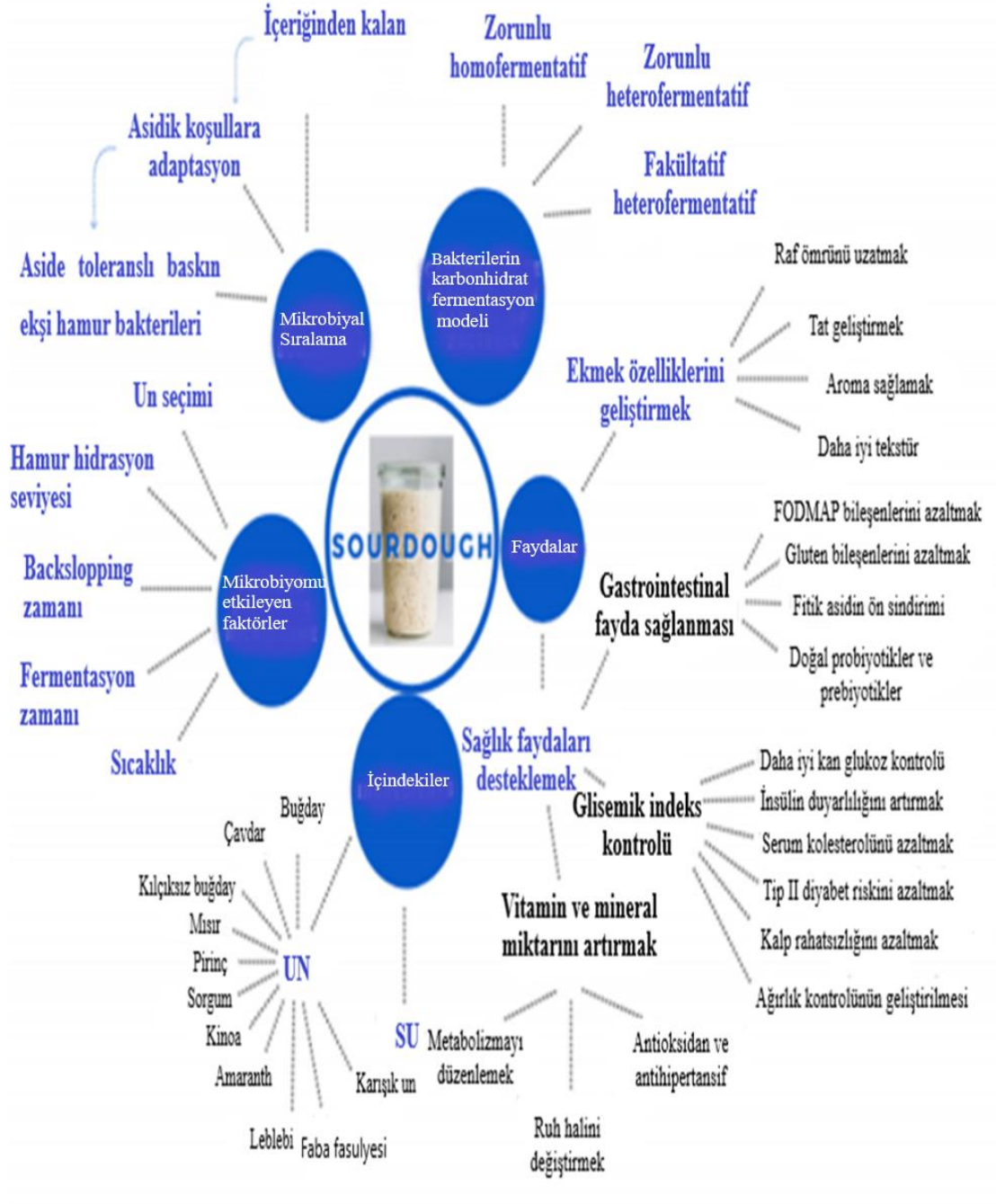
2.1 Giriş

Ekşi hamur, tahıl fermantasyonunun eski yöntemlerinden olup, metabolik olarak aktif maya ve laktik asit bakterileri (LAB) içeren bir un karışımını içerip, ekmek yapımında starter kültür olarak kullanılmaktadır [4,5]. Bir süre sonra maya ilave edilmeden kendi haline bırakılan hamur değişmekte ve içinde gaz kabarcıkları oluşmaktadır. Kendiliğinden yayılan hamurda yumuşama ve koku değişikliği meydana gelmektedir. Hamurdaki bu değişiklikler un ve suyun yanı sıra ortamdaki mikroorganizmalardan da kaynaklanabilmektedir. Kendiliğinden mayalanan ve ekşi bir tada sahip olan bu hamura 'ekşi maya' veya 'ekşi hamur' denilmektedir [5].

Ekşi hamurda mayalar, metabolizmalarının bir yan ürünü olarak karbondioksit üreterek ekmek ürünlerinde birincil mayalama maddesi görevi görmektedir. Bakteriler ise, başlangıç asitliğini (metabolizmalarının yan ürünleri olarak organik asitler üreterek), uçucu organik bileşikler ve diğer özellikleri üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir [6]. Ayrıca LAB, fermantasyon sürecinde ekşi hamura metabolitler üreterek, ekşi mayalı gıdaların kalitesine katkıda bulunmaktadır. Ekşi hamur LAB'leri, esas olarak ekşi tatları oluşturan asitlerin üretiminden sorumlu olmaktadır. Bu işlev, hamurun mayalanması sırasında CO₂ üreten mayanın ana rolünden farklı olmaktadır. Ek olarak, üretilen asitler buğday hamurunun fiziksel özelliklerini belirleyen önemli bir protein kompleksi olan gluten yapısını değiştirmektedir. Bunun yanı sıra, LAB'nin metabolik aktiviteleri pişmiş gıdaların dokusunu etkiler. Yani asetik asit gluten yapısını kısaltır ve sertleştirirken, laktik asit giderek daha elastik bir gluten yapısı ile sonuçlanabilir. Son olarak ekşi hamur LAB'leri, ortaya çıkan gıdaların lezzetine ve raf ömrüne katkıda bulunabilmektedir [7].

Ekşi hamur için bir harita kılavuzu Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Ekşi hamur, başlıca un ve su olmak üzere iki temel bileşenin fermantasyonu sonucu oluşmaktadır. Ekşi

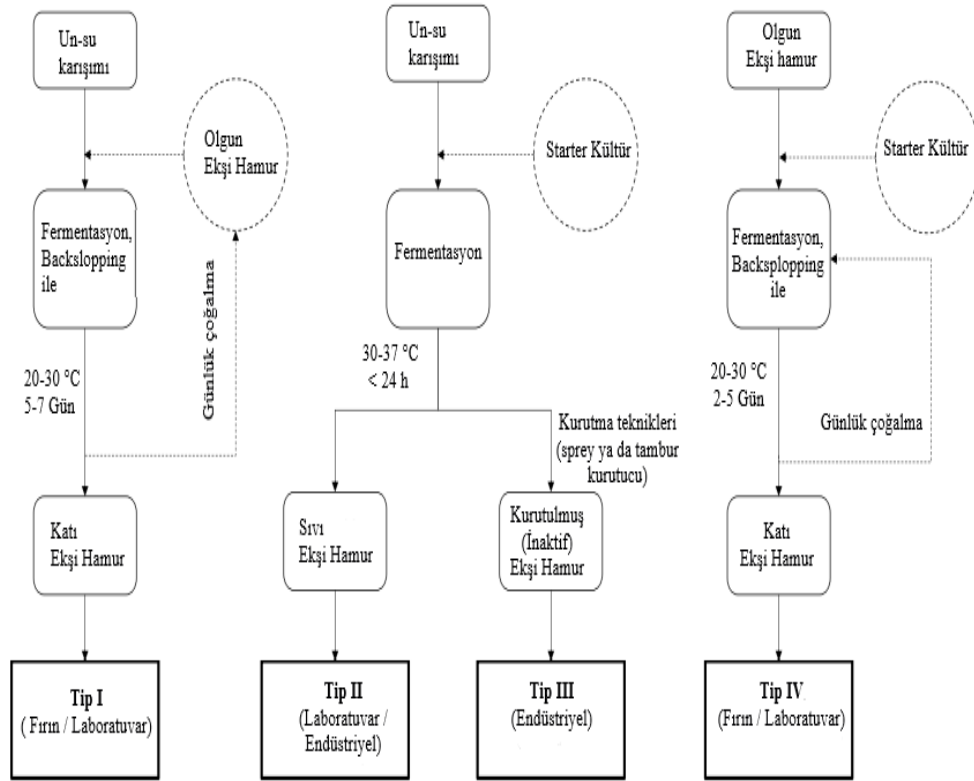
hamurdaki mikrobiyom, sadece farklı un türlerindeki çeşitli bileşenlerden değil, aynı zamanda hamurun hidrasyon seviyesi, geri besleme süresi, fermentasyon süresi ve sıcaklığından da etkilenmektedir.



Şekil 2.1 Ekşi hamur faydalarını gösteren harita [4]

2.1.1 Ekşi Hamur Çeşitleri

Ekşi hamurlar 4 farklı tipte sınıflandırılabilir (Şekil 2.2):



Şekil 2.2 Uygulamalı teknolojiye göre ekşi hamur fermentasyon çeşitleri [8]

(i) **Tip I**, geleneksel ekşi hamurlar, önceki fermentasyonun bir parçası kullanılarak yeniden başlatılırlar ve düzenli olarak yayılım gösterirler. Bu tür ekşi hamur, önceden fermente olan hamurun bir kısmı (%5-20, m/v) ile yeni bir un ve su karışımı kullanılarak döngüsel açıdan yeniden aşlamayı içerir. Bu işlem genellikle oda sıcaklığında (20–30°C) ve uzun bir fermentasyon süreciyle (kararlı bir mikrobiyota ve kimyasal madde elde etmek için 5 ila 7 gün) gerçekleştirilir [8]. Tip I ekşi hamur çeşidi daha çok geleneksel fırınlarda kullanılır ve laktik asit bakterileri (LAB) ve asetik asit bakterileri (AAB) tarafından üretilen organik asit nedeniyle oldukça asidik olmaktadır [6].

(ii) **Tip II**, fermentasyonun başlatılması için uyarlanarak kullanılmış suşlardan oluşan endüstriyel formdaki ekşi hamurlardır [8]. Tip I ekşi hamur çeşidiyle karşılaştırıldığında, Tip II genellikle daha hızlı bir yapı için daha yüksek

sıcaklıklarda (30–37°C) fermente edilir, bakteriyel organik asit üretimini destekler ve sonuçta daha düşük bir pH sistemi ile sonuçlanır [6].

(iii) **Tip III**, kurutulmuş ekşi hamurlar olmaktadır ve genellikle kolay saklama ve kullanım için kurutulur [4,8]. Tip III ekşi hamur tipi, tip II ekşi hamurların kurutulmuş hali olarak tanımlanır. Tip III ekşi hamur elde etmek için püskürtmeli kurutma ve tamburlu kurutma en yaygın kullanılan teknikler olmaktadır. Püskürterek kurutma, sıvı ekşi hamurun sıcak hava akımıyla toz haline getirilmesinden oluşur. Su içeriği (yaklaşık %90) buharlaştırılırken, kurutulmuş parçacıklar kurutucudan toplanabilmektedir. Tip II ve III, kullanımı kolay olduğu için endüstriyel fırınlarda sıklıkla kullanılmaktadır.

(iv) **Tip IV ise**, tip I ve tip II arasındaki kombinasyondan oluşan ekşi hamur çeşidini içerir. Genellikle laboratuvarlarda ve bazı fırınlarda kullanılan tip I ve II ekşi hamur karışımı olmaktadır. Bu tür ekşi hamur, olgun bir ekşi hamura bir starter kültürün aşılması ile oluşur. Daha sonra, ekşi hamur, tip I ile aynı süreci takip eder ancak mikrobiyal popülasyonlar geri besleme sırasında değişebilir [8].

2.1.2 Ekşi Hamur Üzerinde Etkili Olan Faktörler

2.1.3 Kullanılan Un Tipi

Ekşi hamur yapımında kullanılan un türü; kültürün ekolojisini, bir mayalama maddesi olarak teknik etkinliğini ve benzersiz duyuşal niteliklerini etkileyebilme özelliğine sahiptir. Un, ekşi hamur ortamına mikroorganizmaların girmesine yardımcı olmaktadır [9]. Ayrıca, bakteri ve mayaların hayatta kalmasını etkileyebilen konsantrasyonlarda farklı besinsel (karbonhidrat ve aminoasit gibi) ve besinsel olmayan (fenolik asit, amilaz, kül gibi) kaynakları sağlar [6].

2.1.4 Hidrasyon

Karasal ekosistemlerde, suyun mevcudiyeti tür dağılımlarını, ekolojik dinamikleri ve diğer olayları yöneten kilit bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Benzer şekilde, ekşi hamurun oluşumunda kullanılan su, starterin ekolojisi açısından önem arz etmektedir. Starterdeki suyun varlığı, hidrasyon (yani, suyun una oranı) veya hamur verimi (yani, 100 gram un kullanıldığında unun suya oranı) olarak adlandırılmaktadır. Hamur verimine en çok atıf bilimsel literatürde yapılırken, hidrasyon en çok geleneksel fırıncılık yapan topluluklar arasında tartışılmaktadır.

Su, besinleri ve proteolitik enzimleri yaydığı için hidrasyon, mikrobiyal ekoloji ve onların metabolik işlevi ile ilgili olmaktadır [6].

2.1.5 Sıcaklık

Bir starterin fermantasyon sıcaklığı ve depolama sıcaklığının, mikrobiyal aktivite üzerindeki etki sağlaması ile ekşi hamur ekmeğinin fiziksel, kimyasal ve uçucu özelliklerinin %44'ünü oluşturduğu belirtilmiştir [10]. "Bir starterin sıcaklığı" ve "fermantasyon sıcaklığı", aslında birkaç sıcaklığa atıfta bulunur:

- (a) starterin fermente edildiği sıcaklık,
- (b) yeniden beslendiği sıcaklık ve
- (c) Ekmek tariflerinde kullanıldığı sıcaklık.

Bu sıcaklıklar bağımsız olarak değişebilir. Starterin fermente edildiği sıcaklık (a) daha sonra günlük besleme döngüsü boyunca hem oda sıcaklığını hem de soğutulmuş sıcaklıkları içerebilir [6]. Sonuç olarak, farklı fermantasyon sıcaklıkları, mikroorganizmalar tarafından sekonder metabolitler, organik asitler ve aromatik bileşiklerin oluşumunu ve ayrıca diğer enzimatik reaksiyonları etkileyebilir. Örneğin, daha düşük sıcaklıklar (25–28°C) maya büyümesi üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Bu da artan etanol, CO₂ ve aroma bileşenlerinin üretimine neden olur. Yüksek fermantasyon sıcaklıkları ise ($\geq 30^\circ\text{C}$) LAB metabolizmasını geliştirirken, fermantasyon oranını (yani laktik ve asetik asit arasındaki oranı) etkiler ve ekşi mayanın asitlenmesini artırmaktadır. Sonuç olarak karbonhidratların daha iyi kullanımı organik asit biyosentezini artırır [8].

2.1.6 Fermantasyon Zamanı ve Geri Besleme

Ekşi hamur starterleri için iki zaman unsuru potansiyel olarak önem arz etmektedir. Bunlardan birincisi, starterin yaşı olmaktadır. Starterler onlarca, hatta yüzlerce yıllık olabilir ve tek bir starter için fermantasyon zamanı değişebilmektedir. Minervini vd. [11] yaptıkları çalışmada İtalyan unlu mamüllerin bir yıllık örnekleme dönemi boyunca türler arası değişiklik meydana geldiğini ve maya sayımlarında hafif bir artış olduğunu bildirmiştir. Bu da eski starterlerin daha iyi mayalanma maddeleri olabileceği sonucu doğurmuştur [6]. İtalyan, Belçika ve San Francisco ekşi hamurları, düşük sıcaklıklarda uzun fermantasyon süreleri ile karakterize edilir. Bu durumda, *Lb. sanfranciscensis*, nispeten düşük sıcaklıkta tercih edilen uzun fermantasyon süreleri nedeniyle ekşi hamur fermantasyonu gerçekleştiren baskın

mikroorganizma olmaktadır. Bu da tip I ekşi hamur hazırlamada meydana gelmektedir. Öte yandan, *S. cerevisiae*, kısa fermantasyonlu ekşi hamurlarda LAB'den daha hızlı metabolizma ve büyüme hızı göstermesi nedeniyle baskın olmaktadır [8].

2.1.7 Diğer Faktörler

Sayılan faktörlere ek olarak, karıştırma uygulamaları, tahıl/un öğütme uygulamaları, diğer depolama uygulamaları, starterin çevresi, ekmek üretiminin ölçeği ve yardımcı maddelerin kullanımı da ekşi hamur mayası mikrobiyal ekolojisini etkileyebilmektedir [6].

2.1.8 Ekşi Hamur Mikrobiyotası

Farklı coğrafi bölgelerdeki ekşi hamurların mikrobiyotası üzerinde çeşitli mikrobiyolojik çalışmaların yapıldığı görülmektedir. Her bir ekşi hamur, mayaların ve laktik asit bakterilerinin dinamik bir denge içinde bir arada bulunduğu bir mikro habitat olarak kabul edilebilir [12]. LAB topluluğunun bileşimi ve stabilitesi ürün kalitesinde önemli faktörler olmaktadır. Bununla birlikte, doğal fermantasyon genellikle çeşitli LAB'lerin öngörülemeyen büyümesine yol açar ve bu da LAB topluluğunu kontrol etmede zorluk yaratır. Aslında yapılan çalışmalara bakıldığında ekşi mayanın doğal fermantasyonu çoğu zaman tutarsız kalitede nihai ürünlerle sonuçlanır ve bu da belirli bir kalitede ekmek üretmek isteyen fırıncılar için hayal kırıklığına neden olmaktadır. Bu temel sorunu çözmek için, ekşi hamur LAB topluluk dinamiklerinin etki mekanizmalarını aydınlatmaya ihtiyaç vardır [7]. Bunlara ek olarak, tahıl unları ve diğer ekşi hamur bileşenleri steril olmadığından ekşi hamurun mikrobiyotası, özellikle kendiliğinden fermente edildiğinde oldukça karmaşık olmaktadır. Ekşi hamur fermantasyonunda LAB ve mayalar ortama hakim olsa da asetik asit bakterileri gibi mikroorganizmalar fermantasyon sürecinin başlangıcında bulunabilmektedir [8].

2.1.9 Ekşi Hamurda Bulunan Laktik Asit Bakterileri

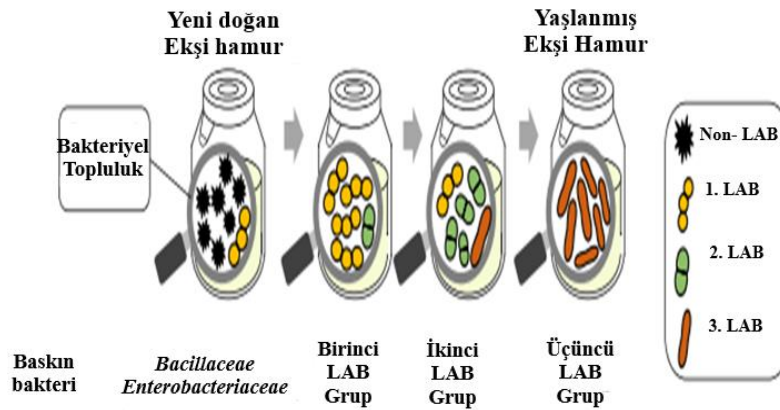
Ekşi hamurdaki LAB'ler, ekzopolisakkaritler ve çeşitli enzimlere ek olarak organik asit üretimi nedeniyle ham maddeyi hızla asitleştirebilir. Bu, raf ömründe artış ve mikrobiyal güvenlikle sonuçlanır, son ekmeğin dokusunu ve duyuşal profilini iyileştirir [8]. Ekşi hamur fermantasyonu sırasında en önemli süreç karbonhidrat

metabolizması olmaktadır. Bu işlem sırasında, LAB, yaşamı sürdüren enerji üretimi için sürekli olarak substrat olarak karbonhidratların yapı taşları olan basit şekerleri tüketerek, karbonhidratları organik asitler (genellikle laktik asit ve asetik asit), karbon dioksit ve/veya etanol biçiminde dönüştürür ve serbest bırakır [4]. LAB, fermantasyon ürünlerine göre homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Glikoz fermantasyonunun ana ürünü olarak sadece laktik asit üretenlere homofermentatif, laktik asidin yanı sıra asetik asit, CO₂ ve etanol üretenlere heterofermentatifler denilmektedir. Homofermentatif bakteriler daha fazla laktik asit üreterek pH'ı düşürürken titre edilebilir asitliği (TTA)'yı artırır. Heterofermentatif laktobasiller ise, daha çeşitli aroma bileşiklerini üretmenin yanı sıra CO₂ üretimi nedeniyle mayalanmaya az miktarda katkıda bulunur [8].

Ekşi hamurdaki LAB seviyeleri 10⁸–10⁹ kob/g arasında olmaktadır ve LAB/maya oranı genellikle 100:1 kabul edilmektedir [13]. Ekşi hamur ekosisteminde 70' den fazla LAB türü bulunmuştur. Son 20 yılda, eski *Lactobacillus* (19) cinsinin 12 yeni türü ilk olarak ekşi hamurlardan izole edilmiştir. Bu bakterilerden homofermentatif özellikte olanlar; *Companilactobacillus* (*alimentarius*, *crustorum*, *farciminis*, *futsaii*, *heilongjiangensis*, *tucceti*, *mindensis*, *musa*, *nantensis*, *paralimentarius*), *Lactobacillus* (*acetotolerans*, *acidophilus*, *amylolyticus*, *amylovorus*, *crispatus*, *delbrueckii*, *gallinarum*, *helveticus*), *Lactiplantibacillus* (*paraplantarum*, *pentosus*, *plantarum*, *xiangfangensis*), *Lactilactobacillus* (*curvatus*, *graminis*, *sakei*), *Schleiferilactobacillus* (*harbinensis*, *perolens*), *Lacticaseibacillus* (*casei*), *Ligilactobacillus* (*aviarius*), *Loigolactobacillus* (*coryniformis*), *Enterococcus* (*casseliflavus*, *devriesei*, *durans*, *faecalis*, *faecium*, *hirae*, *mundtii*, *saccharolyticus*), *Pediococcus* (*acidilactici*, *argentinus*, *inopinatus*, *pentosaceus*), *Streptococcus* (*bovis*, *thermophilus*, *salivarius*, *suis*), *Lactococcus* (*garvieae*, *lactis*) suşları olurken, heterofermentatif özellikte olanlar ise; *Levilactobacillus* (*acidifarinae*, *brevis*, *hammesii*, *koreensis*, *namurensis*, *parabrevis*, *spicheri*, *zymae*), *Limosilactobacillus* (*equigenerosi*, *fermentum*, *frumenti*, *panis*, *pontis*, *reuteri*, *secaliphilus*, *vaginalis*), *Lentilactobacillus* (*buchneri*, *diolivorans*, *farraginis*, *hilgardii*, *kefiri*, *parabuchneri*), *Fructilactobacillus* (*fructivorans*, *lindneri*, *sanfranciscensis*), *Furfurilactobacillus* (*rossiae*, *siliginis*), *Paucilactobacillus* (*vaccinostercus*), *Leuconostoc* (*citreum*, *durionis*, *fructosus*, *holzapfelii*, *lactis*, *mesenteroides*, *pseudomesenteroides*), *Weissella* (*cibaria*, *confusa*, *paramesenteroides*) olmaktadır [7].

Teknolojinin ilerlemesiyle birçok yeni tür LAB'nin keşfedildiği gözlemlenmiştir. Örneğin, Mart 2020'de *Lactobacillus* cinsi altında halihazırda 262 tür rapor edilmiştir [14]. En yakın zamanda, Zheng vd. [14], *Lactobacillus* cinsinin *Lactobacillaceae* ve *Leuconostocaceae* taksonomisini gözden geçirdikten sonra 25 cinse yeniden sınıflandırılma önerilmiştir. Sonuç olarak, bazı LAB isimlerinin güncellendiği, bunlar arasında *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (eski adıyla *Lactobacillus sanfranciscensis*), *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* (önceden *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* olarak bilinirdi) ve *Levilactobacillus brevis* (önceden *Lactobacillus brevis* olarak bilinirdi) suşlarının olduğu kaydedilmiştir [4].

Ekşi hamurda LAB arasında rekabet olmadan önce *Bacillaceae* ve *Enterobacteriaceae* familyalarındaki fermentatif olmayan bakterilerin baskın olduğu Şekil 2.3' de gösterilmiştir. Bu istenmeyen bakteriler sırasını daha sonra *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Weissella* gibi bakterilere bırakmaktadır. LAB'lerin ikinci sırasını *Pediococcus* ve *Lactilactobacillus* oluştururken, üçüncü bakteri topluluğunu ise *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. sanfranciscensis* grubunun oluşturduğu kaydedilmiştir [7].



Şekil 2.3 Ekşi hamur alt kültürleri işlemi sırasındaki bakteriyel topluluk [7]

2.1.10 Ekşi Hamurda Bulunan Mayalar

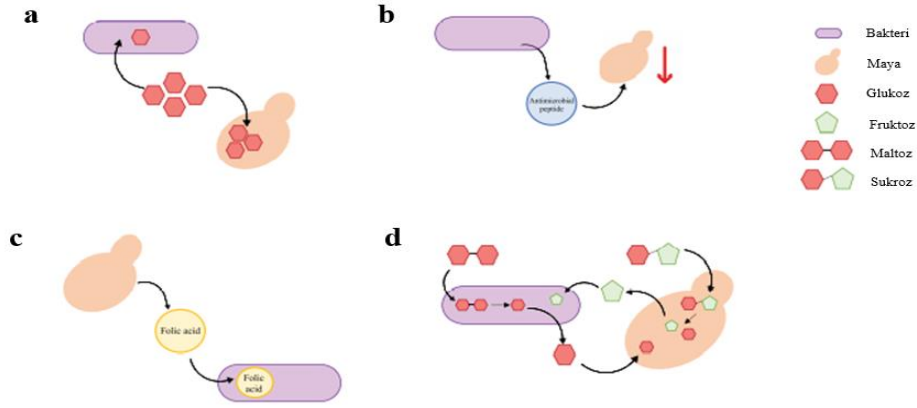
Mayaların ekşi hamurdaki kritik rolleri mayalama için CO₂ üretmesi ile karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca LAB ile birlikte sinerjistik ve antagonist bir şekilde çalışarak hem bakteri aktivitesini hem de ekşi hamur aromasını etkileyen çeşitli alkol, ester ve organik asit sınıfları üretir. Mayaların, antimikrobiyal maddeler üreterek

(allelkimyasallar olarak hareket eden) ekşi hamur ekosisteminde hayatta kalmak için rekabet ettiği belirtilmiştir. Fırıncılık tarihi boyunca mayalar hızlı fermentasyon sağlaması ve maksimum CO₂ üretmesi için evrimleşmiştir [15].

Yaygın ekşi hamur mayaları; *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania humilis*, *Candida krusei*, *Kazachstania exigua*, *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* ve *Pichia kudriavzevii* olmaktadır. Fakat bunlarla sınırlı olmadığı görülmüştür [6]. *S. cerevisiae* diğer maya türleri ile karşılaştırıldığında hızla çoğalan bir maya türü olmaktadır [16]. Bunun yanı sıra ekşi hamurda bulunan maya türleri, LAB tarafından oluşturulan ve düşük pH, yüksek karbonhidrat konsantrasyonu ve yüksek hücre yoğunlukları ile karakterize edilen stresli ortama adapte olmalarının bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır [8]. Farklı un çeşidi kullanılarak fermentasyon sonrası ekşi hamurlardan izole edilmiş mayalardan buğday ununda (*C. krusei*, *P. anomala*, *S. cerevisiae*, *S. exiguus*, *C. humilis*, *K. barnettii*, *S. bayanus*, *W. anomalus*, *R. Glacialis*, *K. unispora*, *S. uvarum*, *T. delbrueckii*, *C. tropicalis*, *Cyberlindnera jadinii*, *P. fermentans*, *P. membranifaciens*), çavdar ununda (*C. humilis*, *K. barnettii*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *W. anomalus*, *P. fermentans*), sorgum, mısır ve pirinç ununda (*S. cerevisiae*) türleri olurken, fermentasyon öncesi hamurlardan izole edilmiş mayalardan buğday ununda (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*), çavdar ununda (*Cryptococcus sp.*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae*) olmaktadır [4].

2.1.11 Bakteri ve Mayaların Etkileşimi

Ekşi hamur ekosistemi LAB ve mayalardan oluştuğundan bu ortamda her iki mikroorganizma arasında bazı etkileşimler meydana gelmektedir. Bu etkileşimler, bir türün diğeri üzerindeki etkisiyle belirlenmekte ve pozitif (sinerjik) olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra bir mikroorganizma popülasyonu bir diğeri türün varlığında artma eğiliminde ise negatif (antagonistik), azalma eğiliminde ise nötral ya da hiçbir etkisinin olmadığı vurgulanmıştır. Bu tür etkileşimlerin, fermente edilebilir karbonhidrat tüketimi, nitrojen kaynağı gibi kaynaklar için rekabeti, çapraz beslemeyi (maltoz bozunması veya aminoasit üretimi) ve ikincil metabolitlerin (antimikrobiyal bileşikler, orta asitleştirme vb.) üretimini içerdiği Şekil 2.4' de gösterilmiştir [8].



Şekil 2.4 Ekşi hamur çevresinde meydana gelen ana etkileşimler. A) Besinler için rekabet(glukoz) B) Amensalizm (BAL, mayaların büyümesini engelleyen antimikrobiyal peptitleri üretir); C) Kommensalizm D) Mutualizm [8]

Uyarıcı etkileşimle ilgili olarak, çapraz besleme (Şekil 2.4d) bir türün başka bir mikroorganizmanın hayatta kalmasına olanak sağlayan gerekli besinleri üretmeyi içerir. Örnek verilecek olursa; *Lb. sanfranciscensis*, maltozu metabolize ederek ortamdaki glikozun birikmesini ve serbest kalmasını sağlar. Daha sonra *C.millieri* ve *S.exiguus* gibi maltaz negatif olan mayalar fermente edilebilir bir karbonhidrat kaynağına sahip olur. Böylece popülasyonlarının, glikoz ve besin tükenmesinden etkilenmesini önlemiş olur. Buna ek olarak aynı durum mayaların, LAB için başka karbon kaynakları sağlaması ve onların büyümesini teşvik etmek için sakkarozu kullandığı kaydedilmiştir. Bu sayılan özelliklerin sayesinde çapraz beslemenin, mikroorganizmalar arasındaki rekabeti azalttığı ve büyümelerini artırdığı belirtilmiştir. Ek olarak, mayaların karbon metabolizması sonucu ürettiği CO₂'in *Lb. sanfranciscensis* ve *Lb. plantarum* gibi bakterilerin büyümesini artırabileceği bildirilmiştir. Çünkü anaerobik bir ortam sağlamaktadır. Üstelik, *S. cerevisiae* laktik asit tüketebilir ki bu da mikrobiyal büyümeye izin veren ekşi hamur ortamının asitsizleşmesine neden olur [8].

2.1.4 Ekşi Hamurun Sağlık Açısından Önemi

2.1.5 Ekşi Hamur ile Bağırsak Mikrobiyotasının Düzenlenmesi

Mikrobiyom terimi, toplam mikroorganizma sayısını ve bunların genetik materyalini ifade ederken, mikrobiyota, insan vücudunun farklı bölgelerinde bulunan mikrobiyal popülasyon olmaktadır. Mikrobiyal popülasyonlar, insan biyolojisinin kritik özelliklerini açıklar ve insan sağlığı ve hastalığının

düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Genel olarak fermente ürünler ve özellikle tahıl bazlı gıdalar, gastrointestinal sisteme ulaşan ve konakçının bağırsak mikroorganizmaları tarafından erişilebilen bol miktarda içerik ile karakterize edilmektedir. Ekşi hamur fermentasyonunun nişastanın sindirilebilirliğini aktif olarak geciktirme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir, bu da tahıl lifleri ile birlikte ince bağırsaktan geçen sindirilemeyen polisakkaritlerin üretimini artırabilir ve daha sonra kolonik mikrobiyota tarafından fermente edilebilir.

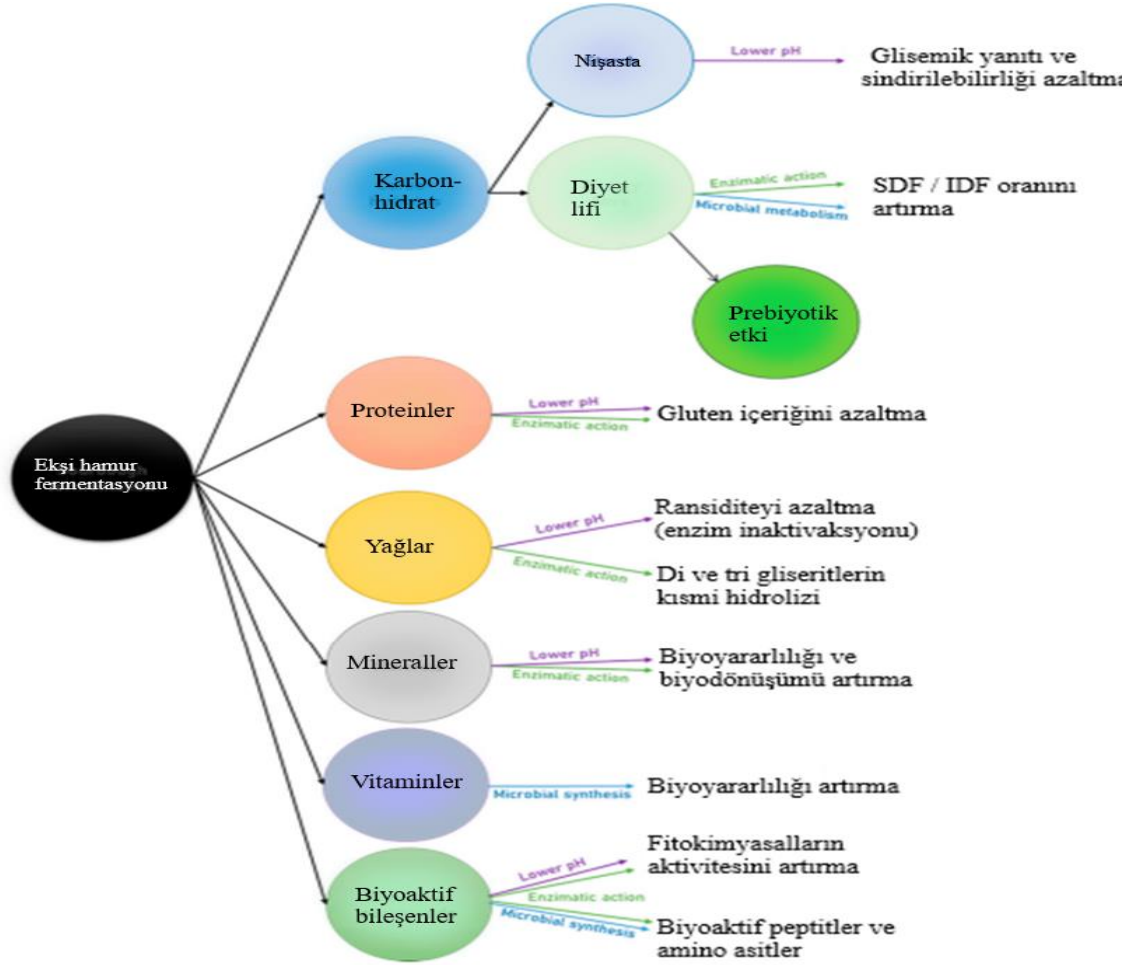
Ekşi hamur fermentasyonu, diyet lifi kompleksini ve ardından gelen fermentasyon modelini modüle etmek, prebiyotik özelliklere sahip ekzopolisakkaritler (EPS) üretmek veya LAB fermentasyonundan bağırsak mikrobiyotasını etkileyen metabolitler sağlamak gibi farklı mekanizmalarla bağırsak sağlığını etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda ekşi hamur ekmek tüketiminin insan bağırsak mikrobiyom profilinin modülasyonu ve korunması için özellikle faydalı olabileceği öne sürülmesine rağmen, ekşi mayalı ekmek tüketiminin hem bağırsak mikrobiyotası hem de sağlığı geliştirici metabolitlerin salınımı üzerindeki etkilerinin nasıl olabileceğine dair veriler sınırlı olmaktadır. Ekşi hamurun insan bağırsağının sağlığına ve mikrobiyomunun düzenlenmesine bir diğer önemli katkısı ise, ondan izole edilen bakteri suşlarının potansiyel probiyotikler olduğunun gösterilmesidir [17].

2.1.6 Ekşi Hamur ile Tuzun Azaltılması

Diyette yüksek sodyum tüketimi (yaklaşık 10 g/gün), felç, mide kanseri, böbrek hastalığı ve kemik demineralizasyonu riskleriyle bağlantılı olarak kardiyovasküler hastalığı ve hipertansiyonun nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Ekşi hamur fermentasyonu ya azalan tuz içeriğini maskeleyen ya da fonksiyonel antihipertansif bileşiklerle unlu mamülleri zenginleştiren faydalı etkilere sahip olmaktadır. Fermentasyon sırasında aroma verici serbest aminoasit ve amino asit türevlerinin sentezi nedeniyle, ekşi mayanın, LAB'nin türüne ve suşuna da bağlı olarak tuz azaltımı üzerinde etkileri bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada glutamat biriktiren *Lactobacillus reuteri* suşu ile fermente edilmiş çavdar malt ekşi hamurunun ekmeğe eklenmesinin tadı ve diğer kalite parametrelerini etkilemeden ekmekteki tuz içeriğinin %1.5'ten %1'e düşürülmesini sağlamıştır [18].

2.1.7 Ekşi Hamurun İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkisi

Son 15 yılda yapılan araştırmalarla ekşi hamur fermantasyonunun sağlık üzerinde iyileştirme kapasitesinin anlaşılmasında ilerlemeler sağlanmıştır. Tahıl ve tahıl bazlı ürünlerin besinsel kalitesinin modifiye edilmesi için ekşi hamur fermantasyonunun kullanılma potansiyeline genel bir bakış sağlanması için Şekil 2.5 güzel bir şablon olmaktadır [17].



Şekil 2.5 Tahıl ve tahıl bazlı ürünlerin besin kalitesini değiştirmek için ekşi hamur fermantasyonunun potansiyeli [17]

Ekşi hamurlu ürünlerin normal hamurla yapılan ürünlere kıyasla daha sağlıklı olduğu bazı çalışmalarda kaydedilmiştir. Buğdayın kepek kısmında yer alan fitik asidin sindirim rahatsızlığına ve şişkinliğe sebep olduğu belirtilmiştir [19]. Ekşi hamurlu ürünlerde, maya ve laktobasillerin fitik asidi nötralize etmesi ile ekşi hamur bazlı ürünler sindirimi kolaylaştırmaktadır. Yapılan çalışmalarda ekşi hamur fermantasyonunun tam buğday ekmeğindeki fitat içeriğini azaltmada maya fermantasyonundan (sırasıyla %62 ve %38) daha etkili olduğu gösterilmiştir. Buna

ek olarak, ekşi hamur fermentasyonu sadece organoleptik özelliklere sahip değildir aynı zamanda çölyak hastaları için de nutrasötik fonksiyonlara sahiptir [20].

2.1.8 Ekşi Hamurun Ticarileştirilmesi

Ekşi hamur mayası ilk olarak 1920'lerde 'Ireks Fertig Sauer' olarak bilinen laktik asit eklenmiş ve önceden jelleştirilmiş unun fermente edilmemiş bir karışımı olarak piyasalarda görülmüştür [25]. Bu ekşi hamur, halk tarafından pek iyi karşılanmadığı için 1970 yılında kurutulmuş ekşi hamurun gelişimi başlanmıştır. Bunun fırınlar ve büyük üretim merkezleri tarafından kullanılabildiği görülmektedir. Günümüzde tip III ekşi hamur, evlerde kullanım için yerel marketlerde ticarileştirilmektedir. Kurutulmuş hamur, mikroorganizmalar tarafından sağlanan kontaminasyona karşı duyarlılıklarının düşük olması ve daha yüksek fiziksel kimyasal stabilitelerinden dolayı taze hamurlara nazaran daha uzun bir raf ömrüne sahip olmaktadır. Bu özellikler ekşi hamurun ticarileştirilmesini kolaylaştırmıştır ve normal hamurda starter olarak tip III ekşi hamurun uygulanmasının farklı çeşitlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Çeşitli ülkelerde pazarlanan ve ekşi hamur üretiminde kullanılan tip III ekşi hamur çeşitleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir [20].

Tablo 2.1 Farklı ülkelerde pazarlanan tip III ekşi hamurlar [20]

Ekşi hamur un tipi	Ekşi hamur uygulanışı	Ticarileştiren ülke	Şirket
Buğday	Ekmek	İtalya Almanya Arjantin İspanya Fransa ve Brezilya (in Brazil partnership with Vallens) Fransa, Belçika, Meksika, İspanya, Fas ve Brezilya	S. Martino Molino Rossetto Alnatura BioVita Kron Jäst Lesaffret Indespanu Philiber Savours Eurogerm
	Ekmek ve pizza	Fransa ve Brezilya (in Brazil partnership with Vallens)	Nat-ali Philibert Savours
	Fırın ürünleri	ABD Fransa İtalya Almanya Belçika Fransa ve Brezilya (in Brazil partnership with Vallens) Fransa, Belçika, Meksika, İspanya, Fas ve Brezilya	Real Sourdough Bread Priméal Markal- Bio Molino Rossetto Seitenbachero Ireks Philibert Savours Eurogerm

Tablo 2.1 Farklı ülkelerde pazarlanan tip III ekşi hamurlar [20] (Devamı)

Ekşi hamur un tipi	Ekşi hamur uygulaması	Ticarileştiren ülke	Şirket
	Fransız ekmeği karışımı veya Pain au lön; San Francisco ekmeği; krep ve waffle karışımı	ABD Fransa ve Brezilya (in Brazil partnership with Vallens)	Goldrush Philibert Savours
	Genel olarak San Francisco ekmeği ve unlu mamüller (Yeni Zelanda, Fransa ve İtalya kültürü)	Yeni Zelanda	Breadnz
	Kekler	Brezilya ve İspanya	Puratos
Kamut buğday	Ekmek, pizza, kekler (Fransa kültürü) ve ekmeği	İtalya, Fransa ve Brezilya (in Brazil partnership with Vallens)	Antico Molino Rosso Philibert Savours
Tam buğday	Unlu mamüller	ABD Fransa Fransa, Belçika, Meksika, İspanya, Fas ve Brezilya	Real Sourdough Bread Markal- Bio Eurogerm
	Ekmek	Fransa ve Brezilya (in Brazil partnership with Vallens)	Philibert Savours
Çavdar	Ekmek	Almanya Fransa ve Brezilya (in Brazil partnership with Vallens)	Alnatura BioVita Philibert Savours
	unlu mamüller unlu mamüller (Yeni Zelanda ve Fransa kültürü)	ABD Yeni Zelanda Almanya Belçika Fransa, Belçika, Meksika, İspanya, Fas ve Brezilya	Real Sourdough Bread Breadn Biovegan Kron Jäst Ireks Eurogerm
Kılçıksız buğday (Triticum spelta)	Ekmek Unlu mamüller Kek, ekmeği ve pizza (Fransa kültürü)	Almanya Almanya İtalya	BioVita Biovegan Antico Molino Rosso
Kılçıksız buğday ve çavdar	Ekme	Almanya	Seitenbacher
Kinoa	Unlu mamüller	Almanya	Biovegan

Tablo 2.1 Farklı ülkelerde pazarlanan tip III ekşi hamurlar [20] (Devamı)

Ekşi hamur un tipi	Ekşi hamur uygulaması	Ticarileştiren ülke	Şirket
Malt	Unlu mamuller	Belçika	Ireks
Malt ve buğday	Unlu mamuller	İtalya	Paneangeli
Pirinç	Glutensiz mamuller	ABD	Real Sourdough Bread
Kahverengi pirinç	Glutensiz mamuller	Yeni Zelenda	Breadnz
Tapyoka nişastası	Glutensiz mamuller ^h	İtalya	Molino Rossetto
Farro (Triticum turgidum ssp.)	Unlu mamüller	Fransa	Priméal
Karabuğday	Kek, ekmek, pizza (UE kültürlü) ve unlu mamuller Ekmek	İtalya Fransa ve Brezilya (in Brazil partnership with Vallens)	Antico Molino Rosso Philibert Savors

Tablo 2.1'de tip III ekşi hamurun kuzey yarım kürede daha çok ticarileştiği görülmektedir. İtalya, Fransa ve Almanya gibi ülkeler; *FarroTriticum turgidum sp. tapioca* nişastası, karabuğday, malt, kinoa gibi farklı unlarla ekşi hamurun çeşitliliğinin ve genellikle pizza, kek ve fırıncılık ürünlerinde uygulanmasını gösteren ülkeler olarak yer almaktadır. Ayrıca, glutensiz ürünlerin beslenme trendini takip etmek için, kuzey yarımküredeki bazı şirketlerin beyaz pirinç, kahverengi pirinç, çavdar ve kinoa unları ile fermente edilmiş ekşi mayaları ticarileştirdiği Tablo 2.1'de görülebilir. Belçika (Puratos) ve Fransa'dan (Vallens ve Eurogerm) ithalat ücretlerinden dolayı ve 25 kg paketlerde ve yüksek maliyetli olması sebebiyle Brezilya gibi bu ülkelerin çoğunda tip III ekşi hamurun ticarileşmesini zaruri kılmaktadır. Bu yüzden, bu ülkelerde ekşi hamurla yapılan ürünler düşük fermantasyonlu ürünler olarak bilinmektedir ve ağırlıklı olarak geleneksel işlem (tip I) kullanılarak fırıncılar tarafından buğday unu, tam buğday unu ve buğday unu karışımlarıyla üretilir. Ekmek üretimi; Almanya'da %40, Fransa'da %35 ve İspanya'da %19 olmak üzere sanayi sektörünün %80'ini temsil etmektedir. Almanya'da ekmeklerin %73.5'i endüstriyel fırınlarda kullanılan ekşi hamurdan üretilmektedir. Evde ekşi hamur yapanlar için starter kültürlerle ya da tamamen fermente edilmiş ekşi hamurlarla hamur üretilmesi için ekşi hamur

üreticileri fırıncılık dallarına ayrılmıştır. Ekşi hamur üretimi ekmek üretiminden zaman ve mekan olarak ayrılmaktadır [20].

Ekşi hamur pazarıyla ilgili görüşlerin, küresel ekşi hamur pazarının compound annual growth (CAGR) kayıtlarına göre 2018-2023 dönemleri arasında yaklaşık % 6.9 bir büyüme olması yönünde olmuştur. Tüketiciler arasında ekşi hamur talebinin yayılmasından dolayı ekşi hamur pazarının katlanarak büyümesi beklenmektedir. Bu ekmek çeşidiyle ilgili tercihlerin artması sağlık yararlarına bağlanabilir. Bu ekmekler normal somun ekmeklerinden daha fazla sindirilebilme özelliğine sahiptir. Küresel ekşi hamur pazarının yaklaşık %35'lik kısmına Avrupa'nın sahip olduğu görülmektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa, toplam küresel payın %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Bu bölgelerde tüketiciler, daha sağlıklı yaşam tarzına doğru ilerlemeleri nedeniyle sürekli olarak daha sağlıklı ürün seçenekleri aramaktadır. Artesian fırınların sayısının artması da gelişmiş bölgelerde ekşi maya pazarının büyümesini destekleyen bir diğer faktör olarak karşımıza çıkmıştır [26].

2.1.9 Ekşi Hamurun Ekmek Hamuru ve Ekmek Üzerindeki Etkisi

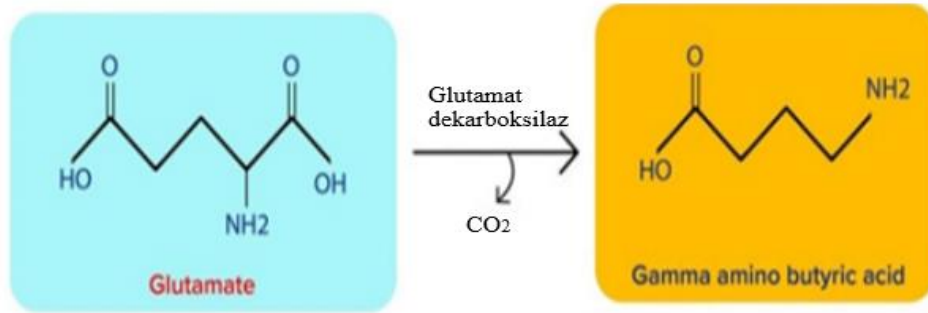
Ekşi maya fermentasyonu hem ekşi hamurun kendisini hem de ekşi hamurlu ekmek hamurunu etkilemesi olmak üzere hamur reolojisini 2 farklı şekilde etkilemektedir. Hamurda fermentasyon elastikiyeti ve viskoziteyi azaltırken, ekmek hamuruna ekşi maya eklenmesi daha az elastik ve daha yumuşak hamur oluşumunu sağlar. Bu hamurdaki reolojik değişimlerin düzeyi ve ekmek kalitesi üzerindeki etkileri, tercih edilen unun kül içeriğine ve fermentasyon süresine bağlı olarak değişebilmektedir [5]. Ekşi maya mikroorganizmaları, sırayla, son ekmeği etkileyebilecek şekillerde starter kültürün ekosistem fonksiyonlarını ve süreçlerini etkileme potansiyeline sahip olmaktadır. Bir starter kültürün ekolojisindeki değişimler, hamurun teknik özelliklerini (yani uzayabilirlik, elastikiyet, viskozite) ve organoleptik özelliklerini (ekmek hacmi, kırıntı dokusu, lezzeti) içermekte olup, starterin, ham ekmek hamurun ve pişmiş ekmek ürünlerinin fiziksel özelliklerine yansımaktadır [6].

Ekşi hamur, faydalı etkileri olduğu için ekmeğin bir hediyesi olarak kabul edilmektedir. Ekşi hamurun uygulanması raf ömrü, aroma, doku ve besin değeri dahil olmak üzere gıda ürünlerinin kalitesini artırmasıyla birçok avantaja sahip olmaktadır. Ekşi hamurla geliştirilen ekmeğin özellikleri bozulmaya karşı iyi korunmaktadır ve zararlı mikroorganizmaların gelişimini azaltan asetik, kaproik,

bütirik ve propiyonik asit gibi organik asitleri içeren asidik koşullardan dolayı raf ömrünü uzatmaktadır [4]. Jenkins [21], Torrieri vd. [22] ve Fernández-Peláez vd. [17] yaptıkları çalışmalarda ekşi hamur ekmeğinin bayatlamayı geciktirmesi ve raf ömrünü uzatmasının laktik asit fermentasyonu sırasında nişastanın bozulmasına katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Bir diğer çalışmada Alkay vd. [23], 12 farklı ekşi hamur izolatının antifungal aktivitesini belirlemek amacıyla bu aktivitenin ekşi hamur ve ekmeği üzerindeki etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Sonuç olarak kullanılan LAB'lerin ekmek kalitesi üzerinde olumlu etki sergilediği vurgulanmıştır. Ek olarak, ekşi hamurun fermentasyon sürecinin, pişirme işlemi sırasında maillard reaksiyonundaki bileşiklerin oluşumu ve LAB enzimatik hidroliz süreçlerinden dolayı ekmeğe daha iyi bir lezzet, aroma ve doku kazandırdığı vurgulanmıştır. Ekşi maya sadece buğday unundan değil, aynı zamanda çavdar, yulaf, arpa, mısır ve diğer unlar gibi diğer kaynaklardan da üretilabilmektedir. Bu un çeşitlerinin ekmeğe lezzet, besin değeri, organoleptik özellikler ve raf ömrü gibi farklı özellikler kazandırdığı belirtilmiştir [4]. Bu un kaynaklarının kullanıldığı bir ekmek çeşidi de geleneksel çavdar ekmeği olmaktadır. Ekşi hamurun çavdar ekmeğinde kullanılması işlenebilirliği, lezzeti ve dokusu üzerinde önemli olmaktadır. Çünkü fermentasyon süreci olmadan kepekli çavdar ekmeği üretimi zor olmaktadır. Genellikle gözlemlenen değişikliklerin çoğu diyet lifi bozulmasında veya çözünmesinde, endojen enzimlerin özellikle ksilanazların katkısı ile açıklanmaktadır [24]. Ekşi hamurdaki uçucu bileşiklerin oluşumu ekşi hamurun daha keskin ve kavrulmuş bir tat sağlayan pişirme sırasında LAB tarafından argininin ornitine dönüştürülmesi ve aminoasitlerin proteolitik süreçleri, tahıl proteinlerinden salınan glutaminin glutamata dönüştürülmesi ile katkıda bulunmaktadır [4]. Yapılan çalışmalarda protein proteolizi ve ekşi hamur fermentasyonu ile polipeptitlerin çözünmesi yoluyla toplam serbest aminoasitte önemli bir artış ve in vitro protein sindirilebilirliğinde iyileşmeler göstermiştir. Serbest aminoasitler arasında, L-glutamik asidin dekarboksilasyonundan üretilen, protein olmayan bir amino asit olan gamma-aminobütirik asitte (GABA) önemli bir artış olduğu vurgulanmıştır.

2.2 GABA (Gamma aminobütirik asit) ve Etki Mekanizması

GABA, her yerde bulunan [26] apo-protein, biyoaktif azotlu bir bileşik (amino asit) [27] olup beyindeki başlıca nörotransmitter inhibitörü olarak bilinmektedir [28] ve ilk olarak patates yumrulu dokunun bir bileşeni olarak bulunmuştur. Glutamat dekarboksilaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonda L-glutamik asidin α -dekarboksilasyonu yoluyla üretilmektedir (Şekil 2.6) [29]. Birkaç mikroorganizmada, bitkilerde ve hayvanlarda önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Bu yüzden hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yaygın olarak dağılım göstermektedir. GABA, başlıca inhibe edici nörotransmitterler arasında yer alıp, memelilerin merkezi sinir sisteminin ayrılmaz bir bileşeni olmaktadır ve beyinde meydana gelen sinapsların ~%40'ında bulunmaktadır [30]. Ayrıca GABA ve reseptörleri periferik sistemde, endokrin içinde ve oksidatif metabolizmada rol oynadığı birkaç nöral olmayan dokuda da tespit edilmiştir. [29].



Şekil 2.6 Glutamatın glutamat dekarboksilaz ile GABA'ya dekarboksilasyonu [29]

Hipotansif, gevşetici, antidiyabetik gibi birçok fizyolojik fonksiyonda yer alır, kandaki kolesterol seviyelerini düşürür, stres koşullarında bağışıklığı artırır ve kanser hücre çoğalmasını önler. Plazma konsantrasyonunu, beyindeki protein sentezini ve büyüme için hormonları artırır [31] ve yağ yakımını düzenler [32]. Bunların yanı sıra GABA uygulamasının anksiyete, depresyon, duygu durum bozuklukları ve uykusuzluğun tedavisinde yararlı olduğu belirtilmiştir [33]. Ek olarak nöronal gelişimde, sinaptik iletimleri modüle etmede ve beyin hücrelerinin metabolizmasını teşvik etmede hayati bir rol oynadığı ve bu nedenle Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalığı, demans ve bipolar bozukluklar gibi çeşitli nörolojik bozuklukların tedavisinde de yer almıştır [30].

GABA, bilgileri diğerine iletmek için nöronlardan salınan bir nörotransmitter olup, vezikül adı verilen akson terminalindeki membranöz keselerde depolanmaktadır. Her vezikülde binlerce GABA molekülü bulunmaktadır. Veziküller, ilk olarak GABA'nın nöronlar tarafından salınması için nöronal membran ile birleşir ve bunu ekzositoz yoluyla serbest bırakarak sinaptik boşluğa salınmasını sağlar ve daha sonra sinaptik uzay boyunca postsinaptik nörona doğru yayılır. İnsanda GABA, GABA reseptörlerine bağlanarak inhibe edici sinapsta etki eder ve bu bağlanma, hücre dışına potasyum iyonu ve hücreye klorür iyonu akışına olanak sağlayan iyon kanallarının açılmasına sebebiyet verir. Bu hareket, hiperpolarizasyona neden olan ve nöronların uyarılabilirliğini azaltan transmembran potansiyelinde negatif bir değişikliğe neden olur. Bir reseptöre bağlanmayarak salınan GABA, ya sinaptik yarıktaki enzimler tarafından bozunur ya da transporter veya geri alım pompası aracılığıyla aktif taşıma ile presinaptik akson terminali içine geri alınır [29].

2.2.1 GABA Üretimi

GABA; kimyasal sentez, enzimatik biyokataliz ve mikrobiyal fermantasyon olmak üzere 3 şekilde üretilmektedir. GABA'nın sentetik üretimi için farklı kimyasal yollar belirtilmiştir. Nitril indirgeme, ester hidrolizi ve deetoksikarbonilasyon içeren oldukça karmaşık olan 5 adım reaksiyonu dietil siyanomalonatın etil bromoasetat ile alkilasyonu sonucu elde edilen fonksiyonel olarak modifiye edilmiş bir ara üründen GABA'yı sentezlemek için kullanılmıştır. İndükleyici olarak izoforon varlığında mikrodalga destekli dekarboksilasyon reaksiyonu ile L-glutamik asitten GABA'nın sentezlendiği bildirilmiştir. Başka bir yaklaşımda ise GABA'nın sentezi için bakır kompleks transferleri ile katalize edilen alkenlerin karboaminasyon reaksiyonu kullanılmıştır [30]. Yapılan bir çalışmada Lie vd. [34] atık glutenden izole ettikleri glutamik asitten GABA üretimini sağlamışlardır.

Tablo 2.2 GABA üretimi için farklı yöntemlerin rekabet gücü ve sınırlamaları [35]

Üretim Metodu	Ham materyaller	Rekabet gücü	Sınırlamalar
Kimyasal sentez	- L-Glutamik asit, izoforon, HCl/H₂O (mikrodalga destekli dekarboksilasyon) 2-Pirrolidinon, Ca (OH)₂, NH₄HCO₃ - Potasyum ftalimid, Cl (CH₂)₃ CN, H₂SO₄	- Çok daha hızlı reaksiyon oranları - Genel olarak yüksek ürün verimi	- Katı reaksiyon koşulları - Kullanılan aşındırıcı reaktanlar - Yüksek üretim maliyeti - Karmaşık veya toksik yan ürünlerin oluşumu - Sınırlı uygulama alanları, özellikle Kimya Mühendisliği
Bitkilerin zenginleştirilmesi	Çay, esmer pirinç, meyve ağacı vb.	- Basit süreç - Proses güvenliği - Çevre dostu	- Ham madde olarak düşük GABA içeriği - Bitkilerden GABA'yı çıkarmak zor
Enzimatik yöntem	L-Glutamik asit, MSG ve glutamat dekarboksilazlar (GAD'ler)	- Yüksek reaksiyon hızı - Basit arıtma süreci	- GAD üretimi için yüksek maliyet - Enzim aktivitesini sürdürmek için katı reaksiyon koşulları
Mikrobiyal üretim	- L-Glutamik asit, MSG, kimchi, Çin paocai, glikoz, gliserol, ksiloz, metanol vb. - Tüm hücreli biyokatalizör	- Ham materyal olarak biokütleyi kullanarak yenilenebilir ve sürdürülebilirlik - Hafif koşullar olması nedeniyle proses güvenliği - Daha az çevre kirleticisi - Gıdada, ilaç ve diğer endüstriyel alanlarda geniş uygulamalar	- Enzimatik ile karşılaştırıldığında fermantasyonda nispeten düşük üretim ve verimlilik - Suşlar tarafın dan üretilen karbon kaynağı olarak sadece ksilozu kullanmak zor - Broth'tan daha yüksek geri kazanım

GABA'nın kimyasal sentezi, daha hızlı reaksiyon hızına ve yüksek ürün verimine sahip olmasına rağmen kimyasal sentez süreci sırasında kullanılan aşındırıcı reaktanlar, toksik yan ürünlerin varlığı ve sert reaksiyon koşulları gibi bazı sağlıkla ilgili sorunlar, uygulanmasını ciddi şekilde engellemiştir. Yukarıdaki nedenlere dayanarak, kimyasal olarak sentezlenmiş GABA'nın gıda katkı maddesi olarak

satılması yasaklanmıştır [35]. Biyolojik dokularda ise, GABA çok düşük konsantrasyonda bulunduğundan dolayı doğal organizmalardan yeterince ekstrakte edilmesi zorlaşmaktadır [29]. GABA üretimi için farklı yöntemlerin rekabet avantajları ve sınırlamaları Tablo 2.2’de özetlenmiştir [35].

Diğer üretim yöntemleriyle karşılaştırıldığında mikrobiyal üretim, çekici ve ümit verici bir yol olarak düşünülebilir. Çünkü:

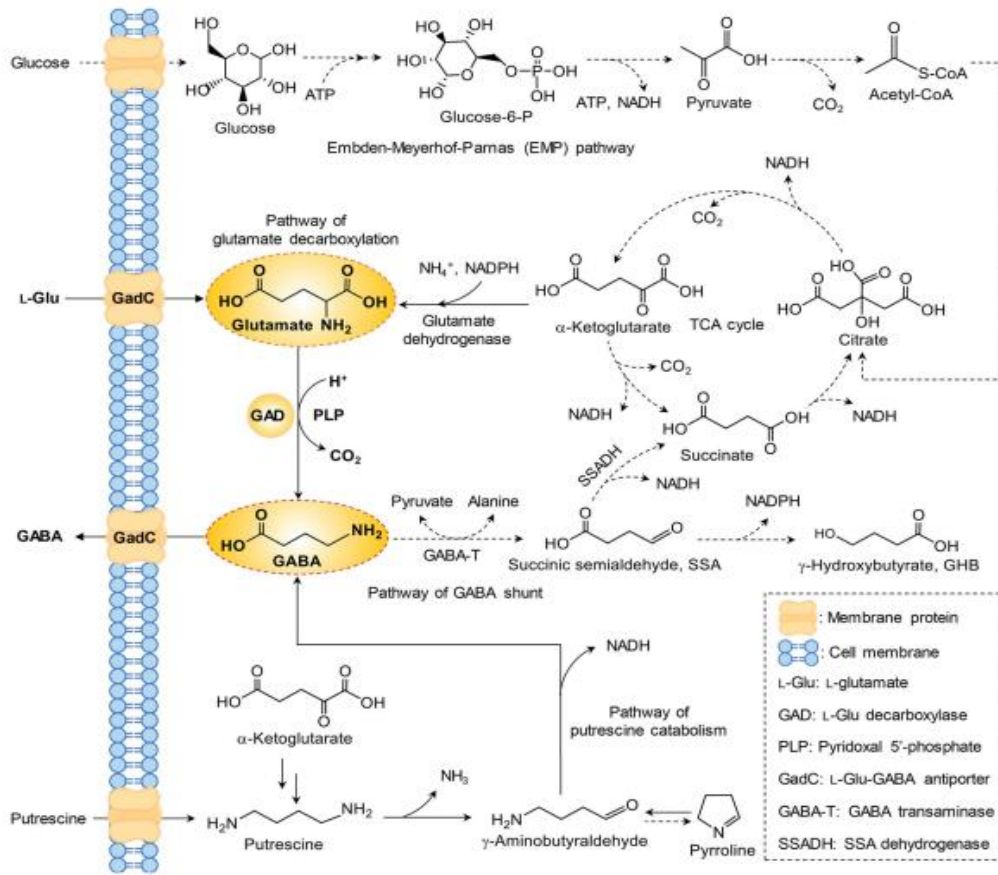
- 1) L-glutamat, monosodyum glutamat (MSG), glikoz, ksiloz, linyoselüloz ve gliserol gibi yenilenebilir kaynaklar, fermentatif substrat veya yardımcı substrat olarak kullanılabilir.
- 2) Üretim sürecinde daha az çevre kirletici oluşmaktadır.
- 3) Fermantasyon / reaksiyon koşulları genellikle hafif olmaktadır ve
- 4) Mikrobiyal üretim yöntemi, gıda ve ilaç endüstrilerindeki yeşil ürünler için belirtilen talepleri karşılamaktadır [35].

GABA üretimi için en iyi kaynakların mikroorganizmalar arasında bakterilerin ve küflerin olduğu bilinmektedir. Ana üretici küf cinslerinin *Monascus*, *Neurospora*, *Rhizopus* ve *Aspergillus* olduğu vurgulanmıştır [36]. Bununla birlikte, GABA üretimi için en kapsamlı araştırılan bakteriler laktik asit bakteri (LAB) cinsleri olmuştur.

2.2.2 Mikrobiyal GABA üretimi

GABA'nın mikrobiyal üretiminde glutamat dekarboksilaz (*gad*) yolu ve putrescine (Puu) yolu olmak üzere iki ana yol vardır. İki farklı yol içeren Puu yolu, *Aspergillus oryzae* ve *Escherichia coli*'de bulunan küçük bir yol olmasına rağmen *Bifidobacterium* veya *Lactobacillus* gibi yaygın üreticilerde bulunmamaktadır. İlk yol, Puu'nun γ -glutamil-Puu'ya dönüşümünü içerir, bu da daha sonra GABA verecek şekilde hidrolize edilen γ -Glu-GABA'yı vermek için oksidasyona uğrar. İkinci yolda ise Puu, GABA verecek şekilde oksitlenen γ -aminobütiraldehite doğrudan indirgenir. GABA üreticilerinin çoğunluğu tarafından kullanılan *gad* yolu, hücre içine monosodyum glutamat (MSG) veya glutamatın pompalanmasını içerir ve ardından koenzim olarak piridoksal-5-fosfat (PLP) tarafından desteklenen *gad* tarafından dekarboksilasyon takip eder. Glu / GABA antiporter daha sonra dönüştürülmüş ürünü, yani GABA'yı hücre dışı matrise aktarır [37].

Şekil 2.7’de gösterildiği gibi GABA üreten mikroorganizmaların çoğunda GABA biyosentezinin ana metabolik yolu, L-glutamatın α -dekarboksilasyon reaksiyonu olmaktadır. Bu reaksiyon geri dönüşümsüz olup bir piridoksal 5-fosfat (PLP)-bağımlı *gad* enzimi tarafından katalize edilmektedir. Mikrobiyal fermantasyon ile GABA üretimi üzerine derlenen raporların çoğunluğu bu metabolik reaksiyona dayanmaktadır. Ek olarak, GABA ayrıca çeşitli mikroorganizmalarda putrescine, poliamin veya ornitin bozunma reaksiyonundan biyosentezlenebildiği yukarıda da açıklanmıştır [35].



Şekil 2.7 Mikroorganizmalarda GABA biyosentezi ve yıkımının ana metabolik yolları (Koyu renkli oklar GABA üretimi için öncüllerin biyosentezi için metabolik yolları ifade ederken, noktali oklar EMP yolu, TCA döngüsü ve GABA şantı'nı ifade eder) [35]

GABA, beyinde baskın olarak bulunan ana engelleyici nörotransmitter olmaktadır. GABA'nın ana yolu, TCA döngüsü tarafından üretilen α -ketoglutarat'ın glutamat, GABA ve suksinik semialdehit yoluyla süksinata dönüştürülmesinden ibarettir. Bu yol prokaryotlar ve ökaryotlar için korunmuştur ve GABA şantı olarak bilinmektedir (Şekil 2.7). GABA şant yolu ilk olarak 1970 yılında, kobay hücreleri üzerinde yapılan

çalışma ile tanımlanmıştır. GABA şantında yer alan farklı enzim türleri vardır. İlk adım, transaminasyon reaksiyonu ve glutamat dehidrojenaz tarafından katalize edilen reaksiyon ile α -ketoglutarat'tan glutamat üretilmesidir. Bir sonraki adım, glutamat dekarboksilaz (*gad*) ile katalize edilen GABA için glutamat dekarboksilasyonudur ve bu adım geri dönüşümsüzdür. Bu aşamada glutamat dekarboksilaz bir proton tüketir ve CO₂ salgılar. *Gad* enzimi, hayatın tüm evresinde yer alan çeşitli organizmalarında bulunur. GABA sentezinde *gad*, hız sınırlayıcı bir enzim olarak görev alır ve *gad* için kofaktör olarak piridoksal fosfat (PLP) gerektirir. *Gad*'ın iki izoformu olan GAD67 ve GAD65 memeli türler tarafından eksprese edilir. GAD67 geni ve GAD65 geni, insanlarda sırasıyla 2. ve 10. kromozomlarda bulunur. GAD67 beyinde GABA sentezlerken, GAD65 pankreas hücrelerinde başlıca *gad* izoformu olmaktadır.

GABA şantında yer alan üçüncü enzim GABA transaminaz (GABA-T) olmaktadır. Bu adımda, GABA katabolizması meydana gelir ve GABA transaminaz enzimini kullanarak süksinik semialdehit (SSA) üretir. Bir sonraki adım, süksinik semialdehit dehidrojenaz (SSADH) enzimiyle süksinik semialdehitin süksinat'a dönüşümüdür ve üretilen süksinat, daha fazla metabolizma için TCA döngüsüne girer. Mitokondriyal elektron taşıma zincirinin bir elektron vericisi olan süksinat, trikarboksilik asit döngüsünün önemli faktörü olmaktadır. Bitkilerde, hayvanlarda ve *Escherichia coli*'de GHB dehidrojenaz (GHBDH), SSA'yı γ -hidroksibütirik aside (GHBA) dönüştürür [29]. GAD sisteminin metabolik yolu, poliamin degradasyonu ve GABA şantının yanı sıra, hücre zarında bulunan bir GadC proteini, hücre dışı L-glutamat taşınmasından ve GABA'nın hücre içi atılımından sorumludur ve bu nedenle bazı aside toleranslı bakterilerin GABA biyosentezinde hayati bir rol oynar [35].

2.2.3 GABA Üreten Mikroorganizmalar

Mikroorganizmaların bitkilerden daha hızlı büyümesi, ekim için fazla alana ihtiyaç duyulmaması ve tüketiciler için çevre dostu olması vazgeçilmez kılınan özellikleri arasında yer almaktadır. Ayrıca, mikroorganizmaların üretimini kontrol etmek kolay olmaktadır. Laktik asit bakterileri (LAB) gıda endüstrisinde, özellikle yüzyıllardır fermente gıda üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Genelde güvenli (GRAS) olarak tanındığı için, fermantasyon endüstrisindeki yüksek

uygulama potansiyeline sahip olan GABA üretimi yüksek LAB'ler son yıllarda yoğun ilgi görmüştür ve GABA ile zenginleştirilmiş doğal sağlık odaklı gıdaların üretiminde kullanılmıştır [38]. Ayrıca LAB, çeşitli üretim özellikleri ve probiyotik etkileri nedeniyle GABA üreten önemli mikroorganizmalardır. GABA üretme kabiliyetine sahip bir dizi LAB suşu, peynir, kimchi, paocai, yoğurt ve fermente soya fasulyesi gibi geleneksel fermente gıdalardan izole edilmiştir. *Lactobacillus* cinsi, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* vb. dahil olmak üzere bol miktarda GABA üreten türe sahip olmaktadır. Ayrıca, bazı *Streptococcus thermophilus* ve *Lactococcus lactis* suşları, GABA açısından zengin süt ürünlerinin üretimi için en iyi aday olan GABA üretim yeteneklerini sergilemektedir. Son yıllarda, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* ve *Weissella* cinsinden bazı türlerin GABA üretebildikleri bulunmuş olup [38] kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların GABA üretim miktarları Tablo 2.3'de verilmiştir [39].

Tablo 2.3 Farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen GABA miktarı [39]

Mikroorganizma	İzolasyon Kaynağı	Kültür ortamı	Gaba Miktarı
<i>Lactococcus lactis</i> ssp.lactis 017	Peynir starteri	Yağsız süt	2700mg/L
<i>Lactobacillus brevis</i> IFO12005	-	Komeshochukusu ve GY	1049.8mg/L
<i>Monascus purpureus</i> CCRC 31615	Araştırma merkezi	Nutrient broth	1493.6mg/kg
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> IFO32002	-	Soya Fasulyesi	17400mg/kg
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> IFO32003	-	Soya Fasulyesi	15000mg/kg
<i>Lactobacillus paracasei</i> NFRI7415	Fermente edilmiş balık (funasushi)	MRS broth	31145.3mg/L
<i>Lactobacillus brevis</i> GABA 057	-	GYP Medium	23381.0mg/L
<i>Lactobacillus plantarum</i> C48	Peynir	Sodyum asetat buffer	16.0mg/kg
<i>Lactobacillus paracasei</i> PF6	Peynir	Sodyum asetat buffer	99.9mg/kg
<i>Lactobacillus brevis</i> PM17	Peynir	Sodyum asetat buffer	15.0mg/kg
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus</i> PR1	Peynir	Sodyum asetat buffer	63.0mg/kg
<i>Lactococcus lactis</i> PU1	Peynir	Sodyum asetat buffer	36.0mg/kg
<i>Streptomyces bacillaris</i> strain R9	Çay	Nutrient broth	2.9mg/kg
<i>Streptomyces bacillaris</i> strain Y11	Çay	Nutrient broth	2.4 mg/kg

Tablo 2.3 Farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen GABA miktarı [39]
(Devamı)

Mikroorganizma	İzolasyon Kaynağı	Kültür ortamı	Gaba Miktarı
<i>Lactobacillus brevis</i>	Taze süt	GYP	4599.2mg/L
<i>Lactobacillus buchneri</i> MS	Kimchi	MRS Broth	25883.12mg/L
<i>Lactobacillus sp.</i> OPK2-59	Kimchi	MSG	180mg/kg
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> B	Kimchi ve Yoğurt	Kahverengi pirinç suyu, çimlenmiş soya fasulyesi ve yağsız süt (33:58:9,v/v/v)	6410mg/L
<i>Streptococcus salivarius subsp.thermophilus</i> Y2	-	Nutrient medium	6000mg/L
<i>Lactobacillus brevis</i>	Paocai	MRSS Medium	15370.0mg/L
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> PU1	Peynir	Buğday unu	258.71mg/kg
<i>Lactobacillus brevis</i> GABA 100	-	MSG	13000mg/L
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Çin lahanası kimchi	Kahverengi pirinç suyu, çimlenmiş soya fasulyesi ve yağsız süt (33:58:9,v/v/v) ve MSG	7,200mg/L
<i>Lactobacillus brevis</i> NCL912	Paocai	Nutrient Medium	35,662.0mg/L
<i>Lactobacillus brevis</i> NCL912	Paocai	Nutrient Medium	10,3719.1mg/L
<i>Lactobacillus brevis</i> BJ20	Kimchi	Deniz otları ve pirinç unu	2465mg/L
<i>Lactobacillus plantarum</i> C48	Peynir	Karabuğday, amaranth, nohut ve kinoa unu (1: 1: 5.3: 1)	504mg/kg
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM19463	Peynir	Üzüm şırası / peynir altı suyu sütü / MRS	498.1mg/L
<i>Lactobacillus brevis</i> DPC6108	Bebek feçesi	20mg/mL MSG içeren MRS	20.47 mg/mL
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> DPC6044	Bebek feçesi	20mg/mL MSG içeren MRS	3.17 mg/mL

(-) Belirlenmemiştir.

2.2.4 LAB Tarafından GABA Üretimi

LAB, gram pozitif, aside toleranslı, sporlanmayan bakteriler olup, koklar ve çubuklar oluşturur ve ortak fizyolojik ve metabolik özellikleri paylaşır. LAB, çok çeşitli fermente gıdalar için önemlidir ve geleneksel ve endüstriyel gıda fermentasyonlarında starter kültürler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ana metabolik ürünlerden biri olan karbonhidratların fermentasyonu sırasında oluşan

laktik asit, LAB'nin fizyolojik aktivitelerini etkileyebilmektedir. Asidik koşullar altında, birkaç LAB'de hücre canlılığını korumak için farklı asit direnç sistemleri geliştirir. Bu sistemler, örneğin protonların translokasyonu ile sitozolde pH homeostazına katkıda bulunan F₀F₁-ATPase sistemini veya katyon / proton antiporter / symporter sistemlerini içerir. Ek olarak, substratlar olarak sırasıyla glutamat ve arginin varlığını gerektiren glutamat veya arginin bağımlı sistemler LAB'nin asit direncine katkıda bulunur. Arjinin bağımlı sistem hücre içi bir alkali bileşiğin üretimine dayanırken, glutamata bağımlı sistem benimsenmiş glutamat ile GABA'yı birleştirerek ve daha sonra başka bir glutamat substratı için bu ürünü değiştirerek bir hücre içi proton tüketir. Böylece hücre dışı bir amino asit hücre içi pH değerinde bir artışa neden olan hücre içi protonun harcanmasıyla hücre dışı bir bileşiğe dönüşür.

GABA, bakterilerde yaygın olarak dağılan dört karbonlu bir bileşik olmaktadır ve Krebs döngüsünde metabolik bir rol oynamaktadır. Bakterilerde GABA belirli fonksiyonlara sahip olmaktadır ve bunun suştan suşa değiştiği kaydedilmiştir. Probiyotik suşların tanımlanması için ana kriterlerden bir tanesi de asit toleransı olmaktadır. Asidik stres altında bakterilerin nötral pH'ı korumaları için en önemli faktörlerden biri, glutamat-antiporter reaksiyonlarına dayalı olmalarıdır. Bakterilerde glutamat, spesifik taşıyıcı yardımıyla hücre içine salınır ve hücre içi proton tüketimi ile sonuçlanan sitoplazmik dekarboksilasyon meydana gelir. Antiporter yoluyla reaksiyon ürünü GABA, hücreden dışarı atılır ve hidrojen iyonlarının uzaklaştırılması nedeniyle hücre içi pH artar. Ayrıca hücre dışı PH, daha fazla alkali GABA için hücre dışı glutamatın değişimine bağlı olarak artar [29]. Bu yüzden, glutamat dekarboksilazın ana işlevi dekarboksilasyon reaksiyonu ile hidrojen iyonlarını tüketerek bakteri ortamının pH'sını kontrol etmesidir. *E. coli*, *Shigella* ve *Lactobacillus*, *L. lactis* gibi laktik asit bakterileri, glutamat dekarboksilaz genine sahip olmaktadır. Dolayısıyla bu genlerin ekspresyonu, bakterilerin asidik pH altında hayatta kalmasını gerektirir. Bu nedenle asidik koşullarda hayatta kalmak için *gad* aktivitesinin artması kritik öneme sahip olmaktadır ve bakterinin fermente gıdaların, mide suyunun, gastrointestinal sistemdeki uçucu yağ asitlerinin düşük pH ortamının üstesinden gelmesine olanak sağladığı bildirilmiştir.

2.2.5 GAD Geni

Gad geni, L-glutamik asitten gamma-amino bütirik asitin üretiminden sorumlu olan glutamat dekarboksilazı (protein kodlayan) kodladığı bilinmektedir. Bunun insüline bağımlı diyabette önemli bir otojen olduğu kaydedilmiştir. *Gad* geninin, ökaryotlar ve prokaryotlar arasında geniş çapta yayıldığı vurgulanmıştır. *Gad* geninin, birçok mikroorganizmada biyosentezde ve doğal GABA birikiminde hayati bir rol oynadığı bildirilmiştir. Aynı zamanda laktik asit bakterilerinde asit stres yanıtını indükleyen hücre içi bir enzim olmaktadır [29]. LAB'lerde *gad* hücre içi bir enzim olmaktadır ve bunun indüksiyonu LAB'deki asit stres tepkilerinden biridir. *Gad*, 54 ile 62 kD arasında değişen moleküler kütleyle sahip özdeş alt birimlerden oluşan bir formdadır. Prekürsör proteini değildir ve bir lizin kalıntısı içeren yüksek oranda korunmuş katalitik amino asit kalıntılarına sahip olmaktadır. *Gad* enzimi çeşitli LAB'lerden izole edilmiştir ve biyokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir. LAB'lerinin *gad* enzimi için dekarboksilasyon reaskiyonu benzer olmasına rağmen özellikle N-terminali ve C-terminal bölgeleri gibi birincil yapıları önemli derecede farklı olmaktadır. Birincil yapıdaki farklılıklar, LAB'nin GABA üretme yeteneğini etkileyebilir. LAB'lerde *gad*'ın dimer oluşumu korunabilir. Fakat, *Lb. brevis* IFO12005 suşundaki *gad*'ın aktif formunun tetramer yapıda olduğu kanıtlanmıştır. Bu, mikroorganizmalardan *gad*'ın tetramer formunun ilk kanıtı olmaktadır [40].

Gad sistemi türler arasında oldukça değişken olmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Mycobacterium tuberculosis*'in antiporterle desteklenmeyen bir *gad* genine sahip olduğu, buna nazaran *Listeria monocytogenes*'in ise üç dekarboksilaza ve 2 antiportere sahip olduğu belirtilmiştir. Bu özelliklere bakıldığı zaman çeşitli türlerin veya suşların *gad*'ın kimyasal ve fiziksel özelliklerinin önemli oranda değiştiği ve bunun da daha yüksek biyoteknolojik değere sahip olan yeni *gad* enzimlerinin araştırılmasını mümkün kıldığı gözlemlenmiştir [29]. *Gad*, glutamatın γ -aminobütirik aside dönüşümü glutamat dekarboksilaz tarafından katalize edilir ve glutamatın geri döndürülemez α -dekarboksilasyonu katalize eder. *Gad*, kofaktör olarak piridoksal 5'-fosfat (PLP) kullanır ve bakteri, küf ve mayalar gibi çok sayıda mikroorganizmalarda bulunur. Bunun yanı sıra bitkilerde, böceklerde ve omurgalılarda bulunur. *Gad*, L-glutamatın varlığında sitoplazmadaki proton konsantrasyonunu azaltarak asidik stresle karşılaştığında LAB tarafından kullanılan

hücre içi bir enzimdir. Bu sistem, glutamata bağımlı aside dirençli sistem (GDAR) olarak adlandırılır ve asidik koşullar altında koruma sağlar. Böylece LAB'nin asit stres yeteneği algılama ve başa çıkma yeteneği, gastrointestinal sistemin (GIT) kolonizasyonu ve fermente gıdalar gibi asidik koşullar altında hayatta kalmanın başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için hayati olmaktadır [29].

2.2.6 GABA Sentezini Etkileyen Faktörler

LAB suşları arasında GABA üretme kabiliyeti büyük farklılıklar göstermektedir. Kültür koşulları ve ortam kompozisyonundan önemli ölçüde etkilendiği ve bu yüzden GABA üretimini artırmak için bu koşulların optimize edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Farklı LAB türleri arasında GABA fermantasyonu için optimal koşullar çeşitli olmaktadır. GABA üretimini etkileyen en önemli faktörleri karbon kaynağı, glutamat konsantrasyonu, kültür sıcaklığı, pridoksal 5'-fosfat (PLP, koenzim) ve pH oluşturmaktadır. Bunların arasında önemli ortak faktörlerin pH, sıcaklık ve glutamat konsantrasyonu olduğu kabul edilmiştir. Hücre içi GABA içeriğinin düşük olması ve hücrelerden ekstrakte edilmesi zor olduğundan dolayı optimizasyon esnasında sadece hücre dışı GABA belirlenmelidir [40].

2.2.7 pH'nın Etkisi

Mikroorganizmalarda GABA'nın biyosentezi esas olarak pH tarafından düzenlenir ve fermantasyon işlemi için en belirgin etkiye sahiptir. Farklı mikroorganizmalar arasında *gad*'ın biyokimyasal özellikleri değişiklik gösterir. Bu yüzden etkin pH değeri maksimum GABA üretimi için türe bağlı olmaktadır [32]. Ek olarak, pH değeri, LAB ile GABA biyosentezi için anahtar bir faktör olmaktadır. Hem bakterilerin büyümesini hem de *gad* aktivitesini etkiler. Yapılan çalışmalarda fermantasyon ortamındaki başlangıç pH'sının GABA sentezini etkilediği vurgulanmıştır [38]. *Lb. plantarum* DSM19463 suşu pH 6.0 'da maksimum GABA (59 µM/h) miktarını sentezlerken [41], *Lb. paracasei* NFRI 7415 suşu pH 5.0'de en yüksek GABA (210 mM) miktarını üretmiştir [42]. Bazı çalışmalarda *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşunun pH 4.5'de en yüksek GABA miktarına (7984 mg/L) sahip olduğu belirtilmiştir [43]. *Lb. brevis* GABA 057'nin pH 4.2'de toplam %10 monosodyum glutamati (MSG) GABA'ya dönüştürdüğü görülmüştür. *Lb. lactis* suşu için ise optimum pH değeri 7.5'ten 8.0'a değişmektedir ve bu değerlerde GABA miktarı (7.2 g/L) olmuştur [44].

Fermantasyon yoluyla yüksek GABA üretimi, sadece *gad* aktivitelerinin aktivasyonuna değil, aynı zamanda GABA ayrışan enzimlerin aktivitelerinin inhibe edilmesine de bağlıdır. GABA ayrışması çeşitli bitki ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır. GABA transaminaz, amino aseptor olarak ya etil pürivat ya da α -ketoglutarat kullanarak GABA'nın süksinik semi aldehit'e geri dönüşümünü katalize eder. Süksinik semi-aldehit dehidrogenaz ise süksinik semi alheditin süksinata geri dönüşümünü sağlar [32].

2.2.8 Sıcaklık

Fermantasyon yoluyla maksimum GABA verimini etkileyen bir diğer önemli faktör inkübasyon sıcaklığıdır. Sıcaklık, biyokatalizör aktivitesi ve stabilitesi ve reaksiyonun termodinamik dengesi üzerinde de etkisi bulunmaktadır. Glutamatın GABA'ya yüksek verimle dönüştürülmesi, yüksek hücre yoğunluğuna ve uygun kültür sıcaklığına ihtiyaç duyar [32]. *Lb. brevis* NCL912 suşundaki GABA üretiminin kültür sıcaklığına bağlı olan hücre yoğunluğu ile pozitif bir korelasyon sergilediği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [45].

2.2.9 Fermantasyon Süresi ve Katkı Maddesinin Etkisi

GABA'nın fermantasyonunda ve üretiminde sıcaklık ve pH'nın yanı sıra zaman faktörü ve besin bileşimi de önemli rol oynamaktadır. Ayrıca *gad* koenzimleri olarak glutamat ve PLP içeren ortam katkı maddeleri, fermantasyon sırasında GABA üretimini etkileyen ana faktörler olmaktadır. Ortam bileşimi, özellikle karbon ve azot kaynakları ve diğer bileşenler GABA üretim miktarını etkileyebilmektedir. Ayrıca, substrat konsantrasyonları yüksek GABA verimi elde etmek için önem arz etmektedir. Karbon kaynağı olarak L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, galaktoz, glikoz, fruktoz, maltoz, melibiyoz, a-metil D-glukozit, N-asetil D-glukozamin ve glukonat gibi farklı karbonhidratlar test edilmiştir [32].

Bir suşun GABA verimini belirlemenin bir diğer yolu *gad* aktivitesi olmaktadır. Hem pH ve sıcaklık hem de L-glutamik asit ve PLP'den etkilenmektedir. LAB tarafından GABA sentezi için ortam içinde vazgeçilmez olan *gad* substratı L-glutamik asit olmaktadır. LAB, GABA üretimi için yeterli miktarda L-glutamik asit sentezleyemediğinden GABA üretiminde monosodyum glutamat (MSG) kullanılmaktadır. MSG'den hidroliz yoluyla L-glutamik asit üretilmesi mümkün olmaktadır. Optimal MSG konsantrasyonları GABA üretiminde mikroorganizmalar

için çeşitlilik arz etmektedir. Fakat bazı araştırmacılar aşırı MSG'nin hücre büyümesini inhibe edebileceğini ve GABA üretimini azaltabileceğini göstermiştir [38]. Aynı zamanda GABA üretimi için substrat olarak glutamat'ın kullanılması ile kültür ortamının yüksek maliyete sahip olması gibi bazı problemleri de beraberinde getirmektedir [32].

2.2.10 GABA'nın Sağlık Üzerine İşlevleri

GABA'nın çoklu fizyolojik fonksiyonları hakkında kayda değer bilgiler mevcuttur. Bu yüzden GABA içeren fonksiyonel gıdaların gelişimi aktif olarak takip edilmiştir. Hayvanlarda, GABA beyinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve merkezi sinir sistemi içindeki bazı yollarında ve ayrıca periferik dokularda inhibitör nörotransmisyonunda temel bir rol oynar. Gevşeme, uykusuzluk ve depresyon gibi diğer fizyolojik fonksiyonlar GABA ile tedavi edilmiştir [36]. Son zamanlarda Wu vd. [46] çeşitli çaylarda GABA içeriğini ve uykuyu arttırıcı etkisini göstermiştir. Aynı zamanda GABA, kan damarlarının güçlendirilmesi, insülin sekresyon modülasyonu, artmış kan kolesterolünün önlenmesi, duygusal huzursuzluğun hafifletilmesi, inme, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının iyileştirilmesi gibi insanlarda ve diğer omurgalılarda çeşitli fizyolojik fonksiyonlarla da ilişkilendirilmiştir.

GABA, büyüme hormonu salgılayan ve insan büyüme hormonu (HGH) üretimini arttıran ön hipofizi uyarır. Oral GABA uygulamasının HGH seviyesini arttırdığı bulunmuştur [47]. Tujioka vd. [48] beyindeki plazma büyüme hormonu konsantrasyonunu ve protein sentezi hızını bulmuşlardır. Bireyin fizyolojisine bağlı olarak, doğrudan GABA'nın beyne verilmesinin, büyüme hormonu üretimi üzerinde uyarıcı ve önleyici etkileri olduğu sonucuna varmışlardır. Bir başka çalışmada Inoue vd. [49] 12 hafta boyunca günlük 10 mg GABA tüketiminin hafif hipertansiyonu olan kişiler için etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca GABA içeren fermente sütün günlük alımının hafif hipertansif hastalarda kan basıncını kontrol etmeye yardımcı olacağını söylemişlerdir.

Kimura vd. [50] kendiliğinden hipertansif sıçanlarda GABA'nın antihipertansif özellikler üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Spontan hipertansif sıçanlarda tek oral uygulamadan 8 saat sonra (0.5 mg / kg) GABA'nın, sistolik kan basıncını önemli ölçüde azalttığı ve 24 saat sonra başlangıç değerlerine geri döndüğünü belirtmişlerdir. Bu çalışmalara ilaveten yapılan bir diğer araştırmada GABA

pirincinin 8 hafta boyunca günlük alımının zihinsel durumu ve uyku kalitesini artırdığı ve böylece insanlarda stresi azalttığı bulunmuştur [51]. Ayrıca, son zamanlarda Xie vd. [52] GABA'nın oksidatif stresi ve tiroid ve tiroid hormonlarının fonksiyonlarını geliştirdiğini ve kilo alımını azaltan ve GABA'yı obezitenin önleyicisi olarak önerdiğini göstermiştir. Tüm bu fizyolojik fonksiyonlar göz önüne alındığında insan ve hayvanlardaki etkileri Tablo 2.4'te verilmiştir.

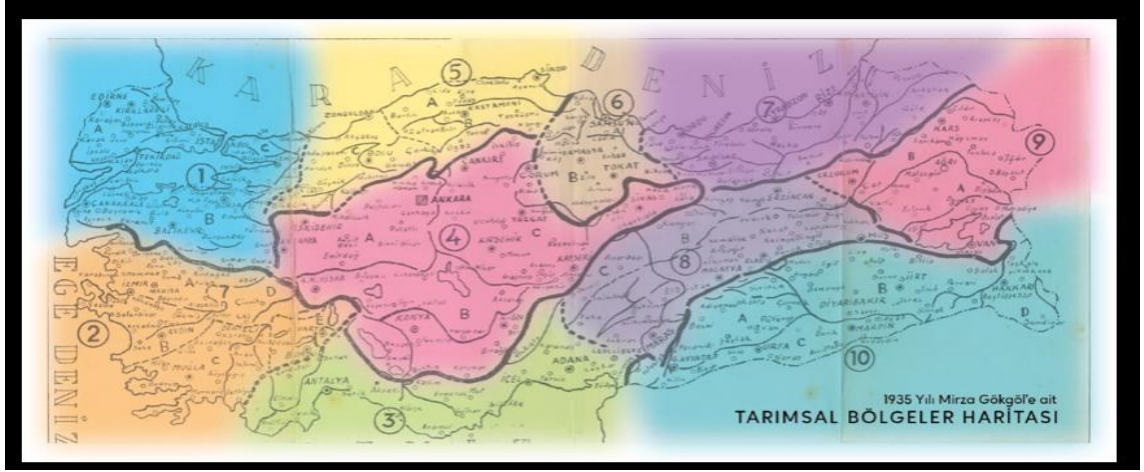
Tablo 2.4 İnsanlar ve hayvanlarda test edilen GABA'nın fizyolojik işlevi [36]

Fizyolojik işlevi	Spesifik özelliği
Nörotransmisyon	Nörotransmitter inhibisyonu
Kan basıncını düzenlemesi	Güçlü hipotansif ajan
Beyin rahatsızlığı	Nörolojik bozukluklar üzerine eylemi
Psikiyatrik rahatsızlık	Hafızayı geliştirir, Ruh bozukluğu üzerine etkisi, Rahatlatıcı etkisi, Uykusuzluk eylemi, Antidepresan, Alkolizmin önlenmesi ve tedavisi
Hayati Organlar	Kronik böbrek hastalığına etkisi, Karaciğer fonksiyonunu aktive eder, Görsel işlevi geliştirir, Beyindeki hız salgılama proteinini artırır,
Bağışıklık Sistemi	Bağışıklığı artırır
Kansere karşı koruyucu	Kanser hücrelerinin profilerasyonunu geciktirir ya da inhibe eder, Apoptoz kanser hücreleri üzerinde uyarıcı etki, Güçlü tümör baskılayıcı
Solunum hastalıkları	Astım kontrolü, Nefes alıp-verme kontrolü
Hormonal düzenleme	Büyüme hormonunu artırır, Progesteronun düzenlenmesi, Tiroid hormonunun düzenlenmesi, Obezitenin önlenmesi

2.3 Materyal ve Yöntem

2.3.1 Ekşi Hamur Örneklerinin Kaynakları

Çalışma kapsamında Anadolu'nun 6 farklı bölgesinden (Bozcaada, Kıbrıs/Lefkoşa, Manisa/Kırkağaç, Bilecik/Gölpazarı, Bursa/Osmangazi, Ankara/Pursaklar) ekşi hamur örnekleri toplanmış olup (Şekil 2.8), örnekler analizleri yapılana kadar buzdolabı koşullarında (4 °C) muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.8 Ekşi hamur örneklerinin toplandığı bölgeler

Anadolu'nun 6 farklı bölgesinden toplanan ekşi hamurların bölgeleri, un çeşidi Tablo 2.5'te gösterilmiştir.

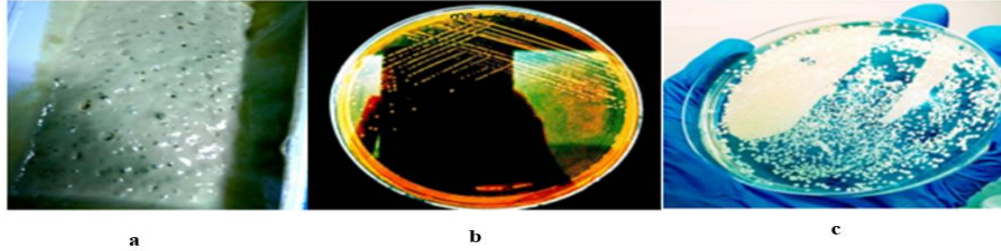
Tablo 2.5 Toplanan ekşi hamurlara ait bilgiler

Bölge	İl	Ekşi hamur kökeni	Fermantasyon Sıcaklığı (°C)	Un tipi	Un çeşidi
Marmara Bölgesi	Bursa/Osmangazi	Fırın	25	Durum buğdayı	Buğday unu
Ege Bölgesi	Manisa/Kırkağaç	Fırın	24	Karakılçık	Buğday unu
İç Anadolu bölgesi	Ankara/Pursaklar	Fırın	21	Tandırılık	Buğday unu
Kuzey Kıbrıs	Lefkoşa	Ev yapımı	25	Tip 550	Buğday unu
Marmara Bölgesi	Bilecik/Gölpazarı	Ev yapımı	24	Göynük/Taraklı un	Buğday unu
Bozcaada	Bozcaada	Ev yapımı	25	Tam buğday	Tam Buğday

2.3.2 Mikrobiyolojik Analiz

Mikrobiyolojik analizler için ekşi hamur örneklerinden 10 g alınarak 90 mL fizyolojik tuzlu su (FTS) (%0.8 g/L) içerisinde stomacherde homojenize edilmiştir ve 1/10'luk dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra homojenize hale getirilen örneklerden 1 mL alınarak içinde 9 mL FTS bulunan tüpe aktarılmıştır ve bu şekilde seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir mikroorganizmanın sayımı için uygun dilüsyonlardan uygun besiyerlerine uygun metot ile ekim yapılmıştır. Kullanılan besiyerleri Tryptic Soy Agar (TSA), De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS), M17 Agar, Potato Dextrose Agar (PDA) olmaktadır. 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} dilüsyonlardan

yayma yöntemiyle ekimler paralelli yapılmış olup, laktik asit bakterileri için; MRS, M17 ve TSA agar petri plakaları 37 °C'de 24-48 h inkübasyona bırakılmıştır. Mayalar ise, PDA agara yayma yöntemiyle ekim yapılmış olup, 30 °C'de 48-72 h inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada kullanılan bir ekşi hamur, izole edilen bakteri ve mayanın görüntüsü Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.9 a) Ekşi hamur, b) İzole edilen ve saflaştırılan bakteri, c) maya görüntüsü

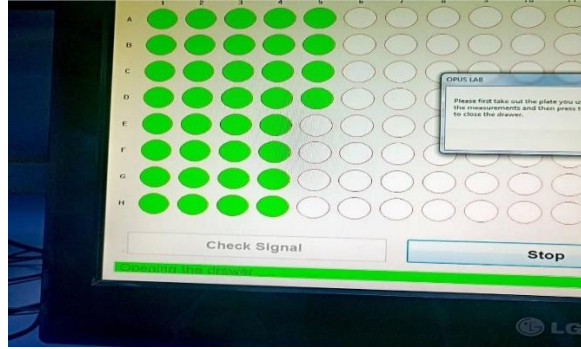
2.3.3 Laktik asit bakterileri ve Mayaların İzolasyonu

Laktobasillerin izolasyonu için MRS agar, geliştirilmesi için MRS sıvı besiyeri, Laktokokların izolasyonu için M17 agar, geliştirilmesi için M17 sıvı besiyeri, genel bakteri izolasyonu için TSA agar, geliştirilmesi için TSB sıvı besiyeri kullanılmıştır. Mayaların izolasyonu için ise PDB sıvı besiyeri kullanılmıştır. Laktik asit bakterilerinin izolasyonundan sonra ön tanımlama için FTIR tanımlama, fenotipik tanımlama ve katalaz testi kullanılmıştır. Daha sonra *gad* geni ve RAPD-PCR aşamalarına geçilerek 16s bölgelerinin belirlenmesi için genotipik tanımlama gerçekleştirilmiştir. *Gad* geni pozitif ve basil olan bakteriler sekans sonucu değerlendirildikten sonra GABA üretim miktarı yüksek olan iki suş yoğurt üretiminde yardımcı kültür, bozada ise starter kültür olarak kullanılarak üretimleri gerçekleştirilmiştir.

2.3.4 Ekşi Hamur İzolatlarının FT-IR ile Tanımlanıp Seçiminin Yapılması

Ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'ler MRS agarda platin uçlu öze yardımıyla çizimi gerçekleştirildikten sonra APT Agar'da (Allpurpose Tween Agar) 34 °C'de 24 h anaerobik koşullarda gelişime bırakılmıştır. Maya izolatları ise, PDA agarda çizimi yapıldıktan sonra saf düşen koloni alınıp, YGC agarda yayımı yapıldıktan sonra (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar) 30 °C'de 24 h inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilerden 1 öze dolusu alınarak, 100 µL steril saf su içerisinde çözündürülmüştür. Kızılötesi geçirgen ZnSe taşıyıcısına (çapı 25

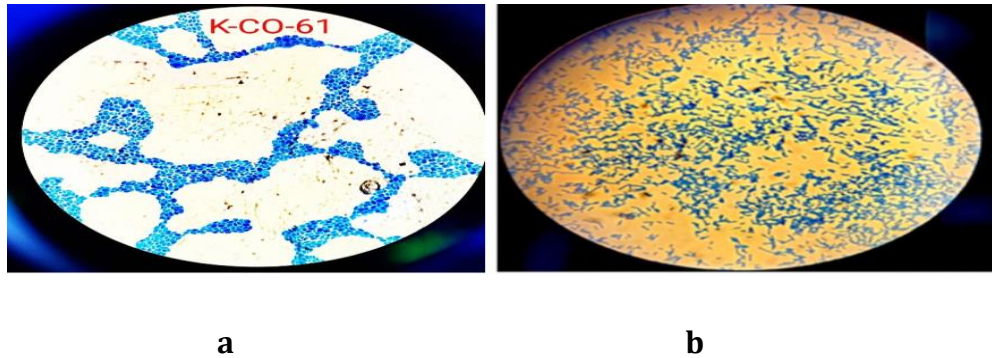
mm) çözündürülen koloninin 25 µL'si aktarıldıktan sonra 40°C'de 45 dk kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra FTIR cihazında koloniler 4000–400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında okumaya bırakılmıştır (Şekil 2.10). FTIR spektrumları için, mikropilaka okuyucu HTS-XT modülüne sahip FTIR spektrometresi kullanılmıştır. Bu sınıflandırma işleminde LAB'de Ward's algoritması ve birincil türev, mayalarda Ward's algoritması ve ikincil türev birlikteliğinden yararlanılmıştır. İzolatların spektrumları OPUS yazılımı kullanılarak işlenmiştir.



Şekil 2.10 Bakteri ve mayaların FT-IR okuması

2.3.5 LAB'ler İçin Fenotipik Tanımlama (Basit Boyama) Metodu

Katı agar üzerine çizilen bakteriler öze yardımıyla 20 µL steril saf su içeren ependorf tüplerin içerisine alınıp, homojen hale getirilmiştir. Daha sonra lam üzerine 20 µL damlatılarak alevde fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kuruması gerçekleşen bakterilere metilen mavisi damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir. Ardından boya saf su ile uzaklaştırılarak, lamın kuruması gerçekleştirilmiştir. Son olarak immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta gözlemlenmiştir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 a) İzole edilen maya, b) İzole edilen ve saflaştırılan bakteri mikroskop görüntüsü

2.3.6 Katalaz Testi

Katı agardan öze ucuyla alınan bakterileri lamin üzerindeki katalaz ile karıştırılarak pozitif olanların baloncuk oluşturduğu, katalaz (-) olanların oluşturmadığı gözlemlenmiştir.

2.3.7 Genotipik Olarak LAB ve Mayaların Tanımlanması

2.3.8 DNA Ekstraksiyonu

Sıvı kültür ortamında bir gece geliştirilmiş kültürden ependorf tüpü içerisine 1 mL alınarak 10 dak 7000xg de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüpteki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bir araya toplanan hücrelerin üzerine 450 µL TE (Tris EDTA) tamponundan ilave edilip hafif bir karıştırma ile hücrelerin tampon içerisinde süspanse olması sağlanmıştır. Süspanse edilen hücrelere 50 µL %10 luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 2 µL Proteinaz K ilave edilip, 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 0.5 mL fenol:kloroform:isoamil alkol (25:24:1) karışımından ilave edilip, 5 dak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İçerik 4°C'de 10 dakika 7000xg de santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel otomatik pipet kullanılarak toplanıp yeni bir tüpe aktarılmıştır. İşlem fenol-kloroform-isoamil alkol karışımı ile bir kez daha tekrarlanıp oluşan süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel yeni bir tüpte toplanmıştır. 5M'lık sodyum asetattan 50 µL içeriğe ilave edilmiştir. İçeriğe 1 mL izopropanol ilave edilerek çöken DNA'nın beyaz iplikçikleri oluşana kadar ters-düz edilerek hafifçe karıştırılmıştır. İçerik 3000xg de 10 dak santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp, elde edilen pellet üzerine 0,5 mL %70 lik etanol ilave edilip hafif karıştırıldıktan sonra içerik 3000g de 10 dak santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan etanolü uzaklaştırmak için içerik 37°C'de 5-10 dak bekletilip, ardından elde edilen DNA 100 µL distile su ilave edilerek süspanse edilmiştir [53].

2.3.9 Glutamik Asit Dekarboksilaz (*gad*) Gen Bölgesinin Belirlenmesi

Fenotipik tanımlama ile basil ve katalaz (-) olan bakteriler seçilerek *gad* genleri PCR yardımıyla belirlenmiştir. Örneklerdeki *gad* geninin moleküler tespiti için, *gad* geninin yüksek oranda korunan bölgelerinden tasarlanan CoreF (5'-CCTCGAGAAGCCGATCGCTTAGTTCG-3') ve CoreR (5'-TCATATTGACCGGTATAA

GTGATGCCC-3') primerleri kullanılmıştır [54]. Her PCR karışımı için; 5X PCR buffer for Taq polymerase (Promega), 2.5 mM dNTP'den (Bioline), 1.5 U Taq polymerase (Promega) ve CoreF ve CoreR primerlerinden 20 mM kullanılmıştır. PCR koşulları için Tablo 2.6'daki döngü kullanılmıştır. PCR ürünleri %1,6 (w/v) agaroz jelde 1.5 saat boyunca 100 V'da elektroforez ile yürütüldükten sonra, yaklaşık 600 bp amplikon boyutunda pozitif olan suşlar kabul edilmiştir [55].

Tablo 2.6 *Gad* geninin amplifikasyonu için oluşturulan PCR şartları [55]

Denatürasyon	95°C 2 dak	1 döngü
Denatürasyon	95°C 30 s	
Bağlanma	60°C 20 s	20 döngü
Uzama	72°C 30 s	
Son uzama	72°C 5 dak	

2.3.10 RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) ile Genotipik Ayırımın Gerçekleştirilmesi

Tür içi ayırımları sağlayabilmek adına RAPD PCR işlemi uygulanmıştır. Amplifikasyon M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') primerleri kullanılarak yapılmıştır. Döngü koşulları; 94°C 5 dak, 94°C 1 dak, 45°C de 20 sn, 72°C 2 dak, 72°C 5 dak olmaktadır. PCR ürünleri %1 (w/v) agaroz jelde yaklaşık 2 saat boyunca 100 V'da elektroforez ile yürütülmüştür. Yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında görüntü alınmıştır.

2.3.11 Bakterilerin 16s rRNA bölgesi ile Mayaların 26s Gen Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu

16S rRNA geninin tespiti amacıyla PCR işlemi için DG74 (5'-GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG-3') ve PEU7 (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3') primerleri ile 26s gen bölgesi için ise NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG-3') ve NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primerleri kullanılmıştır. PCR reaksiyon karışımı için; 5X PCR buffer 10 µL, dNTPs 0.4 µL, 20 mM belirtilen primerlerinden 1 µL, 5U polymerase 0.25 µL ve son hacim 50 µL olacak şekilde steril saf su kullanılmıştır [55]. PCR koşulları için Tablo 2.7'deki döngü kullanılmıştır. PCR ürünleri %1 (w/v) agaroz jelde yaklaşık 2 saat boyunca 100 V'da elektroforez ile

yürütülmüştür. 1500 bp amplikon boyutunda pozitif olan bakteri suşlarını ve yaklaşık 540 bp amplikon boyutunda pozitif çıkan maya suşlarını tanımlanmak için sekans analizine gönderilmiştir. Sekans işleminin ardından sonuçlar BLAST (<http://goo.gl/lohXcq>) veya Ribosomal database project (<http://goo.gl/80ILPU>) veritabanlarında mevcut türler ile karşılaştırılarak ilgili izolatların hangi türe ait olduğu bulunmuştur.

Tablo 2.7 16s rRNA ile 26s amplifikasyonu için oluşturulan PCR şartları

Denatürasyon	94°C 5 dak	1 döngü	NL-1 ile NL-4 primerleri
Denatürasyon	94°C 30 s		
Bağlanma	55°C 30 s	30 döngü	
Uzama	72°C 30 s		
Son uzama	72°C 7 dak		PEU-7 ile DG-74 primerleri
Denatürasyon	94°C 5 dak	1 döngü	
Denatürasyon	94°C 15 s		
Bağlanma	52°C 30 s	30 döngü	
Uzama	72°C 120 s		
Son uzama	72°C 5 dak		

Ekşi hamurlardan izole edilen LAB'ler sekans sonucu tanımlandıktan sonra, GABA üretim miktarlarının ön taraması HPLC analizi ile belirlenmiştir. *Gad* geni pozitif çıkan, basil ve katalaz (-) olan ve tanımlanması yapılan LAB'ler 53 mM monosodyum glutamat (MSG) içeren MRS sıvı besiyerinde geliştirilmiş olup, GABA üretim miktarları en yüksek suş bulunmaya çalışılmıştır. Bunların arasında en yüksek GABA üretim miktarına KCO-48 *L. brevis* ATCC 14869 ve 45MK-30 *L. plantarum* JCM 1149 suşlarının ulaştığı kaydedilmiştir ve bu iki suş arasından KCO-48 *L. brevis* ATCC 14869 seçilip, yüksek GABA verimliliğini sağlamak için ortam koşulları optimize edilmiştir.

2.3.12 Yüksek GABA Üreticisine Sahip *Levilactobacillus brevis* ATCC 14869 Suşunun Ortam Koşullarının Optimize Edilmesi

2.3.13 Bakterinin Büyüme Koşulu

Gad geni pozitif ve sekans sonucu KCO-48 *L. brevis* ATCC 14869 olduğu belirlenen suşun GABA üretim koşulunun optimizasyonu için -80 °C'deki stoktan alınmıştır ve MRS sıvı besiyerinde iki defa ön aktifleştirme yapıldıktan sonra optimizasyonda belirtilen şartlardaki MSG içeren sıvı besiyerlerine %1 olacak şekilde inokulasyonu yapılmıştır.

2.3.14 Box Behnken Deneme Dizaynı ile Optimizasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada maksimum GABA verimini elde etmek için 4 faktörlü 27 deneme sayısını içeren Box-Behnken Deney Dizaynı kullanılmıştır. Bunun için bağımsız değişkenler olarak; sıcaklık (X_1), monosodyum glutamat (X_2), pH (X_3) ve inkubasyon zamanı (X_4) seçilmiştir. Model parametrelerinde single faktör dizaynı kullanılmış olup, parametre aralıkları belirlenmiştir ve Tablo 2.8'de verilmiştir.

Tablo 2.8 Box-Behnken Deneme Dizaynı için deneme şartları

Faktörler	Seviye		
	Düşük (-1)	Orta (0)	Yüksek (+1)
X_1 : sıcaklık (°C)	30	35	40
X_2 : monosodyum glutamat (mM)	50	225	400
X_3 : pH	4.50	5.75	7.00
X_4 : İnkübasyon zamanı (h)	24	48	72

2.3.15 GABA Üretim Miktarlarının Belirlenmesi İçin Türevlendirilmenin Yapılması

Reaksiyon miksi 1.5 mL ependorf tüplerinde; 100 µL örnek, 100 µL dansil klorid solüsyonu ve 800 µL 0.2 M Sodyum borat: NaOH çözeltisi (pH 9.0) içerecek şekilde son hacim 1000 µL olarak hazırlanmıştır. Daha sonra miks ultrasonik banyoda 40 °C'de 30 dak inkübasyona tabi tutulmuştur. Ardından süpernatantlar 12 000 rpm'de

10 dakika santrifüjlenerek toplandıktan sonra MeOH (1:1) ile seyreltilip, HPLC aşamasında kullanılmıştır [56].

2.3.16 GABA Üretim Miktarlarının HPLC Analizi ile Belirlenmesi

Türevlendirilen örnekler, flurometrik detektörde 293 nm dalga boyuna sahip yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC-RID, Shimadzu) sistemine enjekte edilmiştir. Ayrışma 25 °C sıcaklığındaki inertsil ODS (GL Sciences, 3.5 um, 4.6 x 250 mm) kolon ile sağlanmıştır. Mobil faz olarak pH 4.1 Asetat/CH₃CN (Solvent A:6.25 mL CH₃COOH, 1.97 g CH₃COONa, 200 mL CH₃CN alınıp, 1 litre su ile dolduruldu) ve asetonitril (Solvent B) hazırlanarak %50 solvent B kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 mL/min olacak şekilde ayarlanmıştır [56]. Örneklerde bulunan GABA konsantrasyonlarını belirlemek için, farklı konsantrasyonlarda (0.01-0.1-0.25-0.50-1.0 mg/mL) hazırlanan standartlar kullanılarak test edilmiştir. GABA standart eğrisinin regrasyon katsayısı R², 0.99 olmuştur.

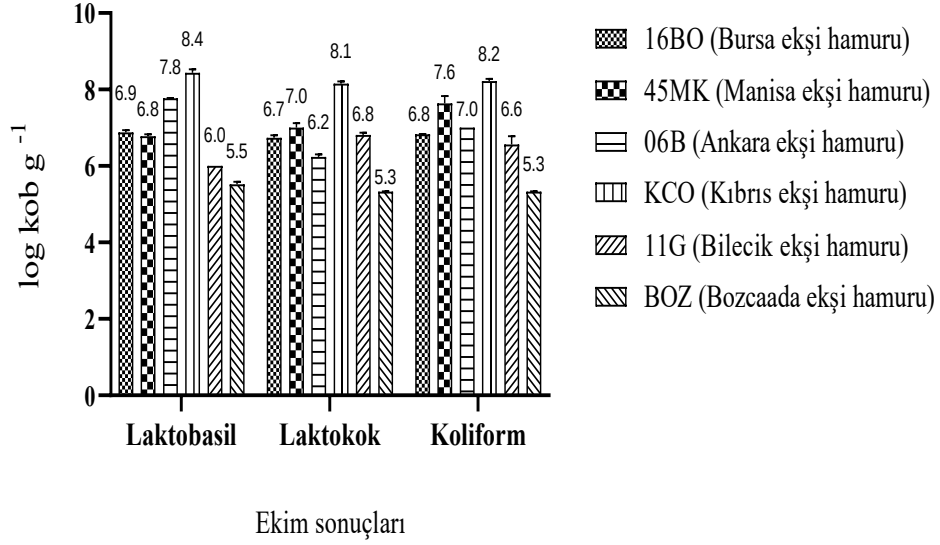
2.3.17 İstatistiksel Analiz

RSM çalışması ise Box-Behnken deney tasarımı kullanılmıştır. Çalışmadaki optimizasyon çalışması için Design Expert TM program kullanılmıştır. Programda verilerimiz istatistiksel olarak otomatik şekilde verilmiştir. Optimizasyon çalışması dışında kalan analizler için ise One Way Anova için JMP 9.0 programı istatistiksel analiz yazılımı (SAS Institute, Inc., Cary, ABD) kullanılmıştır.

2.4 Araştırma Bulguları ve Tartışma

2.4.1 Ekşi Hamurdan İzole Edilen LAB ve Mayaların Mikrobiyolojik Sayım Sonuçları

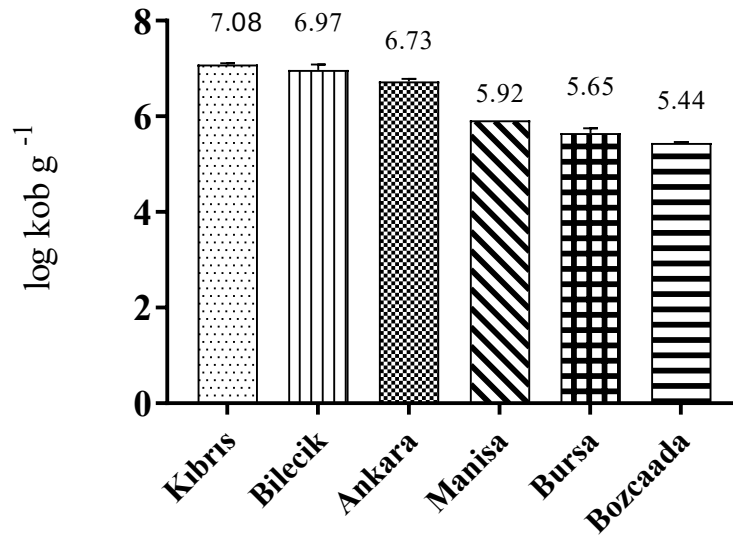
Ekşi Hamur örneklerine ait laktik asit bakterilerinin mikrobiyolojik sayımları Şekil 2.12’de gösterilmiştir. Laktobasil sayımına en az ulaşan ilin Bozcaada olduğu (5.52 ± 0.07), onu sırasıyla Bilecik/Gölpazarı (6.00 ± 0.00), Manisa/Kırkağaç (6.78 ± 0.05), Bursa/Osmangazi (6.88 ± 0.06) illerinin takip ettiği görülmüştür. Laktobasil, laktokok ve koliform grubu bakterileri sayım sonuçlarının iller arasında benzer olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak en yüksek bakteri sayımına Kıbrıs/Lefkoşa bölgesinin (8.44 ± 0.09) ulaştığı görülürken, en az ise Bozcaada bölgesinin ulaştığı söylenebilir. Ayrıca bölgeler arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılığın olduğu (p<0.05) kaydedilmiştir.



Şekil 2.12 Ekşi hamur örneklerine ait LAB sayım (log kob/g) sonuçları

Ekşi hamur fermentasyonu, fermentasyonun ilk aşamasında hızlı asitleşen LAB'nin baskın olması ve daha sonra tipik ekşi hamur LAB'nin yaygın olması ve LAB'nin fermentasyonun son aşamasında ekşi hamura adapte olup, baskın duruma geçtiği dinamik bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır [57].

Syrokou vd. [57] yapmış oldukları çalışmada Yunan buğday ekşi hamurlarındaki LAB ekim sonuçlarının 6.28-9.20 log kob /g, maya sayımlarının ise 4.60-6.32 log kob /g arasında olduğunu belirtmişlerdir. Bir başka çalışma ise Fraberger vd. [58] tarafından yapılmıştır. Çalışmalarında Avusturya ekşi hamurlarındaki LAB sayımının 5.00-9.59 log kob / g olduğunu kaydetmişlerdir. MRS agarda sayılan LAB sonuçlarının M17 agarda sayılan LAB sonuçlarından biraz yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca maya sayımının (5.00-7.90) LAB sayımına göre düşük olduğu belirtilmiştir. Sonuçlarımız benzerlik göstermiş olup, çalışmamızda LAB koloni sayımının bölgeler arasında farklı olduğu belirlenmiştir. Ekşi hamur ekosisteminin bazı parametrelerden etkilendiği vurgulanmıştır. Bu parametrelerin başında kullanılan un çeşidi, ekşi maya inokulum yüzdesi, pH, fermentasyon süresi, fermentasyon sıcaklığı ve günlük tazeleme sayısı gelmekte olup, ekşi hamurdaki mikrobiyal çeşitliliği belirleyen faktörler olmaktadır [57].



Ekşi hamur örnekleri

Şekil 2.13 6 farklı bölgeden toplanan ekşi hamurdan izole edilen mayanın hücresel yoğunluğu (log kob /g)

6 farklı yerden toplanan ekşi hamurların maya sonuçları Şekil 2.13’de gösterilmiştir. Ekşi hamur örneklerinden toplam 62 maya izolatu elde edilmiş ve bunlardan 14’ü çalışmamızda kullanılmıştır. Belirtilen bölgelerden toplanan ekşi maya örneklerinin maya sayılarında önemli bir farklılık olduğu ($p < 0.05$) görülmüştür. Bu değişiklik $5.44^D - 7.08^A$ (log CFU/g) arasında meydana gelmiştir. Arıcı vd. [59] geleneksel Türk ekşi hamur örneklerinden maya suşları izole etmiş ve ekşi hamurdaki maya sayılarını 3.78 ile 6.28 (log CFU / g) arasında bulmuştur. Başka bir çalışmada Petkova vd. [60] 12 Bulgar ekşi hamurundan toplam 106 maya izole etmiş ve maya sayısının 1.4×10^4 ile 9.7×10^9 arasında değiştiğini kaydetmiştir. Sonuçlarımız paraleldir. Bu çeşitlilik un ve su türü, ortam, sıcaklık, fermentasyon süresi gibi faktörlere bağlı olabilir [61].

Ayrıca bazı ekşi hamurların stabilitesi, belirli maya türleri ile LAB arasındaki işbirliğe bağlı olurken, fırınlarda maya kullanıldığı zaman çoğu ekşi hamurda *S. cerevisiae*’nin (fırıncı mayası) varlığı, fırın çevresine bağlanabilir. Ek olarak fırın ekşi hamurlarında genellikle *W. anomalus*, *Kazachstania barnettii*, *Kazachstania unispora* ve *T. delbrueckii* maya suşlarını içerirken, geri besleme yapan laboratuvar ekşi

hamur fermentasyonlarında *W. anomalus*, *Candida glabrata* ve *S. cerevisiae* suşları ortama hakim olduğu yapılan araştırmalarda belirtilmiştir [62].

2.4.2 LAB'lerin *gad* Gen Bölgelerinin Belirlenmesi ve RAPD-PCR Tekniği İle Türler Arasında Ayırımın Gerçekleştirilmesi

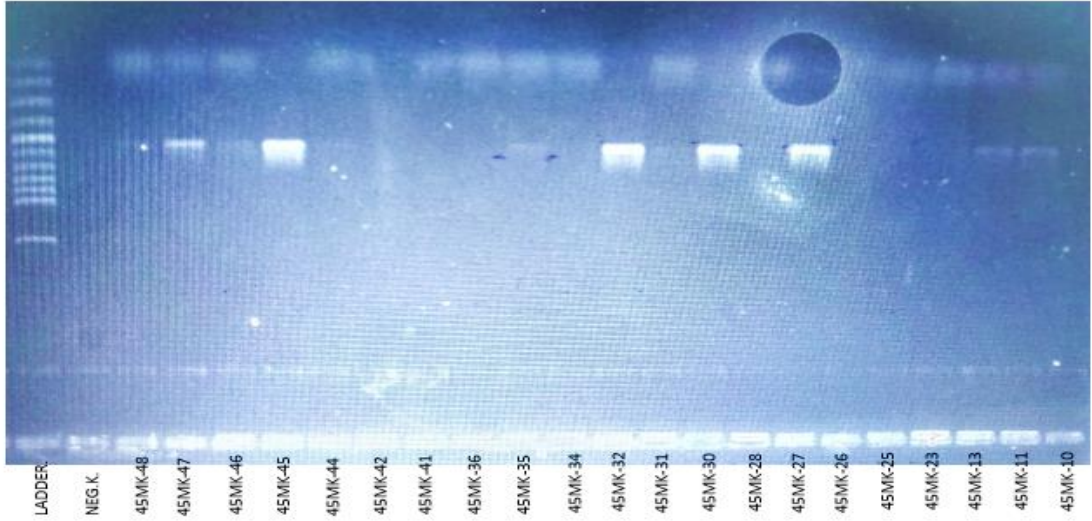
GABA'nın mikroorganizmalar tarafından biyosentezi, *gad* enzimi (*gadA* veya *gadB* tarafından kodlanır) ve glutamat / GABA antiporter GadC'den oluşan glutamik asit dekarboksilaz (*GAD*, EC 4.1.1.15) sistemi tarafından gerçekleştirilmektedir [63-66]. Glutamik asit dekarboksilaz enziminin, asit direnç mekanizmasında ve az sayıda bakterinin asit direncinde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur. Hücre düşük pH'ye maruz kaldığında, *gad* sistemi, bir yandan hücre içi protonu tüketirken, diğer yandan hücre dışı glutamat molekülünü hücre dışı GABA'ya dönüştürmektedir. Net etkisi ise hücre içindeki proton konsantrasyonunu azaltarak sitoplazmanın asiditesini tersine çevirmesidir [36].

6 farklı bölgeden toplamda 253 laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Bu izolatlar arasında *gad* gen bölgesi pozitif çıkan suşlar Tablo 2.9'da verilmiştir. Bursa bölgelerindeki ekşi hamur izolatlarının hiçbirinde *gad* gen bölgesi belirlenememiştir. Ayrıca Bozcaada bölgesinde *gad* geni pozitif çıkan suşların basil olmadığı görülmüştür. Çoğunluğu *gad* geni pozitif olan bölgenin Kıbrıs olduğu gözlemlenmiştir.

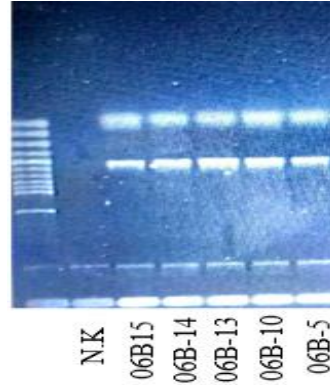
Tablo 2.9 *Gad* gen bölgesi belirlenen izolat sayısı ve pozitif çıkma durumu

Bölge	Toplam LAB izolat sayısı	İzolat Sayısı	Pozitif çıkan ve basil
45MK (Manisa /Kırkağaç)	44	11	6
06B (Ankara/Pursaklar)	28	5	5
KCO (Kıbrıs/Lefkoşa)	58	16	16
11G (Bilecik/Gölyazı)	41	20	10
BOZ (Bozcaada)	31	7	-
16BO (Bursa/Osmangazi)	51	-	-

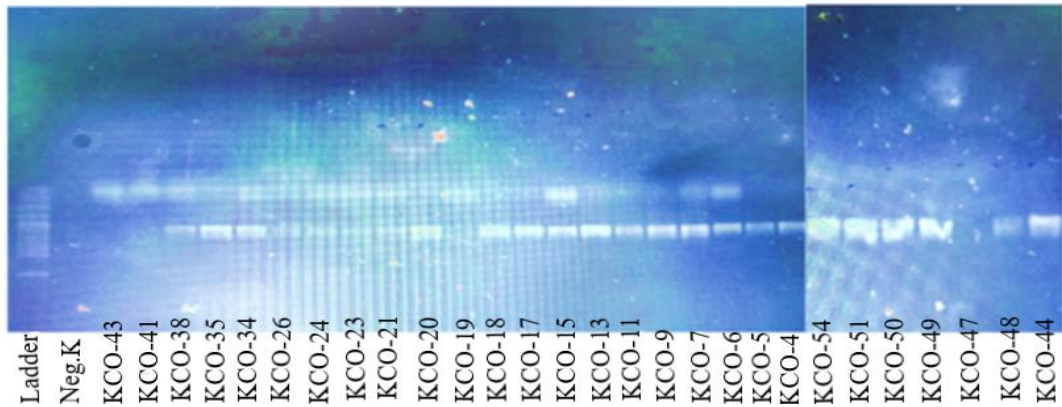
Core F ve Core R primerleri kullanarak ampikon boyutunun yaklaşık 570 bp (baz çifti) olarak belirlenmiş izolatların jel görüntüleri Şekil 2.14-2.18'de verilmiştir.



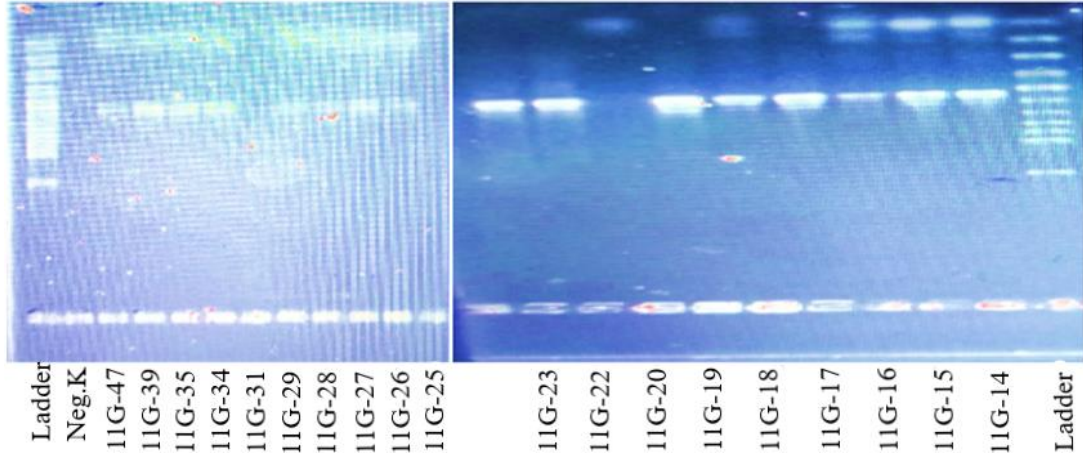
Şekil 2.14 Manisa bölgesine ait ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin *gad* gen bölgelerine ait jel görüntüsü



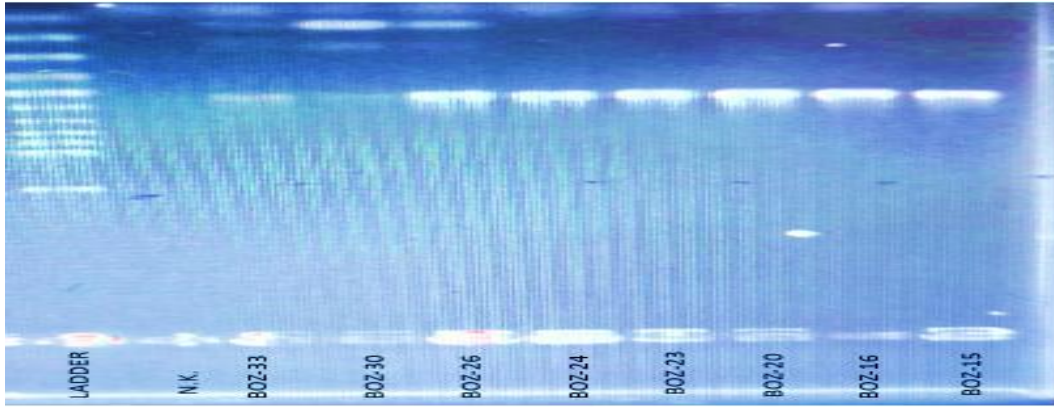
Şekil 2.15 Ankara bölgesine ait ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin *gad* gen bölgelerine ait jel görüntüsü



Şekil 2.16 Kıbrıs bölgesine ait ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin *gad* gen bölgelerine ait jel görüntüsü



Şekil 2.17 Bilecik bölgesine ait ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin *gad* gen bölgelerine ait jel görüntüsü



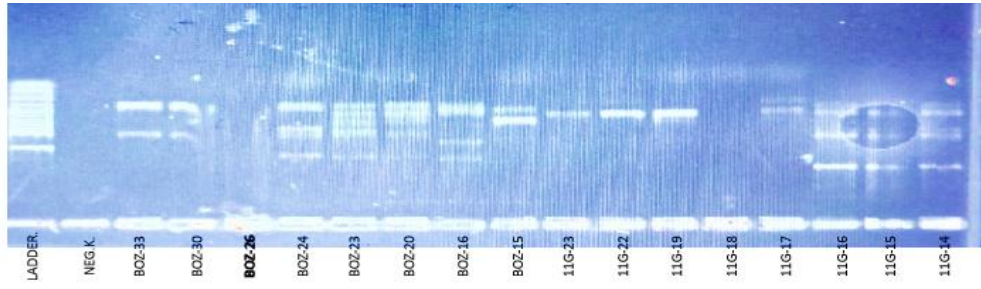
Şekil 2.18 Bozcaada bölgesine ait ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerin *gad* gen bölgelerine ait jel görüntüsü

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması, belirli ekşi hamur ekosistemlerinin çeşitli çalışma sonuçlarından biri olmaktadır. Bu çalışmaların genel yaklaşımı, rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD) veya tam hücre protein elektroforezi gibi hızlı parmak izi metodolojisi kullanılarak farklı koloni tiplerinin izolasyonu ve saflaştırılması ve genotipik veya fenotipik çeşitliliğin taranmasına dayanır. Anormal profile sahip suşların filogenetik konumlarını belirlemek için ise 16S rRNA gen dizisi analizi yapılır [67]. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda da LAB için çeşitli düzeylerde ayırım gücü sergileyen çeşitli moleküler yöntemlerin içerisinde yer alan 16S rRNA gen dizileme ve rastgele amplifiye (RAPD-PCR) analizlerinin ekşi hamur LAB'lerinin daha güvenilir bir şekilde tanımlanması için kullanıldığı görülmüştür [68]. Çalışmamızda M13 primerinin kullanılması ile *gad* geni pozitif çıkan suşlar

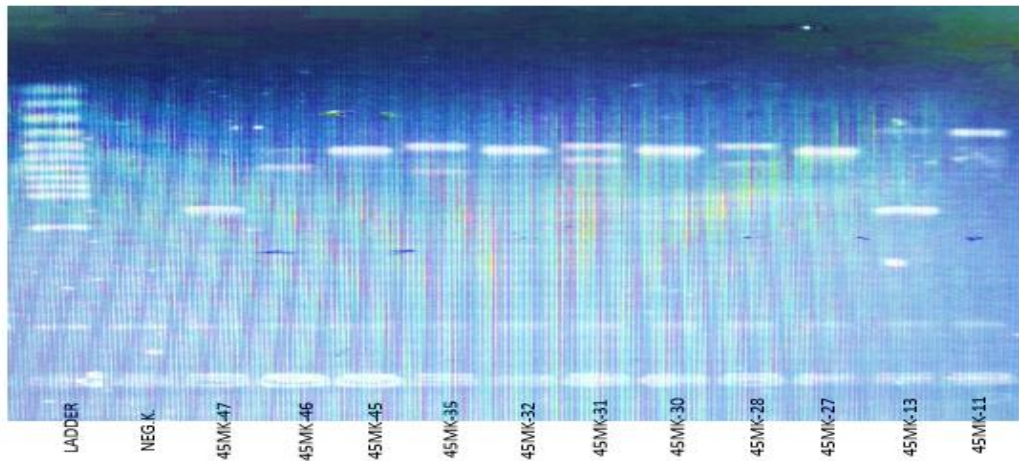
arasında ayırımın sağlanması için RAPD-PCR analizi uygulanmış olup, jel görüntüleri Şekil 2.19-2.22’de verilmiştir.



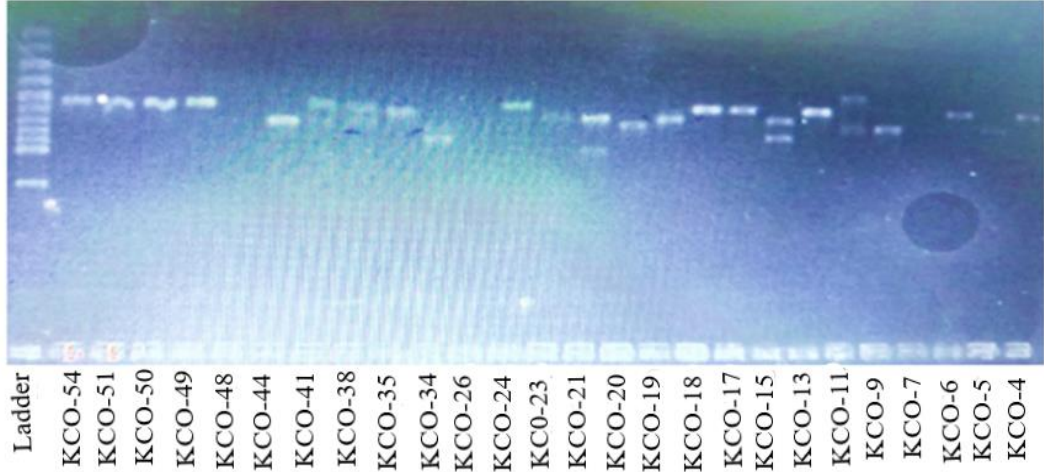
Şekil 2.19 *Gad* geni pozitif çıkan suşlara ait RAPD-PCR jel görüntüsü



Şekil 2.20 *Gad* geni pozitif çıkan Bilecik ve Bozcaada suşlarına ait RAPD-PCR jel görüntüsü



Şekil 2.21 *Gad* geni pozitif çıkan Manisa bölgesi suşlarına ait RAPD-PCR jel görüntüsü



Şekil 2.22 *Gad* geni pozitif çıkan Kıbrıs bölgesi suşlarına ait RAPD-PCR jel görüntüsü

2.4.3 FT-IR (Fourier-Transform Kızılötesi Spektroskopi) ve PCR Tekniği Kullanılarak LAB Tanımlanması

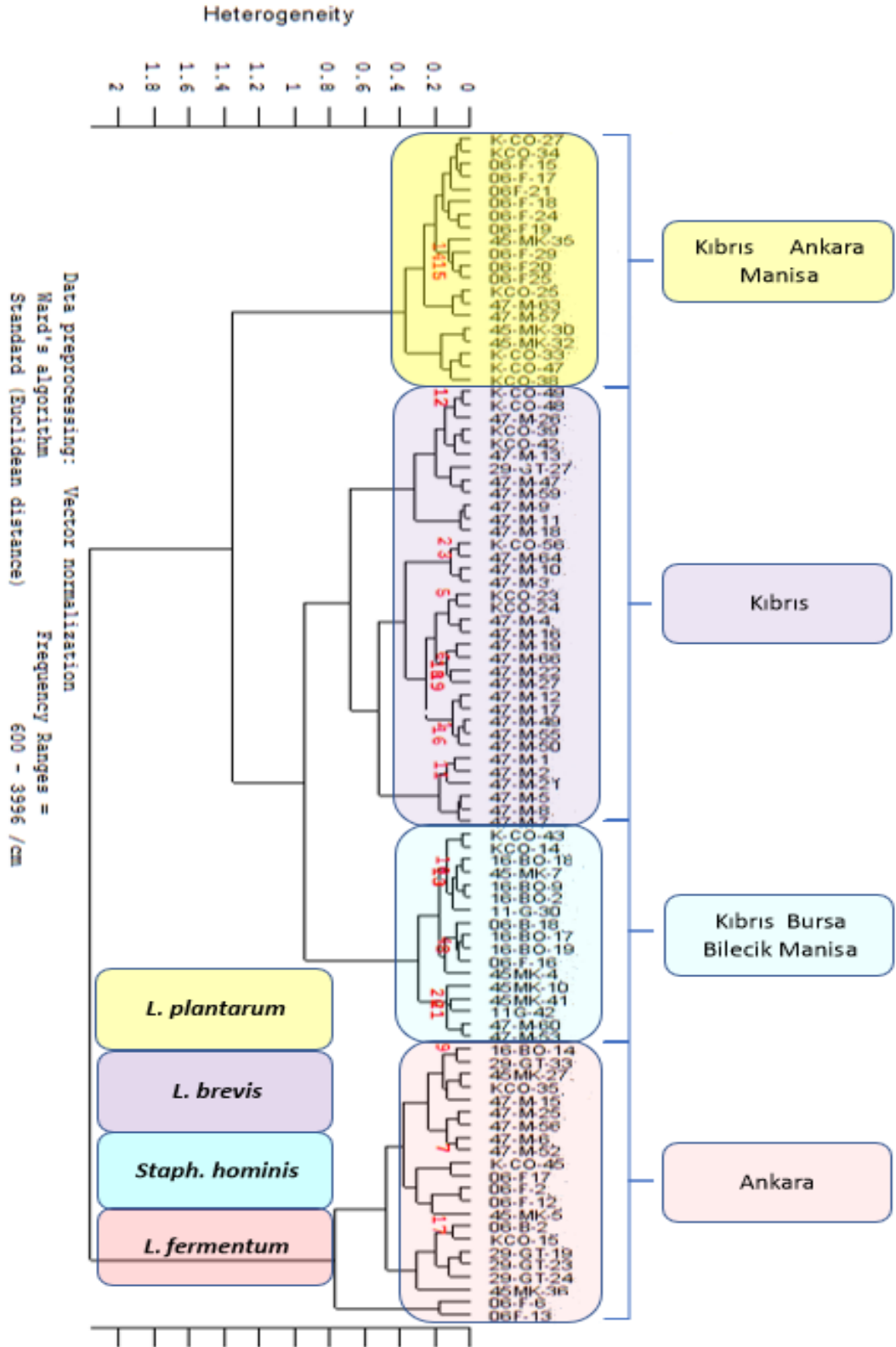
Mikroorganizmaların tanımlanması için genellikle son yıllarda genotipik yaklaşımlar kullanılmaya başlanmıştır. Bu yaklaşımlar yaygın olarak kabul edilmesine rağmen, protokol karmaşıklığı, reaktif maliyeti, her tür için spesifik primerin seçimi ve mutasyona karşı duyarlı olması gibi parametrelerden dolayı bazı teknik sınırlamalara sahiptir ve bu yüzden rutin olarak kullanılmamıştır. Oldukça emek ve yoğun bir çalışma gerektiren bu süreçleri değiştirmek için en ideal yöntem; minimum örnek gerektiren, örnekleri doğru analiz eden (reaktif gerektirmeyen), hızlı olan ve nispeten düşük maliyet gerektiren yöntemler olmaktadır. Bunlardan biri de FT-IR tekniğidir. FT-IR, bir moleküldeki kimyasal bağ türlerini belirlemek için eski ve güçlü bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. FT-IR spektroskopisinin güçlü yönlerinden biri, analitik bir teknik olarak, çok çeşitli farklı bileşiklerden spektrum elde etme yeteneği olmaktadır [69]. FTIR tekniğinin, çeşitli kalite kontrol alanlarında, filamentli küf ve mayaların tanımlanmasında başarıyla uygulandığı kaydedilmiştir. Ayrıca mikrobiyolojik FT-IR tiplemesi, hızlı, etkili ve reaktifsiz ve az miktarda biyokütle gerektirdiğinden dolayı tüm mikroorganizmalara uygulanabilir [69].

FT-IR spektroskopisinin biyomedikal alandaki uygulamaları, özellikle mikroorganizmaların tanımlanmasında giderek daha ilgi çekici hale gelmiştir. Bu

yaklaşım, yalnızca cins ve tür düzeyinde tanımlama için değil aynı zamanda aynı tür içinde suş ayrımı için de yüksek bir potansiyel gösterir [70].

Mikroorganizmaları tanımlamak için FT-IR mikrospektroskopisi kullanılmıştır. Bu teknik, özellikle mikrobiyolojik alanda LAB'yi karakterize etmek için kullanılır.

Bu çalışmada, ekşi hamur örneklerinde LAB ve maya biyo-çeşitliliğinin hızlı bir şekilde tanımlanması sağlanmıştır. HTS-XT modülünde hem 16S-rDNA gen dizilimi hem de FT-IR spektroskopisi sayesinde LAB tanımlaması gerçekleştirilmiştir. FT-IR cluster ağacı Şekil 2.23'de gösterilmiştir. FTIR analizinin kemometrik tekniklerle bakteri ve mayaları tanımlamak için güvenilir bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Türkiye'nin 6 farklı bölgesinden getirilen ekşi hamur LAB izolatlarına FTIR analizi uygulanmıştır (Şekil 2.23). 1500–1200 cm⁻¹, 1200–900 cm⁻¹, 900–700 cm⁻¹ spektral bölgelerinde yer alan elde edilen spektrumların ilk türevleri, daha önce çalışılmış olan *Lactobacillus* türlerinin spektrumlarını ayırt etmek için kullanılmıştır.

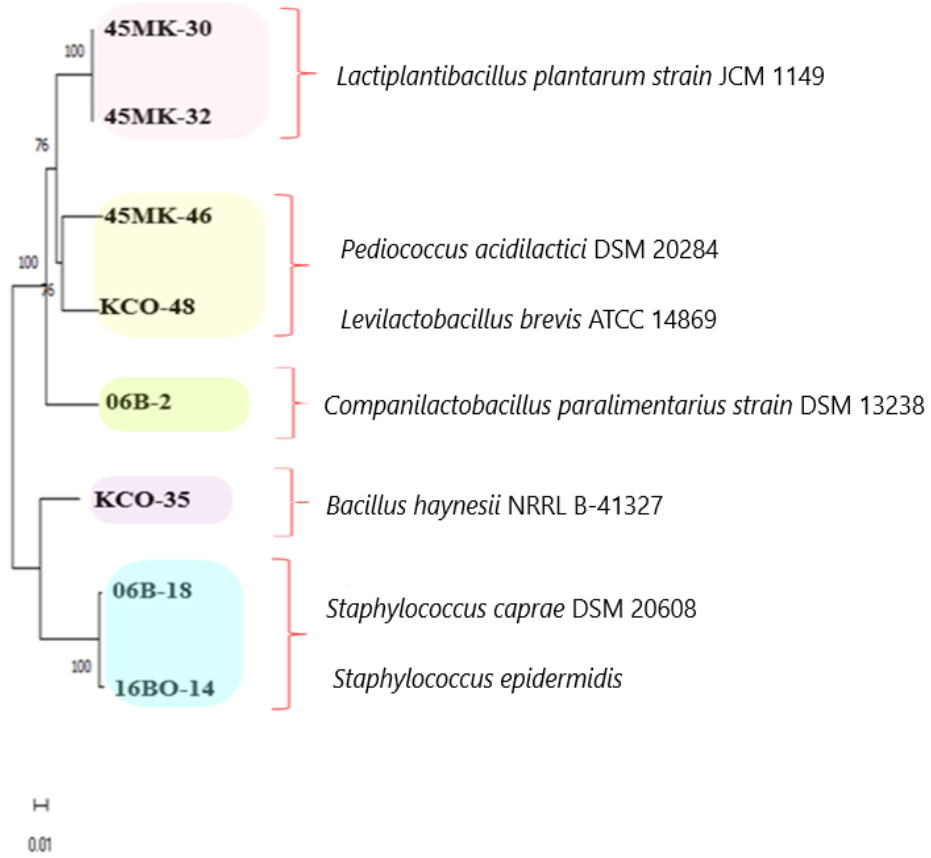


Şekil 2.23 Tüm bölgelerdeki ekşi hamur LAB izolatlarının FT-IR cluster ağacı

LAB suşları 16S rDNA PZR işlemi ile amplifiye edildikten sonra sekanslama işlemi için Medsantek Laboratuvar Malzemeleri San. ve Tic. Ltd. Şti. (İstanbul) firmasına gönderilmiştir. Sekanslama işleminin ardından DNA gen dizilimleri (<http://goo.gl/lohXcq>) veya Ribosomal database project (<http://goo.gl/8OILPU>) veribanklarında mevcut türler ile karşılaştırılarak türlerin tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra gen dizilimlerin filogenetik analizi MEGA-X programının UPGMA Neighbour-joining (NJ) metodu kullanılarak Şekil 2.24’de gösterildiği gibi 16s rDNA tabanlı filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Dendogramda 8 LAB izolatu kümelendi ve elde edilen dendogram 5 farklı grup vermiştir. Gruplar sırasıyla 2 *Lactiplantibacillus plantarum*, 1 *Levilactibacillus brevis*, 1 *Companilactobacillus paralimentarius*, 2 *Staphylococcus spp.*, 1 *Bacillus haynesii*, 1 *Pediococcus acidilactici* içermiştir.

16S rDNA tabanlı yöntemler, bakteriler arasındaki genetik ilişkileri tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır [60]. Bu yüzden prokaryotlarda, 16S ribozomal RNA (rRNA) genleri önem arz edip, bir genomda en az bir kopya halinde bulunmaktadır [1]. Genlerin evrenselliği, onları filogenetik çalışmalar ve taksonomik sınıflandırma için ideal bir hedef haline getirir [71].

Bu çalışmada, RAPD-PCR'a kıyasla daha hızlı sonuç veren FTIR küme analizi kullanılarak, ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB’ler seçilmiştir. Küme analizine göre 8 LAB izolatu genotipik olarak tanımlanmıştır. Komşu birleştirme yöntemi kullanılarak LAB izolatlarının 16S rDNA tabanlı filogenetik ağacı, uyumlu filogenetik küme sunmuştur. LAB izolatının küme analizinin 16S rDNA'ya atfedilen gruplandırma ile uyumlu olduğu ve bu izolatları filogenetik olarak farklı gruplara ayırdığı sonucuna varılmıştır.



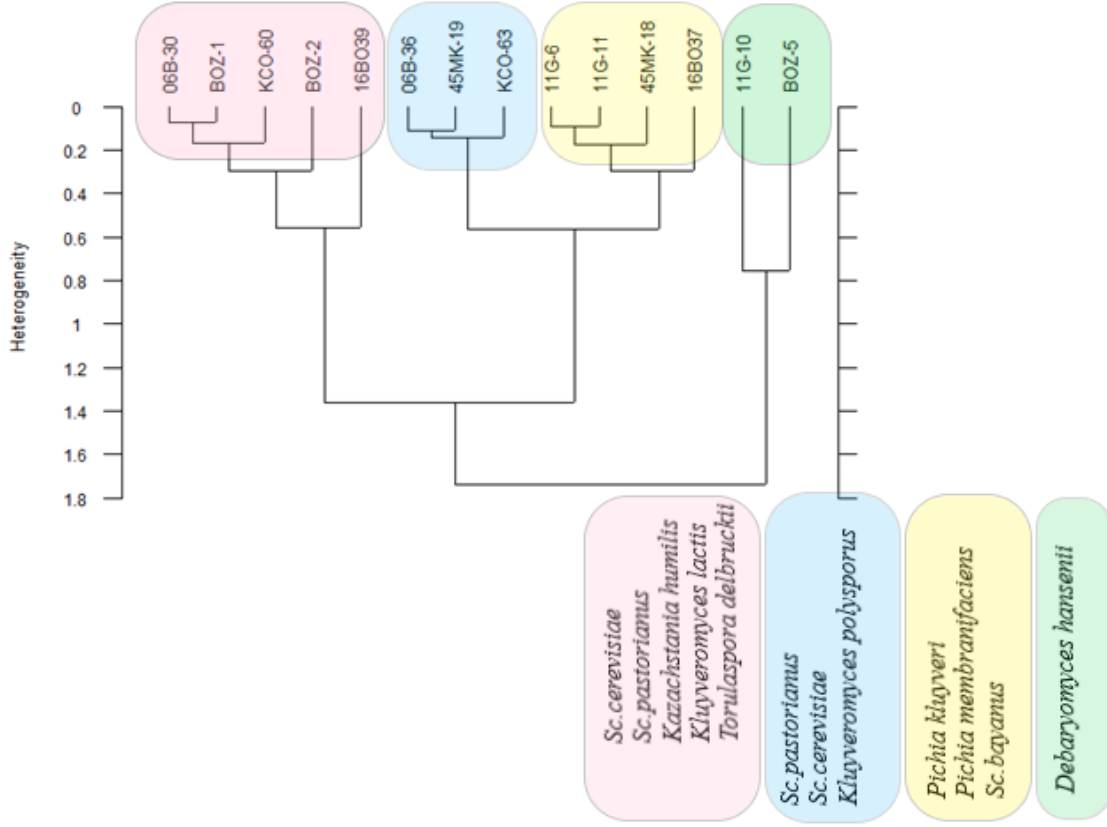
Şekil 2.24 16S sekanslarına bağlı olarak filogenetik ilişkisini gösteren Neighbour-joining metodu ile oluşturulmuş dendrogram

2.4.4 FT-IR (Fourier-Transform Kızılötesi Spektroskopi) ve PCR Tekniği Kullanılarak Mayaların Tanımlanması

Mikroorganizmalar gibi çok karmaşık suşların kimyasal bileşimini karakterize etmek için kullanılan FT-IR tekniğinin, çeşitli kalite kontrol alanlarında, küf ve mayaların tanımlanmasında başarılı olduğu vurgulanmıştır [72]. Çalışmamızda toplamda 62 maya izolatu elde edilmiştir ve FT-IR ile hızlı bir şekilde tanımlanmıştır (Şekil 2.25). Küme analizleri, girdi olarak orijinal spektrumun ikinci türevi kullanılarak farklı spektral bölgeler (3030–2830, 1350–1200, 900–700 cm^{-1}) kullanılarak karşılaştırılmıştır [59].

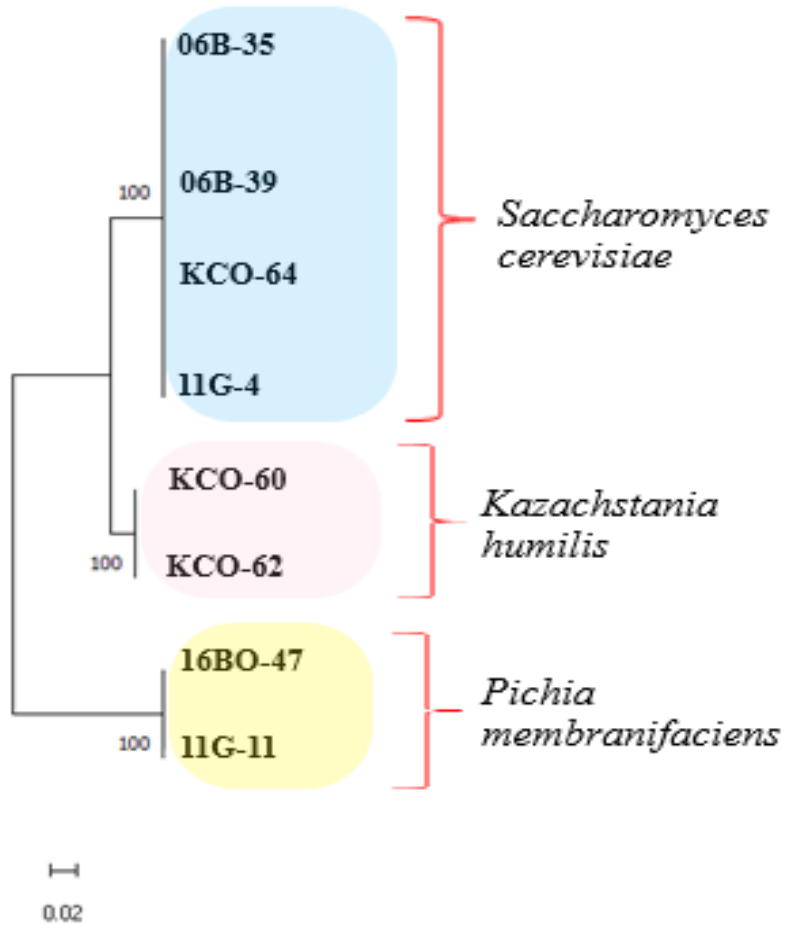
Çalışmamızdaki 62 maya izolatından 14 maya suşunun FTIR analiz dendrogramında 4 farklı gruba ayrıldığı kaydedilmiştir (Şekil 2.25). *Saccharomyces*, *Pichia* ve *Debaryomyces* türlerinin kendi aralarında aynı dallarda kümелendiği gözlemlenmiştir. Çalışmalar, mikroorganizmaların FTIR ile tanımlanmasının %90'ın üzerinde bir doğruluk oranına sahip olduğunu göstermiştir [73]. Çalışmamızda

tanımlamanın doğruluğunu belirlemek için 14 maya türünden 3 maya suşunun 26s gen bölgesi belirlenerek sekans analizine gönderilmiştir ve Şekil 2.26'de cluster analiz dendogramı verilmiştir. Sonuçlarımızın FT-IR ile benzer olduğu görülmüştür.



Şekil 2.25 FT-IR analizine dayalı olarak taranan maya suşlarının dendogramı

FT-IR spektroskopisinin kullanımının oldukça basit olduğu ve hücre bileşimindeki küçük değişikliklere karşı hassas olduğu vurgulandığından dolayı mayaları FT-IR ile tanımlamak mümkün olmaktadır [69].



Şekil 2.26 26 s gen bölgeleri belirlenmiş mayaların cluster analiz dendogramı

Wenning vd. [74] yaptıkları çalışmada gıda kaynaklı mayaların tanımlanması için FT-IR tekniğini kullanmışlardır. Sonuçlarında FT-IR mikrospektroskopisi kullanılması ile tür düzeyinde suşların %67'sinin doğru olduğunu kaydederken, bu doğruluğun FT-IR makrospektroskopisi ile %65 olduğunu ve toplamda 9 cins ve 13 türü temsil eden 45 maya suşunun ortalama spektrumunu içerdiğini belirtmişlerdir.

Kuhm vd. [75] yaptıkları çalışmada *Yersinia* türlerini ve tür bazında da biyotip ve serotiplere ayırt etmek için FT-IR tekniğini kullanmışlardır. Bu teknikten bağımsız olarak çalışmada farklı *Yersinia* izolatları kullanılmıştır. *Yersinia* izolatlarının toplam tür düzeyinde doğruluk oranının %79.9 olduğu belirtilmiştir ve API 20E test sistemiyle ayırt edilemeyen tüm *Y. bercovieri*, *Y. intermedia* ve *Y. rohdei* suşlarının *Y. enterocolitica*'dan ayrılmasını sağladığı kaydedilmiştir. Doğru serotip tanımlanması için doğruluğun %92.5 olduğu vurgulanmıştır. Ek olarak, ana patojenite belirteçlerinden biri olan ail geninin varlığı veya yokluğu, FT-IR kullanılarak gösterilmiştir. Tüm gen ile ilgili izolatların doğru tanımlanması olasılığı ise %98.5

olmuştur. FTIR sayesinde tek bir ölçümle cins, tür ve *Y. enterocolitica* alt türü hakkında bilgi edinmenin mümkün olduğu gösterilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada Sandt vd. [76] aynı türlere ait maya suşlarının tiplendirilmesi için yeni bir fenotipik yaklaşım olarak FT-IR spektroskopisini kullanmışlar. Bu çalışma, iki yoğun bakım ünitesinde yatan dokuz hastadan 4 aylık bir süre içinde izole edilen 79 *Candida albicans* suşu ile yürütülmüştür. FT-IR spektroskopi sonuçları, ikinci türev spektra ile gerçekleştirilen hiyerarşik kümeleme ile analiz edilmiştir. Bu tanımlama, toplamda 9 gruba ayrılmıştır. Çalışma sonucunda 79 spektrumdan sadece bir tanesinin yanlış sınıflandırıldığı görülmüş olup, tüm veriler ayrıca rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) sonuçlarıyla da karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak yazarlar FT-IR spektroskopisinin klinik maya tanımlaması için mükemmel bir teknik olduğunu belirtmişlerdir [69]. Bu sayılan çalışmalara ek olarak yapılan bir dizi çalışma, antibiyotiğe dirençli ve duyarlı suşlar arasında ayırım yapma potansiyeline sahip olan türleri ve suş seviyelerini belirlemek için FT-IR spektroskopisinin kullanılması yönünde vurgu yapılmıştır [77].

2.4.5 Ekşi Hamurdan İzole Edilen *Levilactobacillus brevis* ATCC 14869 Suşunun GABA Optimizasyonu

-Matematiksel Modelleme

Ekşi hamurdan izole edilen KCO-48 *Levilactobacillus brevis* ATCC 14869 suşunun kültür koşullarının optimizasyonu için seçilen süreç parametreleri ile GABA üretimi arasında matematiksel bir ilişki kurmayı amaçlamak hedef olmaktadır. Bu yüzden deneysel tasarım yöntemi olarak Box-Behnken Tasarım Tabanlı Tepki Yüzey Yöntemi (RSM) kullanılmıştır. Tasarım noktaları BBD ile belirlendikten sonra, elde edilen her bir girdi setinin deneysel sonuçları çıktı parametresi olarak tanımlanmıştır. 4 bağımsız girdi değişkeninin kombinasyonlarını ve her tasarım noktası için karşılık gelen çıktıyı göstermek için Tablo 2.10 kullanılmıştır. 4 bağımsız değişken seçildiğinden BBD kullanılarak 27 tasarım noktası önerilmiştir. Çalışmalar rastgele verilmiş olup, çalışma tekrarlar halinde bloke edilmiştir. 3 baz blok ve 27 baz çalışma oluşturulurken, toplam blok sayısı 6 ve toplam çalışma sayısı sırasıyla 54'e ulaşmıştır.

Tablo 2.10 BBD tabanlı deney tasarımı ve karşılık gelen yanıt değerleri

Deneme numarası	Sıcaklık [C°]	Monosodyum Glutamat[mM]	pH	İnkubasyon zamanı[h]	GABA miktarı (g L⁻¹)
1	35	50	7.00	48	0.560
2	35	400	7.00	48	0.392
3	35	225	5.75	48	29.495
4	30	225	5.75	72	78.017
5	40	225	5.75	72	0.224
6	30	225	5.75	24	1.380
7	35	400	4.50	48	1.230
8*	40	225	5.75	24	0.186
9	35	50	4.50	48	32.195
10	40	225	4.50	48	0.303
11	30	225	4.50	48	29.710
12*	35	400	5.75	72	42.970
13	30	225	7.00	48	0.415
14	35	400	5.75	24	1.575
15	35	50	5.75	72	22.084
16	35	50	5.75	24	18.590
17	35	225	5.75	48	22.325
18	40	225	7.00	48	0.253
19	40	400	5.75	48	0.500
20	35	225	5.75	48	25.275
21	35	225	4.50	24	1.340
22*	40	50	5.75	48	1.033
23	35	225	7.00	72	1.244
24	35	225	7.00	24	0.205
25	30	400	5.75	48	22.230
26	30	50	5.75	48	24.925
27*	35	225	4.50	72	55.215
*Unusual Observations (Outliers)					

MINITAB istatistiksel analiz yazılımı kullanılarak 4 deney olağandışı gözlemler olarak belirlenmiş ve modelin geliştirilmesi için ihmal edilmiştir.

İkinci dereceden yanıt denklemi 2.1'deki gibi tanımlanmıştır:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j>i}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (2.1)$$

Yukarıdaki denklemde (2.1), y karşılık gelen yanıt olup (GABA üretimi), sabit katsayı olmaktadır ve sırasıyla doğrusal, ikinci dereceden ve etkileşim terimlerinin

katsayılarını belirtmektedir. Oluşturulan matematiksel modelin Varyans Analizi (ANOVA) sonuçları, sıcaklık ve süre girdi parametrelerinin ikinci dereceden etkilerinin, p değerleri sırasıyla 0.378 ve 0.971 olduğundan istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermiştir ($p>0.05$).

Diğer yandan MSG'nin süre ile etkileşim etkisi de p değeri 0.104 olduğu için anlamlı değildir. Bu nedenle bu terimler çıkarılmış ve Denklem 2.2'de verilen modele göre aşağıdaki gibi kalan terimleri içeren yeni bir indirgenmiş ikinci dereceden regresyon denklemi oluşturulmuştur;

$$y = -502.7 + 5.74A + 0.0468B + 71.1C + 10.801D - 0.000259B^2 - 10.045C^2 - 0.00486AB + 1.17AC - 0.2660AD + 0.03520BC - 0.2174CD \quad (2.2)$$

Burada A, B, C ve D sırasıyla sıcaklığı, monosodyum glutamat, pH ve süreyi göstermektedir. İndirgenmiş ikinci dereceden regresyon denkleminin ANOVA sonuçları Tablo 2.11'de verilmiştir.

Tablo 2.11 İndirgenmiş kuadratik modelin varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Source	DF	SS	MS	F- Value	P-Value	Remarks
Model	13	7601.06	584.70	73.66	0.000	Significant
Blocks	2	344.39	172.20	21.69	0.000	Significant
Linear	4	1570.47	392.62	49.46	0.000	Significant
A	1	384.36	384.36	48.42	0.000	Significant
B	1	377.04	377.04	47.50	0.000	Significant
C	1	566.17	566.17	70.07	0.000	Significant
D	1	225.79	225.79	28.45	0.000	Significant
Quadratic Terms	2	1365.36	682.68	86.01	0.000	Significant
B ²	1	322.03	322.03	40.57	0.000	Significant
C ²	1	1200.00	1200.00	151.18	0.000	Significant
Interaction Terms	5	3055.59	611.12	76.99	0.000	Significant
AB	1	44.11	44.11	5.56	0.043	Significant
AC	1	213.82	213.82	26.94	0.001	Significant
AD	1	2383.05	2383.05	300.23	0.000	Significant
BC	1	237.12	237.12	29.87	0.000	Significant
CD	1	102.78	102.78	12.95	0.006	Significant
Error	9	71.44	7.94			
Total	22	7672.50				

Belirleme katsayısı (R^2), Düzeltilmiş R^2 ve Öngörülen R^2 sırasıyla 0.99, 0.977 ve 0.933 olarak belirlenmiştir. Denklem 2.2, ikinci dereceden yanıt yüzey grafiği için kullanılmıştır ve optimizasyon işlemi için Uygunluk Fonksiyonu (FF) olarak da

tanımlanmıştır. Bu çalışmada, maksimum GABA üretimini sağlayan optimum reaksiyon parametrelerini belirlemek için parçacık sürü optimizasyonu algoritması kullanılmıştır. Hesaplama maliyetini azaltmak için ana MATLAB programı iki alt programla ilişkilendirilerek kodlanmıştır. GABA üretimini maksimize etmek için girdi parametre değerlerini aradığımız için problem maksimizasyon problemi olarak modellenmiştir.

Deneyisel tasarımın sunduğu her kurulum kombinasyonu, benzersiz bir Uygunluk Değerine (FV) sahip bir parçacık olarak kabul edildi. Bu çalışmada yürütülen optimizasyon problemi şu şekilde ifade edilebilir (Denklem 2.3):

$$max_{y_{GABA}} = f(A, B, C, D) \quad (2.3)$$

s. t

$$400 \geq B \geq 50$$

$$7 \geq C \geq 4.5$$

$$72 \geq D \geq 24$$

Burada sırasıyla sıcaklık, monosodyum glutamat miktarı, pH ve inkübasyon süresi olan girdi değişkenlerini belirtir. Yazılan ana MATLAB programı dört ana bölümden oluşmaktadır. Birincisi problem tanımlama bölümüdür. Bu bölümde, yukarıda belirtilen ifadeye göre karar değişkenlerinin alt ve üst sınırları tanımlanmıştır. Girdi değişkenlerinin sayısı tanımlandıktan sonra uygunluk fonksiyonu yazılır. İkinci kısım, maksimum yinleme sayısı (MaxIt), swarm boyutu (nPop), atalet katsayısı (w), sönüm oranı (wdamp), kişisel ve sosyal ivme katsayıları (c1, c2) olan PSO model parametreleri ile ilgilidir. Bu parametreler sırasıyla 100, 10, 1, 0.99, 2 ve 2 olarak ayarlanır.

Üçüncü bölüm, parçacık swarm optimizasyonunun belirleme ilkesine göre kodlanmış alt programı çağırır. Bu alt programda, en iyi çözüm için potansiyel aday olan sürü üyeleri, tanımlanan üst ve alt sınırlar arasındaki aralıkta rastgele başlatılır. Elde edilen sonuçlara göre küresel en iyi üye olarak belirlenen diğer adaylar arasında en iyi GABA değerine sahip olan swarm üyesi olmuştur. Swarm üyelerinin hızları ve konumları denklem 2.4 ve 2.5'e göre güncellenir;

$$\begin{aligned}
& \text{particle}(i).\text{Velocity} \\
& = w * \text{particle}(i).\text{Velocity} \dots \\
& + c1 * \text{rand}(\text{VarSize}). * (\text{particle}(i).\text{Best.Position} - \text{particle}(i).\text{Position}) \dots \\
& + c2 * \text{rand}(\text{VarSize}). * (\text{GlobalBest.Position} \\
& - \text{particle}(i).\text{Position})
\end{aligned} \tag{2.4}$$

$$\text{particle}(i).\text{Position} = \text{particle}(i).\text{Position} + \text{particle}(i).\text{Velocity} \tag{2.5}$$

Daha önce belirtildiği gibi atalet katsayısı (w), aşağıdaki yinelemeden önce sönüm oranı (w_{damp}) ile çarpılarak güncellenir. Her yinelemede, başka bir alt program kullanılarak belirlenen en iyi uygunluk değerleri, bir sonraki yinelemede belirlenen değerle karşılaştırılmak üzere saklanır. Bu nedenle tasarım uzayı derinlemesine taranır ve iteratif döngü sonunda global optimum değere ulaşılır. GABA üretim üzerine etkili olan sıcaklık, monosodyum glutamat miktarı, pH ve inkübasyon süresi olan girdi değişkenleri nedenleriyle birlikte aşağıda tartışılmıştır.

2.4.6 GABA Optimizasyonu Üzerinde Etkili Olan Parametreler

-pH Etkisi

pH, fermentasyon süresince LAB tarafından GABA biyosentezi için önemli bir faktör olmaktadır ve sadece bakteri büyümesini etkilemez aynı zamanda *gad* aktivitesini de etkilemektedir. LAB'lerden türetilen *gad* enzimi sadece asidik koşullar altında aktif olmaktadır ve pH 5'ten büyük olması durumunda aktivitesini kaybetmektedir [78]. Bazı çalışmalarda, fermentasyon ortamındaki başlangıç pH'sının GABA sentezini etkilediği gösterilmiştir. *Lb. brevis* NCL912 suşunun, başlangıç pH 5'de maksimum GABA miktarını ürettiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [79]. Fermente edilen mikroorganizmaların optimal koşulları, *gad*'ın farklı özelliklerine göre çeşitlilik arz etmektedir ve optimum pH 3.5-5.0 arasında değişmektedir. Fermentasyon ile GABA'nın yüksek üretimi sadece *gad* aktivitesinin aktivasyonuna bağlı değildir aynı zamanda GABA dekompozisasyon enzimlerin aktivitesinin sergilenmesine de bağlı olmaktadır [78]. Kültür ortamının pH'sı, bakteri üremesini ve glutamat dekarboksilazın aktivitesini değiştirdiği için farklı bakterilerin GABA üretimini etkileyen önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır [80]. *Lactobacillus brevis* suşlarının, asit direncine yönelik ana strateji olarak kullanılan GAD sistemine atfedilen ve dolayısıyla yüksek GABA üretim kapasitesi sergilediği

yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [81]. Araştırmalarda LAB tarafından GABA üretimi için etkili pH aralığının 4.0-5.0 arasında olduğu bildirilmiştir. GABA üretimi esnasında, fermente edici ortamın pH'sı değişmektedir. Glutamat'ı GABA'ya dönüştürmek için hücre içi protein tüketiminin mikroorganizmaların asidik ortamlara başa çıkmasına yardımcı olduğu bilinmektedir. GABA, hücre dışı ortama geri gönderildiğinde, alkalileşmeye ve pH'da bir artış sağladığı kaydedilmiştir [78].

Çalışmamızda KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 suşunun optimizasyonunun sağlanması için 3 farklı pH koşulu altında *gad* aktivitesi ölçülmüştür. *Gad* aktivitesi için optimum pH değeri 5.75 olmuştur. Sonuçlarımızda GAD için pH düzenlenmesinin GABA üretimini etkili bir şekilde geliştirdiği gözlemlenmiştir. Binh vd. [82] yaptıkları çalışmada Kimchii'den izole ettikleri *Lb. brevis* suşunun GABA üretim yeteneğini artırmak için optimizasyon yapmışlardır. Optimal pH değerinin 5.25, sıcaklığın 35 ve fermantasyon süresinin 72 h olduğunu belirtmişlerdir. Bu optimizasyon koşullarında 44.4 g/L GABA miktarına ulaştığını kaydetmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada Villegas vd. [83] kinoa ekşi hamurundan izole ettikleri *Lb. brevis* suşunun GABA üretimini optimize etmişlerdir. MSG miktarının 255 mM, sıcaklığın 30 °C, fermantasyon süresinin 48 h olmasının optimum nokta olduğunu kaydetmişlerdir. Bu verilerin çalışmamızla doğru orantılı olduğu görülmüştür. Genel olarak değerlendirildiğinde GABA üretimi sırasında pH'ın artması veya azalması, ortam bileşimi, L-glutamatın GABA dönüşümüne oranı ve fermantasyon ortamında LAB tarafından asitleştirme derecesi gibi faktörlere bağlı olabilir.

-Sıcaklık

pH ile birlikte inkübasyon sıcaklığı, maksimum GABA sentezini etkileyen bir diğer önemli faktör olmaktadır [78]. Hem hücre büyümesi hem de *gad* aktivitesinin sıcaklığa bağlı olması, sıcaklığın LAB'nin GABA üretimi üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu göstermektedir [80]. Bu amaçla optimizasyonda inkübasyon sıcaklığının ortaya çıkarılması önem arz etmektedir. Çalışmalardaki *L. brevis* NCL912'deki GABA üretiminin hücre yoğunluğu ile pozitif bir korelasyon gösterdiği ve büyümesinin sıcaklıkla arttığı gözlemlenmiştir. Maksimum büyümesi ise 35 °C'de gerçekleşmiştir [78]. Çalışmalarda LAB suşları tarafından GABA üretimi için etkili sıcaklıkların 30 °C ile 40 °C arasında olduğu vurgulanmıştır. Sıcaklığın hem biyokatalizör etkinliği hem de reaksiyonun termodinamik dengesini etkilediği yapılan çalışmalarla

desteklenmiştir. Bunun yanı sıra kültür sıcaklığının, *gad* aktivitesi üzerindeki etkisinden dolayı GABA üretimini etkilediği söylenebilir.

-MSG Konsantrasyonu

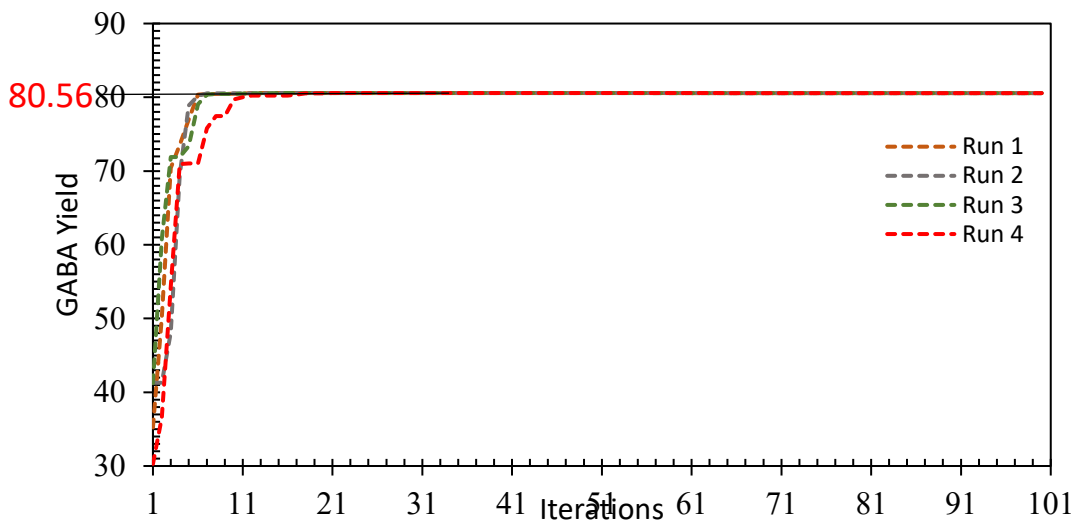
Glutamat takviyesinin, LAB fermentasyonu sırasında GABA üretiminde etkili olduğu bulunmuştur. Ancak yüksek konsantrasyonlarda takviye GABA üretiminin azalmasına neden olabileceği ve bunun nedeninin de daha yüksek ozmotik basınca dayandırılabilmesi ve bunun sonucunda bakteri metabolizmasını bozarak GABA veriminin düşmesine neden olabileceği belirtilmiştir. Birçok LAB'nin, GABA üretimi için yeterli L-glutamata sentezleme yeteneğine sahip olmadığı, bu nedenle MSG'nin L-glutamata kolayca hidrolize edilebilmesi için kültür ortamına MSG eklenmesi gerektiği vurgulanmıştır [80].

Çalışmamızda seçilen MSG konsantrasyonları 50, 225 ve 400 mM olmaktadır. Optimum nokta için 225 mM MSG konsantrasyonunun uygun olduğu görülmüştür. Bakteriyel GABA'yı üretmek glutamat konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Lb. brevis* tarafından 72 h saatte 526.33 mmol/L GABA üretildiği kaydedilmiştir [84]. Bu çalışmalara ek olarak glutamat'ın eklenmesi ile *Lb. paracasei* ve *Lb. brevis* [85] bakterilerinde GABA üretimini artırdığı fakat *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* Y2'de bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir [43]. Araştırmalara bakıldığında glutamik asit takviyesinin GABA üretimini iyileştirdiği kaydedilmiştir. Çünkü GAD geni, glutamik asidi GABA'ya dönüştürmektedir. Fakat bu çalışmaların yanı sıra substrat takviyesinin artması ile GABA dönüşüm oranının azaldığı bildirilmiştir [86]. Sonuçlarımızda MSG konsantrasyonunun 400 mM olduğu durumda GABA üretim miktarının azalması bunu desteklemektedir. Bunun nedeninin enzim-substrat kompleksinin konsantrasyonunun artması ile GABA dönüşüm oranını yavaşlatması düşünülebilir.

-Fermentasyon Süresi

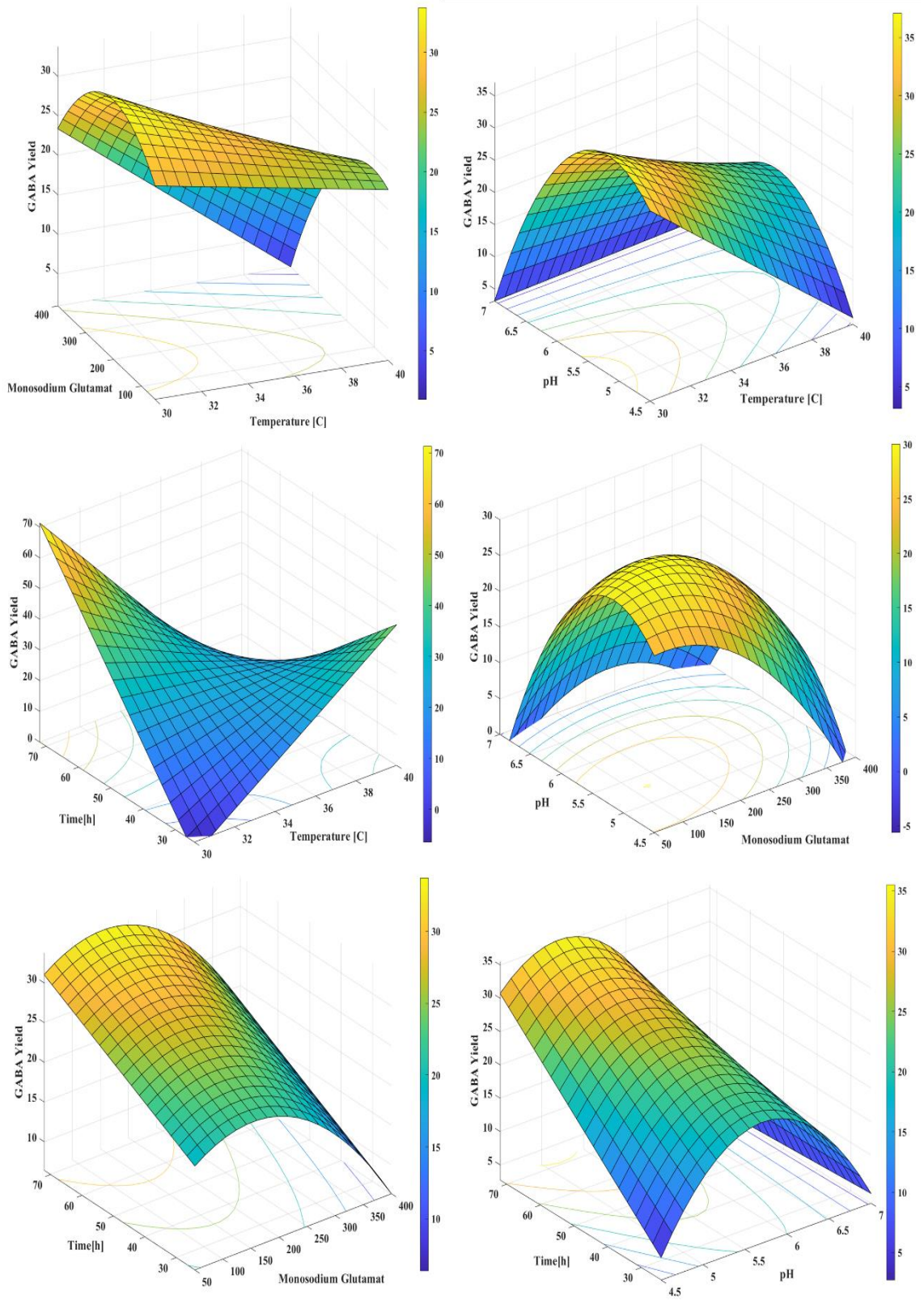
Gıdalardaki GABA içeriğini artırmak için fermentasyonun kullanılması, fermentasyon koşullarının optimize edilmesi gerektiği düşüncesini doğurmuştur. Bunun için fermentasyon koşullarını optimize etmek önem arz etmektedir. Bu yüzden dikkat edilmesi gereken bir diğer parametre fermentasyon süresi olmaktadır. Fermentasyon süresinin artması ile belirli bir süre sonra GABA içeriğinin değişmeyeceği ve sırasıyla GABA'nın süksinik asit semialdehite ve

ardından süksinik aside dönüşmesi nedeniyle azalacağı bildirilmiştir [87]. Sonuç olarak, maksimum GABA içeriğini sağlamak için fermantasyon süresinin optimize edilmesi gerekmektedir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiği zaman optimizasyon sonuçları, maksimum GABA verimine izin veren en iyi proses parametrelerinden **sıcaklığın 30 °C, MSG konsantrasyonunun 130.71, pH'nın 4.74 ve sürenin 72 saat** olması gerektiği görülmüştür. Maksimum GABA verimi ile 80.56 olarak belirlenen sonuç için en iyi kombinasyon olmuştur (Şekil 2.27). Tablo 2.7 dikkatli bir şekilde incelendiğinde, maksimum değer BBD (4. deney) tarafından sunulan en iyi tasarım noktasından daha yakın hatta ondan bile büyüktür.



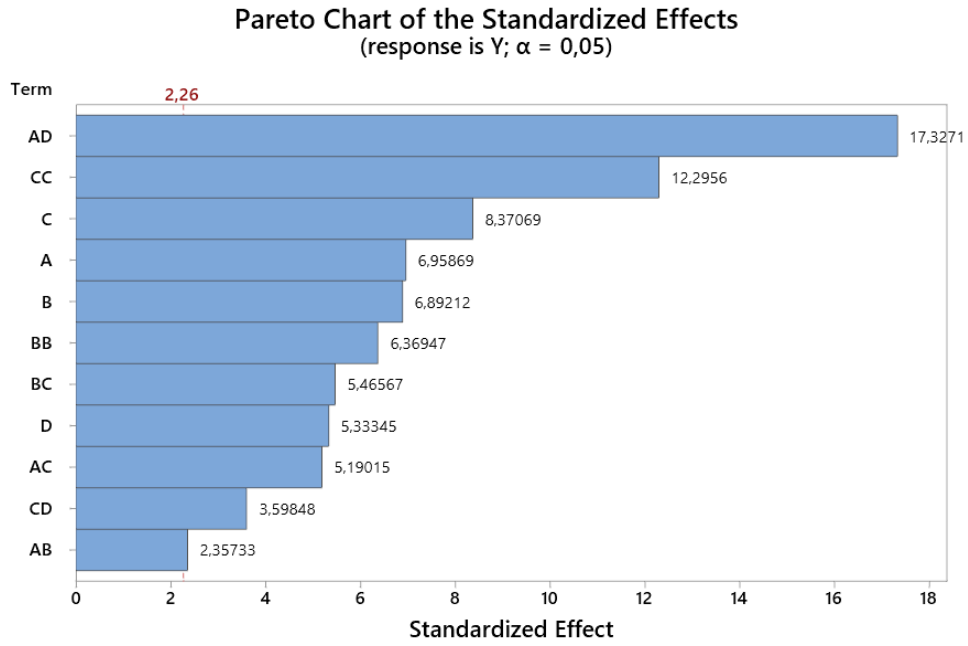
Şekil 2.27 Farklı stokastik optimizasyon çalışmalarını gösteren diyagram

Ayrıca, optimizasyon işlemi için kullanılan uygunluk fonksiyonu, belirli işlem parametrelerinin GABA verimi üzerindeki ilişkilerini göstermek için kullanılmıştır. 3B tasarım alanında sadece 2 bağımsız değişken 1 bağımlı değişkene karşı grafiksel olarak gösterilebildiğinden, tüm ilişkiler 6 farklı grafik kullanılarak gösterilmiştir (Şekil 2.28).



Şekil 2.28 Proses parametrelerinin yanıt yüzey çizimleri

Oluşturulan matematiksel modelin varyans analizi (ANOVA) sonuçlarının yanı sıra yanıt yüzey grafikleri, tüm ana etki terimlerinin anlamlı olduğunu göstermiştir. En baskın ana etki teriminin pH, en az ise zamanın olduğu görülmüştür. Ancak sonuçlar, zamanın sıcaklıkla etkileşim etkisinin GABA verimini etkileyen en etkili terim olduğunu göstermektedir (Şekil 2.29). Öte yandan, bu her iki parametrenin kuadratik etkileri ve monosodyum glutamat miktarının zamanla etkileşim etkisi önemsizdir.



Şekil 2.29 Standartlaştırılmış etkilerin Pareto grafiği

YÜKSEK GABA ÜRETİCİSİ *L. brevis* ATCC 14869 ve *L. plantarum* JCM 1149 SUŞLARI İLE BOZA ÜRETİMİ

3.1 Giriş

Boza ve benzeri içeceklerin tarihi MÖ 6000-7000 yıllarına, yani yaklaşık 9000 yıllık bir geçmişe dayanmaktadır [88]. Boza kökeninin Anadolu ve Mezopotamya'da yaşayan eski halklardan geldiği bilinmektedir. Yunan tarihçi Ksenophon, Boza'nın MÖ 401'de Doğu Anadolu'da yapıldığını ve toprağın altında gömülmüş kil kavanozlarda saklanmış bir şekilde olduğunu kaydeder. Fakat boza, özellikle 10. yüzyıldan bilinmektedir ve çağdaş içeceğin formülasyonunun hazırlanması Osmanlılar tarafından fethedilen ülkelerde yayılması ise 16. Yüzyıla dayanmaktadır [89]. Boza; ekşi veya tatlı bir tada sahip fermente bir içecek olup, karakteristik asidik-alkollü bir kokuya sahip, soluk sarı renkli, yoğun bir sıvıdır ve özellikle soğuk kış gecelerinde tercih edilen bir içecek olmaktadır. Farsça darı anlamına gelen "buze" kelimesinden türemiştir. Yüzyıllar boyunca Orta Asya'da bilinmektedir ve oradan Anadolu ve Avrupa'ya tanıtılmıştır. Bozayı ilk üreten Türkler olmasına rağmen konu araştırmacılar tarafından son derece göz ardı edilmiştir. Bu nedenle boza, diğer bazı Avrupa ülkeleri tarafından da milli ürün olarak piyasaya sürülmüştür [88].

Boza; mısır, pirinç ve buğday unları gibi tahıllardan yapılan, oldukça kıvamlı, geleneksel fermente bir Türk içeceği olmaktadır. Bozanın hazırlanması normalde laktik asit bakterileri (LAB) ve mayaların karışık kültürlerini içeren doğal fermantasyon ile gerçekleştirilmektedir [90]. Türkiye'de ve Arnavutluk, Bulgaristan, Makedonya Cumhuriyeti, Romanya gibi diğer Balkan ülkelerinde tüketilen kolloid süspansiyonlu, hafif asidik, düşük alkollü bir içecektir. Hoş tadı ve yüksek besin değeri nedeniyle boza, her yaştan tüketici tarafından popüler bir içecek haline gelmiştir ve genellikle kış aylarında tüketilmektedir [2]. Boza üretiminde farklı hammaddeler ve fermantasyon süreçleri farklı oranlarda gerçekleşmektedir. Bu da ürünün kalitesinde değişikliğe sebep olmaktadır. Üretim aşamasındaki fermantasyon süreci, bozanın hem fonksiyonel hem de sindirilebilir

özelliklerinin gelişmesine katkıda bulunur [91]. Boza'nın eşsiz tadı ve kokusu, insan sağlığını olumlu yönden etkilemesi, nihai ürünün kalitesini etkilemesi, seçilmiş tahıl veya un kaynaklarının kullanımı, tercihen probiyotik mikrobiyal starterlerle aşılama ve uygun fermentasyon koşulları gibi faktörlere bağlı olmaktadır [89].

3.1.1 Boza Görünümü ve Kompozisyonu

Boza, kremi beyaz ve bejden açık kahverengiye kadar değişen, hoş tatlı bir tada ve hafif asitli bir tada sahip, kıvamlı, düşük alkollü bir içecek olmaktadır. Kompozisyonunun yaklaşık %0.50-1.61 protein, %12.3 karbonhidrat (% 8-12 şeker) ve % 75-85 nem içerdiği belirtilmiştir. Üreticilere göre (Bomax, Ömür Bozasi) ise, nihai ürünleri %8-57,5 karbonhidrat, %0.5-3.5 protein, % 0.4-0.5 lipid, 29 mg Ca, 1.3 mg Fe, 95 mg fosfor, 1 mg Zn ve vitaminlerden tiamin, riboflavin ve niasin içermektedir. Sadece leblebi unu ile hazırlanan boza, protein (%8.46) ve mineral içeriği, Ca (268.1 ppm), K (525.3 ppm), P (199.2 ppm), Zn (3.13 ppm), Mn (1.14 ppm) daha yüksektir ve daha az sakaroz (%0.05) içeriğine sahiptir. Farklı Boza örneklerinde oksalik, laktik, pirüvik, asetik ve malik asitler bulunmuştur. Sitrik asit pirinç ve mısır bozasında belirlenmesine rağmen orotik asit pirinç, mısır ve darı bozasında bulunmuştur [89].

Bozanın asitlik değerine göre, "tatlı boza" ve "ekşi boza" olmak üzere iki sınıfa ayrıldığı kaydedilmiştir. Boza Standardı'na (TS 9778) göre bozada toplam kuru madde en az %20, sakkaroz cinsinden toplam şeker en az %10 olmalıdır. Etil alkol içeriğinin ise, hacimce %2'yi geçmemesi gerektiği vurgulanmıştır. Tatlı bozada laktik asit cinsinden asitlik değerinin %0.2-0.5 ekşi bozada ise %0.5-1.0 olmalıdır [92].

3.1.2 Boza Üretiminde Kullanılan Tahıl Kaynakları

Boza için çeşitli tahıl kaynakları kullanılabilir. Ancak en kaliteli ve lezzetli çeşidinin darı unundan yapıldığı belirtilmiştir. Arnavut Bozasının üretiminde ana madde olarak mısır kullanıldığı için diğer ülkelerde üretilen bozalardan farklı olmaktadır. Türkiye, Bulgaristan ve Makedonya gibi diğer ülkelerde ise ana bileşen genellikle bulgur, darı, arpa, pirinç irmiği/unu, nohut veya bezelye olmaktadır [89]. Bu taneler bir embriyo (germ), epidermis tarafından çevrelenmiş bir endosperm ve bir tohum kabuğundan (kabuğu) oluşur. Endosperm granüle nişasta ile doldurulur. Embriyoda; amino asitler, lipidler, mineraller, şekerler ve vitaminler gibi enzimler

ve besinler bulunurken, Kabukta ise; selüloz, mineraller, pentozanlar ve pektinler bulunmaktadır [93].

Tahıl taneleri, karbonhidratlar, proteinler, vitaminler, mineraller ve liflerin önemli katkıları olmaktadır. Genel olarak, tahılların doğal fermentasyonu, karbonhidratların yanı sıra bazı sindirilemeyen poli- ve oligosakkaritlerin seviyesinde bir azalmaya yol açar. Bazı amino asitler sentezlenebilir ve B grubu vitaminlerin mevcudiyeti geliştirilebilir [2]. Tahıllar suda çözünür lif (β -glukan ve arabinoksilan gibi), oligosakkaritler (galakto- ve frukto oligosakkaritler gibi) ve dirençli nişasta içermektedir ve bu nedenle prebiyotik kavramı yerine getirmesi önerilmiştir. Buna ek olarak, fitoöstrojenler, fenolik bileşikler, antioksidanlar ve steroller dahil olmak üzere birçok fitokimyasal ve diğer biyoaktif bileşiklerin kaynağını oluşturduğundan dolayı bu özellik onları probiyotik ve fonksiyonel gıdaların gelişiminde önemli kılmaktadır [94].

Buğday tanelerinden üretilen Boza için en çok kullanılan kimyasal bileşim: proteinler %12.6, nişastalar %67.8, lipidler %1.6, mineraller %1.7 ve su %15.5 olmaktadır. Boza, yaygın olarak (mısır, arpa, çavdar, buğday, darı veya pirinç gibi) öğütülmüş tahıl veya unların karışımı ile yapılmaktadır. Boza üretiminde sıklıkla kullanılan tanelerin kimyasal bileşimi Tablo 3.1'de verilmiştir [89].

Tablo 3.1 Boza üretiminde sıklıkla kullanılan tanelerin kimyasal bileşimi [89]

Tahıl	Bileşim (%)			
	Karbonhidrat	Protein	Yağ	Diyet lifi
Buğday	71.2	12.6	1.5	12.2
Mısır	18.7	3.3	1.4	2.0
Darı	72.8	11.0 ¹	4.2 ²	8.5
Arpa	77.7	9.9	1.2	15.6
Çavdar	60.7	8.8	1.7	13.2
Pirinç	80.0	7.1	0.7	1.3
Leblebi	41.1-47.4	21.7-23.4	2.6	13.9-17.6

¹ Glutensiz

²Onların en az %2'si çoklu doymamış omega-6 yağ asitleri olmaktadır.

Bulgar bozasında sıklıkla kullanılan mısır, kırmızı buğdaydan daha yüksek oranda protein içerir ve ayrıca daha yüksek fosfor, potasyum, piridoksin ve beta-karoten seviyelerine sahip olduğu için daha besleyici olarak kabul edilir. Modern buğday

formlarının aksine, siyezdeki gliadin proteini çölyak hastaları için toksik özellik sergilemediğinden glutensiz diyetle tavsiye edilebilir [89].

3.1.3 Bozanın Mikrobiyotası

Boza fermentasyonu sırasında alkol fermentasyonu ve laktik asit fermentasyonu olmak üzere iki farklı fermentasyon meydana gelmektedir ve bu süreçler aynı anda gerçekleşmektedir. Alkol fermentasyonu, karbondioksit kabarcıkları üretir ve hacmi arttırır. Laktik asit fermentasyonu ise laktik asit üreterek bozanın asidik karakterini sağlamaktadır. Laktik asit fermentasyonu tahıl bazlı ürünlerin işlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bunlardan bazıları;

a. Raf ömrünü uzatma ve koruma, gıda güvenliğini artırma;

Koruma, organik asit (laktik asit, asetik asit, propiyonik asit), etanol ve bakteriyosin gibi inhibitör metabolitlerin oluşumu yoluyla gerçekleşir. Ayrıca, asit pH'yı 4'ün altına düşürerek raf ömrünü uzatır ve bozucu ve bazı patojenik mikroorganizmaların büyümesini ve hayatta kalmasını sınırlandırır.

b. İstenmeyen bileşiklerin azaltılması;

Bazı tahıllarda bulunan fitik asit (fermantasyon, fitaz aktivitesi yoluyla fitatın enzimatik bozunması için optimal pH'ı sağlar), tanenler (fermantasyonun bir sonucu olarak) ve polifenoller (polifenol oksidazın aktivitesi nedeniyle) gibi.

c. Besin değerini geliştirmek:

Fermentasyon sırasında lipazlar, proteazlar ve amilazlar gibi enzimler üretilir ve bunlar sırasıyla lipidleri, proteinleri ve polisakkaritleri hidrolize eder. Serbest bırakılan besinler, ürünlerin besin değerinin artmasına katkıda bulunur. Fermentasyon; tiamin, riboflavin, niasin veya folik asit gibi biyovitaminlerin arttırılmasına da katkıda bulunur.

d. Duyusal niteliği geliştirmek;

Geliştirilmiş duyusal nitelikler: Fermentasyon, nihai ürünlerin dokusunda, tadında ve aromasında genel bir iyileşmeye yol açar. Mikrobiyal fermenterlerin metabolik aktiviteleri bu özelliklerin geliştirilmesinden sorumludur. Fermente gıdaların başlıca lezzet ve tatlarının, organik asitler (serbest amino asitler, alkol, aldehytler,

ketonlar ve karbonil bileşikleri ile birlikte) tarafından üretildiğine inanılmaktadır [94].

Bazı ülkeler, mikroorganizma tanımlamasındaki son gelişmelerden yararlanarak, bozanın mikroflorası üzerine geleneksel fenotip temelli yöntemler ve moleküler yaklaşımlar ile çeşitli çalışmalar yapmıştır. Bu sonuçlar, dünya genelinde bozada bulunan mikrobiyotanın taksonomik bileşiminin bölgeler arasında ve kullanılan hammaddelere göre önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymakta ve farklı bölgelerde üretilen bozanın mikroflorasının araştırılması gerektiği sonucu doğrulamaktadır. Boza, Çin'in batı bölgesinde (XUAR'da) popüler olmasına rağmen, şimdiye kadar değeri az olarak araştırıldığından dolayı ve endüstriyel uygulama için uygun mikroorganizmaların bulunmaması nedeniyle ticarileştirilmesinde kısıtlamaya yol açmıştır. Bozanın karmaşık mikrobiyal bileşimi ve farklı fermantasyon süreçlerinin etkileşimlerinden kaynaklanan karmaşık bir biyolojik ekosistem olduğu açıktır [95]. Boza'nın fermantasyonundan sorumlu mikrobiyota, hem homo hem de heterofermentatif LAB ve mayalar olmaktadır [88,89]. İşlem sırasında maya ve LAB arasında etkileşimler kontrol edilemediğinden ürünün kalitesinde ve stabilitesinde değişikliklere yol açmaktadır. Bu tür geleneksel ürünlerin kalitesinde değişiklik olmaması için starter kültürlerin kullanılması gerektiği ön görülmüştür [90].

Boza fermantasyonundan sorumlu LAB; *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus confuses*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*, *Leuconostococcus*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus coprophilus*, *Leuconostoc raffinolactis* olurken, sorumlu mayalar ise; *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropikalis*, *Candida glabrata*, *Geotrichium penicillatum* ve *Geotrichium candidum*, *Candida diverca*, *Candida inconspicua*, *Candida pararugosa*, *Issatchenkia orientalis* mikroorganizmaları olmuştur [2]. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* ve *Weissella confusa* gibi diğer laktik asit bakterilerinin de tahıl bazlı fermente gıdalardan sıklıkla izole edildiği bildirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin tahıl

işlemede her yerde kullanılmasına rağmen, amilolitik laktobasillerin biyolojik çeşitliliği oldukça sınırlıdır. Tanımlanan 120 *Lactobacillus* türü arasından sadece dokuzu nişastayı tek karbon kaynağı olarak parçalayabilmektedir. Amilolitik *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus pentosus* suşları, oğ, mawe ve boza dahil olmak üzere çeşitli tahıl bazlı fermente edilmiş yiyecek ve içeceklerden izole edilmiştir. Amilolitik laktik asit bakterilerinin kullanımı, hem amilaz üretimini hem de asitleştirmeyi tek bir mikroorganizmada birleştirerek başka bir alternatif sunar. Mayalar ve laktik asit bakterileri arasında bir kometabolizma önerilmiştir. Bu sayede bakteriler, mayaların büyümesini seçen asit ortamını sağlarken, mayalarda bakterilere vitaminler ve çözünür nitrojen bileşikleri gibi diğer büyüme faktörlerini sağlar [94].

3.1.4 Ticari Boza Üretim Aşaması

3.1.5 Hammaddelerin Hazırlanması

Boza üretiminde darı, buğday veya bulgur, mısır ve pirinç hammadde olarak kullanılabilir. Seçilen hububat yabancı maddelerden temizlenir ve irmik büyüklüğünde parçalara ayrılmaktadır ve daha sonra elenerek kabuk ve kepek kısımlarından temizlenir. Bazı yerlerde bu tahılların unları da tercih edilmektedir. Diğer hammaddeler ise; toz şeker, içme suyu ve maya (önceki boza veya mayalı ekmek hamurundan) olmaktadır [88].

3.1.6 Hammaddelerin Kaynatılması

Elenmiş tahıl karışımı, sürekli karıştırılarak hacminin (w/v) 4-6 katı suda kaynatılır. Kaynatma işlemi için paslanmaz çelik kazanlar kullanılmaktadır ve kapasiteleri günlük üretime göre değişmektedir. Kaynatma işlemi sırasında karışım suyu emer ve bu nedenle kaynatma işleminin sonuna kadar birkaç kez sıcak su eklenir. Homojen bir hamur elde edildiğinde kaynama durdurulur [88]. Tanelerin ısıtılması sırasında tanelerin yumuşaklığı ve şişmesi, kabuğun yırtılması, nişasta granüllerinin şişmesi, nişastanın hidrolizi, proteinlerin denatüre edilmesi gibi bir dizi fiziko-kimyasal sürecin meydana geldiği belirtilmektedir. Nişasta, önemli viskozite değişikliklerine yol açan dekstrinlere hidrolize edilir. Lipidlerin bir kısmı (tahılda) gliserine ayrışır veya emülsifiye edilir. Hammaddelerin kaynatılması, doğrudan ısıtma ile 30-35 dakika veya dolaylı ısıtma ile 60-120 dakika devam etmektedir [88,89].

3.1.7 Soğutma ve Süzme

Boza hamuru kaynatıldıktan sonra gece boyunca soğumaya bırakılmalıdır. Bazılarında üretim tesislerinde, soğutmaya hızlandırmak için mermer kaplarda soğutma yapılmaktadır. Soğutulan hamur, sürekli karıştırılarak su ile 2-2.5 kez seyreltilir ve daha sonra tahta fiçılara süzülür. Elenmiş malzemeye “şekersiz ham boza” denir ve süzülmemiş katı kısım ise hayvan yemi olarak kullanılır [88].

3.1.8 Şeker İlavesi

Türk Gıda Mevzuatına göre boza, en az %15 toz şeker (sakkaroz) içermelidir. Böylece verimli bir fermantasyon için ham bozaya %20'ye kadar şeker ilave edilir. Diğer tariflerin çoğunun aksine geleneksel Türk üretiminde malt kullanılmaz.

3.1.9 Fermantasyon

Başlangıç kültürü olarak önceki seriden alınan boza (%2-3) kullanılmalıdır. Starter kültürün oranı, üretildiği mevsime ve sıcaklığa bağlıdır. Daha sonra karışım, ahşap fiçılarda mayalanmaya bırakılır. Aşılınmış karışım kullanıma hazır olmadan önce yaklaşık 24 saat 15-25 °C'de inkübe edilir. Fermantasyon sırasında hacmin artması nedeniyle ahşap fiçılar tam olarak doldurulmamalıdır. Bu şekilde üretilen boza, aşırı ekşi tadı önlemek için birkaç gün içinde tüketilmelidir. Pratikte bozanın raf ömrünü uzatmak için soğukta muhafaza edilerek fermantasyonu geciktirilir. Sezonun ilk boza üretiminde ekşi maya veya yoğurt kullanılır. Olmayan zamanlarda ise starter kültür kullanılır [88,91].

3.1.10 Ev tipi Boza Üretimi

Ev yapımı boza üretimi için;

- a. Bulgur iyice yıkanarak geniş ve derin bir tencereye alınarak su ile karıştırmak,
- b. Muhallebi kıvamına gelene kadar kaynatmak,
- c. Karışımı ince bir süzgeçten geçirip spatula ile bastırmak,
- d. Ardından karışımın soğuması için yaklaşık bir saat bekletmek,
- e. Bir bardak sıcak su ile şeker (1 yemek kaşığı) ve mayayı (1 çay kaşığı) iyice karıştırıp tencereye ilave etmek.
- f. Tencerenin kapağını kapattıktan sonra ara ara karıştırarak yaklaşık 15-20 saat serin bir yere koymak (fermantasyon adımı),

g. Fermantasyondan sonra kalan şeker ve suyu (doğru kıvam için) eklemek ve iyice karıştırmak

h. Bozanın depolanması: Bozanın muhafaza koşulları, içinde mikroorganizmaları barındırdığı için önem arz etmektedir. Yüksek sıcaklıkta maya ve asetik asit bakterilerinin miktarı hızla arttığından dolayı bozanın duyuşal özelliklerinde farklılıklara neden olur. Ürünün pH değeri 3.5'in altında ise boza tüketilebilir. Yapılan araştırmalar, bozanın raf ömrünü uzatmak için en önemli özelliklerden birinin saklama koşulu olduğunu göstermektedir. Bozanın buzdolabında (4 °C) saklanması, geleneksel bozanın raf ömrünün uzamasına yardımcı olur [91].

3.1.11 Bozanın Depolanması

Bozanın muhafaza koşulları, içinde gıda bakterisi barındırdığı için önem arz etmektedir. Yüksek sıcaklıkta maya ve asetik asit bakterilerinin miktarı hızla arttığı için bozanın duyuşal özelliklerinde farklılıklara neden olur. Boza, pH değeri 3.5'in altında ise tüketilebilme özelliğindedir. Yapılan araştırmalara bakıldığında bozanın raf ömrünün uzatılmasının en önemli özelliklerinden birinin saklama koşulu olmasıdır. Bozanın buzdolabında (4 °C) saklanması, geleneksel bozanın raf ömrünün uzamasına yardımcı olduğu belirtilmiştir. Buna karşın boza 25 °C'de sadece 2-3 gün saklanabilme özelliğine sahiptir [91]. Bu içecek uygun sürelerde tüketilmediği takdirde ürün bozulur, kıvamlı ve içilmez hale gelir. Boza çeşitleri arasındaki farklılıklar boza üretim yöntemleri ve mikroflora ile ilgili olmaktadır. Ayrıca saklama sıcaklıkları ve sürelerindeki farklılıklar da boza örneklerinin mikroflorasını etkileyebilmektedir [94].

Caputo vd. [96] yaptıkları çalışmada bozanın 4 °C'de depolandığında raf ömrünün 1 ila 2 hafta arasında değiştiğini ve sonraki günlerde ürünün asitliğinin arttığını ve tüketilemez hale geldiğini belirtmiştir.

3.1.12 Bozanın Sağlık Üzerine Etkisi

Yeni fonksiyonel yiyecek ve içeceklerin geliştirilmesi, gıdaların lezzetlerinde ve duyuşal kabul edilebilirliklerinde önemli bir azalma meydana gelmesi araştırmacılar için önemli bir konu haline gelmiştir. Boza; doğal hammaddeden üretilmesi, işleme teknolojisi ile önleyici ve tedavi edici olması ve sağlık açısından bu gereksinimi karşılaması nedeniyle doğal bir ürün olmaktadır.

Kan basıncını dengelemeye yardımcı olması, kolon sađlığını iyileřtirmesi, plazma kolesterolünü dűřürmesi, emziren kadınlarda sűt üretimini artırması, mide suyu üretimini artırarak ve sindirimi kolaylařtırarak sindirimi kolaylařtırması gibi sađlık üzerinde birçok olumlu etkisi bulunmaktadır. Bu zelliklerin yanı sıra, Boza retimi için geleneksel tahıl olan darı, kuru ađırlıđının %0.1 ve %2'sini oluřturan hem ω -3 hem de ω -6 yađ asitlerinin kaynađı olmaktadır. Ω -3 yađ asidinin miyokard enfarktűsű, ani kardiyak lűm ve koroner kalp hastalıđı gibi önemli kardiyovaskűler riskini azalttıđı bilinmektedir [89]. Mevcut arařtırmalar, ω -3'űn aritmileri önleyebileceđini, kan basıncını dűřűrebileceđini ve meme, prostat, kolon ve böbrek gibi çeřitli kanser riskini azaltabileceđini vurgulamaktadır [97]. Bunun nedeni diyet lifine bađlanabilir. Diyet lifi, insan sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilmeyen, bitki hűcre duvarlarından elde edilen farklı tipteki karbondhidratların genel bir terimi olarak kabul edilir. Kilo kontrolűnű, kolesterol seviyesini, diyabeti etkileyebilir ve kardiyovaskűler hastalıklar, divertikűlit, varis, fitik hiatusu ve kolon kanserinin önlenmesinde faktűrdűr. Diyet liflerinin hacim oluřturma, viskozite ve fermentasyon olmak űzere ű ana etki mekanizması vardır. Farklı liflerin çeřitli etkilerinin olması genel sađlıđa katkıda bulunduđunu dűřűndűrtmektedir. Hacim oluřturan liflerin çođu ya fermente edilmez veya bađırsak yolu boyunca minimum dűzeyde fermente edilir. Suyu emme ve dıřkı ađırlıđını ve dűzenliliđini önemli lűde artırabilme zelliiine sahiptir. Viskoz lifler ise, bađırsak yolunun içeriđini kalınlařtırır ve řeker emilimini, yemekten sonra řeker tepkisini ve lipid emilimini azaltabilmektedir (zellikle kolesterol emilimi ile gösterilir). Gıda forműlasyonlarında kullanımları, viskoziteleri ve koyulařtırıcı etkileri nedeniyle genellikle dűřűk seviyelerle sınırlı olmaktadır. Bazı viskoz lifler ayrıca bađırsak yolu içinde kısmen veya tamamen fermente edilebilmektedir (guar zamkı, β -glukan, glukomannan ve pektinler). Fermente olabilen lifler ise, kalın bađırsaklardaki mikrobiyota tarafından tűketilmektedir [89].

Boza ayrıca, yűksek besin ve enerji içeriđine sahip olmasının yanı sıra sindirim sistemi űzerindeki rahatlatıcı etkisi nedeniyle de tűketilmektedir. Gűn içinde çok fazla enerji harcayanlar için vitamin kaynađı olarak ideal bir içecek olmaktadır. Bunun yanı sıra laktojenik zelliiinden dolayı hamilelere veya yeni dođum yapmıř kadınlara da önerilir. İki bardak bozanın bir yetiřkinin gűnlűk B vitamini ihtiyaını karřılayabildiđi yapılan çalıřmalarda belirtilmiřtir. Bozanın içerdiđi maddeler sinir

sistemi üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Boza üretiminde kullanılan tam tahıllar fenolik maddelerin kaynağını oluşturmaktadır. Gıdalardaki fenolikler, sağlığa yararlı etkileri nedeniyle insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Fenolik asitler, tahılların antioksidan potansiyeline katkıda bulunduklarından ve birçok dejeneratif hastalığa neden olan oksijen türevlerini ve serbest radikalleri engellediklerinden dolayı sağlığa faydalı olmaktadır [91]. Yapılan bir çalışmada Berktaş vd. [98] farklı oranlarda darı, bulgur, beyaz pirinç, kepekli pirinç ve mısırı kullanarak boza üretimini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada kullanılan hammaddelerin bozanın toplam fenolik ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisini ele almışlardır. Boza üretiminde bulgur+mısır ya da bulgur+kepekli pirinç kullanılmasının ticari boza örneğine kıyasla toplam fenolik ve antioksidan aktivitesini artırdığı belirtilmiştir [92]. Boza, A, C, E vitaminleri ve dört çeşit B vitamini içerdiği için fiziksel olarak aktif insanlar için değerli bir besindir ve tamamen bitki bazlı olması ve iyi bir vitamin kaynağı olması nedeniyle özellikle vejetaryenler ve veganlar için uygundur. Ayrıca süt bazlı içecekler için de iyi bir ikame oluşturur. Boza'nın insan sağlığı üzerindeki faydalı etkileri, üretimde kullanılan tahıl kaynaklarının prebiyotik özellikte olması ve probiyotik LAB'lerin doğrudan tüketilmesi gibi iki ana özelliğinden kaynaklanır [89].

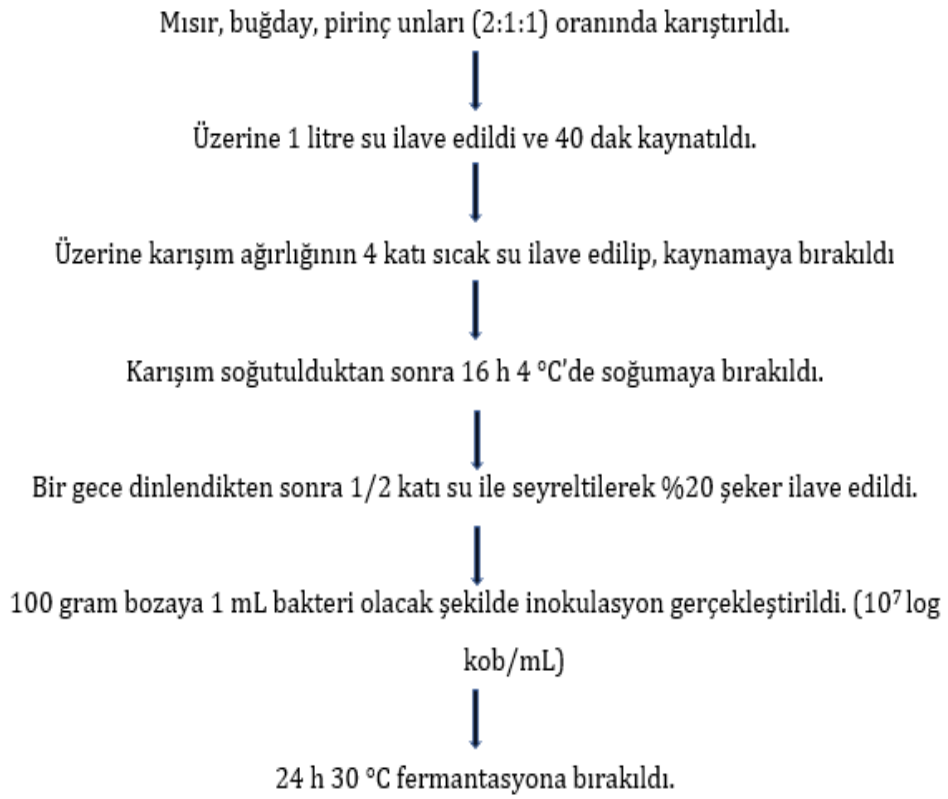
3.2 Materyal ve Yöntem

3.2.1 Bakteri Kültürlerinin Geliştirilmesi

Boza üretimi için yüksek GABA üreticisi ve ekşi hamurdan izole edilmiş KCO-48 *L. brevis* ATCC 14869 ve 45MK-30 *L. plantarum* JCM 1149 suşları kullanılmıştır. Boza üretimi için KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 ve 45MK-30 *Lb. plantarum* JCM 1149 suşları -80 °C'deki ana stoktan alınarak 10 mL MRS sıvı besiyerine %1 olacak şekilde inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra bakteriler 37 °C'de 24 h inkübasyona bırakılmıştır. Bakterilerin aktifleştirilmesi aynı koşullarda iki defa gerçekleştirilmiştir. İnokulasyondan sonra kültürler 4 °C, 10 dak, 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve iki defa steril FTS (%0.85 NaCl) ile yıkanmıştır. Hücre pelletleri steril tuzlu su çözeltisi içerisinde süspanse edilip, 10⁹ log kob/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra ayarlanan KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 ve 45MK-30 *Lb. plantarum* JCM 1149 kültürleri ilgili ham bozalara inokulasyonları gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak sadece ham boza hazırlanmıştır.

3.2.2 Ham Boza Yapımı

Çalışmada yapılan ham bozanın yapımı Şekil 3.1 'de verilmiştir.



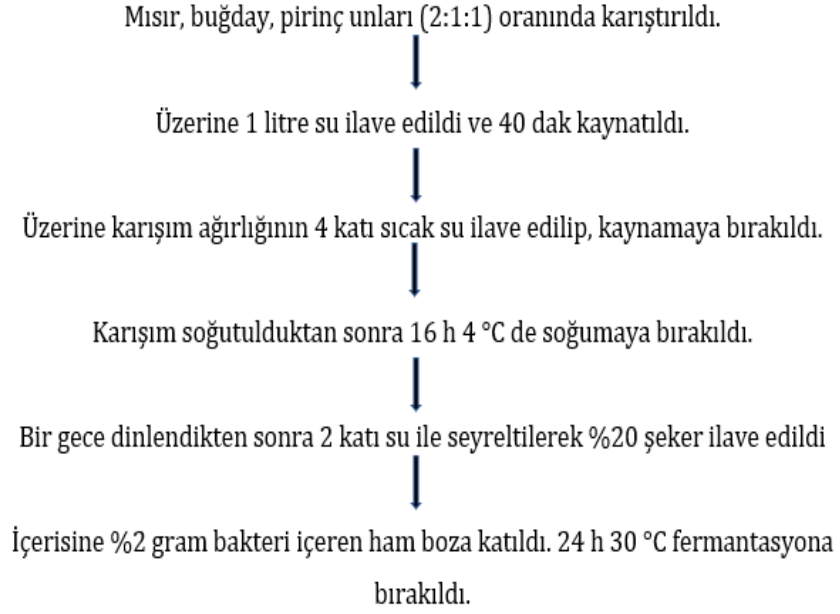
Şekil 3.1 Ham boza yapım aşamaları

3.2.3 Boza Üretimi

Ana bozanın yapımı MSG'li ve MSG'siz olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilmiştir. Boza fermantasyonu için kültür olarak KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 ve 45MK-30 *Lb. plantarum* JCM 1149 kullanılmıştır. MSG içermeyen boza örnekleri kontrol olarak alınmıştır.

3.2.4 MSG İçeren Boza Üretimi

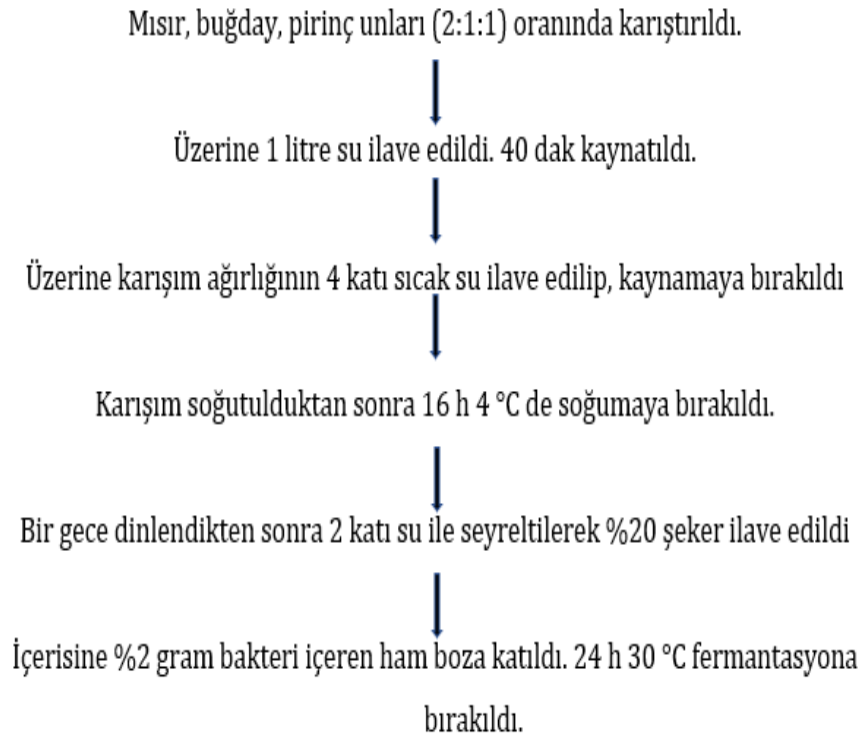
Çalışmada Şekil 3.2'de verilen akış diyagramına göre boza üretimleri gerçekleştirilmiştir. Bozanın kaynatılma aşamasında son hacimde 1.25 mg/ mL olacak şekilde MSG ilave edilmiş olup, üretimleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 MSG içeren boza yapım aşamaları

3.2.5 MSG İçermeyen Boza Üretimi

MSG içermeyen (kontrol) boza örneklerinin üretimleri Şekil 3.3’de göre yapılmıştır.



Şekil 3.3 MSG içermeyen (kontrol) boza yapım aşamaları

3.2.6 Boza Örneklerinde Mikrobiyolojik Analizlerin Yapılması

3.2.7 LAB Sayımı

Boza örneklerinden 10 gram alınarak, 90 mL FTS (%0.85 NaCl) içerisinde homojen hale getirilmiştir. Daha sonra uygun dilüsyonlar hazırlanmıştır ve MRS agar üzerine spot yöntemle (20 µL) ekim yapılmıştır. Petri plakaları 30 °C'de 48 saat inkübe edilmiş olup, inkübasyon sonunda koloniler sayılmıştır. Sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir.

3.2.8 Maya / Küf Sayımı

Seri dilüsyonlardan sonra dichloran rose-bengal chloramphenicol agar (DRBC, Merck, Germany) üzerine yayma yöntemle ekim yapılmış olup, petriler 25-30 °C'de 4-5 gün inkübasyona (Wise Cube) bırakılmıştır. Sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir.

3.2.9 pH ve Titre Edilebilir Asitlik (TTA)

Boza örneklerinin pH ölçümleri pH metre (İnolab) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Arslan vd. [99] çalışmalarında kullandıkları metoda göre yapılmıştır. Bunun için 5 gram boza örneği alınarak 25 mL saf su ile seyreltilmiş olup, pH metre ile pH ölçümleri belirlenmiştir. Toplam titre edilebilir asitlik pH ölçümlerinden sonra 0.1 N NaOH ile pH 8.1 olana kadar potansiyometrik titrasyon ile belirlenmiş olup, sonuçlar laktik asit cinsinden verilmiştir.

3.2.10 GABA Üretim Miktarlarının HPLC Analizi ile Belirlenmesi

Boza örnekleri 10 dak, 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlardan 100 µL, 100 µL dansil klorid solüsyonu ve 800 µL 0.2 M Sodyum borat: NaOH çözeltisi (pH 9.0) içerecek şekilde son hacim 1000 µL olarak hazırlanmıştır. Daha sonra miks ultrasonik banyoda 40 °C'de 30 dak inkübasyona tabi tutulmuştur. Ardından süpernatantları 12.000 rpm'de 10 dak santrifüjlenerek toplandı ve MeOH (1:1) ile seyreltilip, HPLC aşamasında kullanılmıştır. Türevlendirilen örnekler, flurometrik detektörde 293 nm ve 492 nm dalga boyuna sahip yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC-RID, Shimadzu) sistemine enjekte edilmiştir. Ayrışma 25 °C sıcaklığındaki inertsil ODS (GL Sciences, 3, 5 µm, 4.6x 250 mm) kolon ile sağlanmıştır. Mobil faz olarak pH 4.1 Asetat/CH₃CN (Solvent A: 6.25 mL CH₃COOH, 1.97 g CH₃COONa, 200 mL CH₃CN alınıp, 1 litre su ile dolduruldu) ve asetonitril (Solvent B) hazırlanarak

%50 solvent A ve %50 solvent B kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 mL/min olacak şekilde ayarlanmıştır [56].

3.2.11 Boza Örneklerinin Viskoelastik Özelliklerinin Reometre ile Belirlenmesi

Boza örneklerinin viskoelastik özelliklerinin belirlenmesi için kesme kontrollü ve peltier sistemli bir reometre (Anton Paar, MCR 302, Avusturya) kullanılmıştır. Prob olarak PP50 kullanılmıştır. Başlangıçta lineer viskoelastik bölgeyi belirlemek için genlik tarama testi %0,1 ve %100 gerinim aralığında gerçekleştirilmiş ve bunun sonucuna göre frekans tarama testi 0,1-10 Hz frekans ve 0,1-64 (ω) açısal hız aralığında çalışılmıştır. Açısal hız ve frekans değerine karşılık gelen elastik modülü (G') ve viskoz modülü (G'') değerleri tespit edilmiştir. K:viskozite katsayısı (kıvam katsayısı), ω :kesme hızı (açısal frekans), n :akış indeksi'ni ifade etmektedir. Model olarak ise Power law model kullanılarak modellenmiştir (Denklem 3.1).

Power-law model:

$$\begin{aligned} G' &= K'(\omega)^{n'} \\ G'' &= K''(\omega)^{n''} \\ \eta^* &= K^*(\omega)^{n^*-1} \end{aligned} \quad (3.1)$$

K:viskozite katsayısı (kıvam katsayısı)

ω :kesme hızı (açısal frekans)

n :akış indeksi

3.2.12 Renk Analizi

Boza örneklerinde renk ölçümü yapabilmek için CR-400 kolorimetre aleti (Konica Minolta Inc., Japan) kullanılmıştır. Sonuçlar L^* değeri koyuluk/parlaklık (100-beyaz), a^* değeri kırmızı (+a)/yeşile (-a), b^* değeri ise sarı (+b)/mavi (-b) olarak ifade edilmiştir.

3.2.13 Boza Örneklerindeki Şeker İçeriğinin HPLC ile Belirlenmesi

Şekerlerin bozadan ekstrakte edilmesi için boza örneklerinden 1 gram tartılmıştır ve 2.5 mL ultra saf su içerisinde ultra-turraks yardımı ile homojenize edilmiştir. Daha sonra 10 dak, 5000 rpm'de santrifüj (Universal, 320 R Hettich) edilmiştir.

Süpernatantlar şırınga ile 0.45 µm filtrelerden geçirilerek safsızlıklardan arındırılmıştır. Bu şekilde örnekler RID-10A refraktif indeks dedektörüne sahip yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC-RID, Shimadzu) sistemine enjekte edilmek için hazır hale getirilmiştir. CARBOsep CHO-682 Pb kolon kullanılmış olup, sıcaklığı 80 °C'de sabit tutulmuştur. Akış hızı 0.4 mL/min, enjeksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.14 Duyusal Değerlendirmenin Yapılması

Boza örneklerine uygulanan duyusal analizler için Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki lisansüstü öğrenciler olarak 10 panelist seçilmiştir. Bozaya özgü tanımlayıcılar; renk, koku, tat, kıvam ve genel kabul edilebilirlik parametrelerini içermektedir. Örneklerle uygulanan kabul edilebilirlik 7 hedonik skala (1: çok kötü, 7: çok iyi) üzerinden puanlanmıştır. Bozalar hem fermentasyon süresince hem de 4 °C'de saklama koşullarında belirlenen günlerde duyusal teste tabi tutulmuştur. Duyusal analiz, uygun sıcaklıktaki bir odada açık oturuşta yapılmıştır.

3.2.15 İstatistiksel Analiz

One-way ANOVA metodu için tüm analizlerin verileri için JMP 9 programı kullanılarak uygulanmıştır. Ortalama karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılarak $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.3 Araştırma Bulguları ve Tartışma

3.3.1 Mikrobiyolojik Analiz

Boza örneklerinin fermentasyon ve depolama sırasında mikrobiyolojik özelliklerinde meydana gelen değişimler Tablo 3.2'de verilmiştir. Çalışmada yapılan boza örneklerine ait görsel ise Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Fermentasyon süreleri kendi aralarında, depolama sürecine bağlı olan mikrobiyolojik değişimler kendi aralarında değerlendirilmeye çalışılmıştır. Fermentasyon süresinde 0.saatte başlangıçta tüm örneklerdeki LAB sayısı yaklaşık 7.0 log kob/mL olarak belirlenmiş olup, fermentasyon zamanı 72. saat olunca yaklaşık 0.8 log artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca fermentasyon süresinin artmasıyla MSG'li boza üretimindeki LAB sayılarının MSG içermeyen örnekteki LAB sayılarına kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür ve bu sayı 72.saatte yaklaşık 9.0 log kob /mL ulaşmıştır.

Depolama süresine bakıldığı zaman ise; 0 ve 3.gün örneklerindeki LAB sayısının yaklaşık olarak aynı olduğu gözlemlenmiş olup, depolama süresi arttıkça LAB sayısında azalma meydana geldiği ve bu azalmanın da yaklaşık 0.6 logaritmik birim olduğu söylenebilir. Boza örneklerimizde hem fermentasyon zamanında hem de depolama süresinde maya/küf sayımında gelişme olmamış olup, sayım yapılamamıştır.

Arıcı vd. [100] çeşitli yerel marketlerden satın aldıkları 9 farklı boza örneğinin mikrobiyolojik LAB sayımının 6.46-10.31 log kob/mL arasında olduğunu kaydetmişlerdir. Bir başka çalışma ise Arslan vd. [99] tarafından yapılmıştır. Çalışmada probiyotik boza üretimi gerçekleştirilmiştir. *L. acidophilus* sayımının fermentasyonun 0.saatinde 6.39 log kob /mL olduğunu, fermentasyon süresinin artmasıyla bu sayının 24.saatte 6.84 log kob /mL ulaştığı kaydedilmiştir. Aynı zamanda depolamanın 15.gününde ise *L. acidophilus* sayısında azalma gözlemlenmiş olup, 5.70 log kob /mL olmuştur. Fermentasyon zamanındaki LAB sayısındaki artış ve depolamada ise azalma meydana gelmesi çalışmamızla benzerlik göstermiştir.



Şekil 3.4 Boza üretimine ait görüntüler

Tablo 3.2 Boza örneklerinin fermantasyon zamanı ve depolama günlerindeki LAB sayımı (log kob /mL)

		Örnek Kodu	LAB
Fermantasyon süresi (saat)	0	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	7.37±0.21 ^{Ba}
		B (<i>L. brevis</i>)	7.61±0.13 ^{Ba}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	7.52±0.00 ^{Ca}
		D (<i>L. plantarum</i>)	7.52 ±0.00 ^{Ca}
	24	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	9.06 ±0.01 ^{Aa}
		B (<i>L. brevis</i>)	8.96 ±0.02 ^{Ab}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	8.87±0.01 ^{Bc}
		D (<i>L. plantarum</i>)	8.84 ±0.02 ^{Bc}
	48	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	9.16 ±0.01 ^{Aa}
		B (<i>L. brevis</i>)	8.97 ±0.05 ^{Ab}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	9.15 ±0.01 ^{Aa}
		D (<i>L. plantarum</i>)	8.98±0.01 ^{ABb}
	72	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	9.16 ±0.02 ^{Aa}
		B (<i>L. brevis</i>)	8.93 ±0.01 ^{Ab}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	9.15 ±0.01 ^{Aa}
		D (<i>L. plantarum</i>)	9.14 ±0.08 ^{Aa}
Depolama zamanı (gün)	0	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	9.16 ±0.01 ^{Aa}
		B (<i>L. brevis</i>)	8.97 ±0.05 ^{Ab}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	9.15 ±0.01 ^{Aa}
		D (<i>L. plantarum</i>)	8.98±0.01 ^{Ab}
	3	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	9.14 ±0.06 ^{Aa}
		B (<i>L. brevis</i>)	8.93 ±0.01 ^{ABb}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	9.06 ±0.02 ^{Aa}
		D (<i>L. plantarum</i>)	8.87 ±0.01 ^{Ab}
	6	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	8.80 ±0.07 ^{Ba}
		B (<i>L. brevis</i>)	8.58 ±0.10 ^{BCa}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	8.80 ±0.08 ^{Ba}
		D (<i>L. plantarum</i>)	8.70 ±0.07 ^{Ba}
	9	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	8.56 ±0.08 ^{Bb}
		B (<i>L. brevis</i>)	8.34 ±0.15 ^{Cbc}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	9.04 ±0.03 ^{Aa}
		D (<i>L. plantarum</i>)	8.06 ±0.01 ^{Cc}

*Büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı örneklerin zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05).

*Küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar farklı örneklerin aynı zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Öztürk vd. [101] yaptıkları çalışmada ise depolama süresinin artmasıyla LAB sayısında artış meydana geldiğini kaydetmişlerdir. Tornuk vd. [102] çalışmalarında inokulasyonun başlangıcında 10⁵-10⁶ log kob /mL arasında bakteri inokulasyonu yaptıklarını toplam bakteri sayımında bu sayının fermantasyon zamanının artmasıyla yaklaşık 10.5 log kob /mL ulaştığını gözlemlemişlerdir. Yapılan tüm çalışmalar değerlendirildiğinde LAB ve maya popülasyonları bir numuneden

diğerine önemli ölçüde değışiklik gösterdiği ve bu değışimin de boza fermentasyonunda kullanılan starter kültür çeşidine, fermentasyon koşullarına (zaman ve sıcaklık), toplam asitliğe ve organik aside dönüşen substrat türünden kaynaklandığı söylenebilir [100]. Çünkü boza, fermente bir içecek olduğundan fermentasyon florasında çeşitlilik arz eder. LAB ve maya sayılarında meydana gelen farklılıklar bozanın genel özelliklerini tanımlamaktadır. Bu sayılan parametrelere ilaveten boza mikrobiyota bileşimi, kullanılan tahıl tipine, üretim mevsimine, sıcaklıklara, üretim süreçlerine ve depolama koşullarına bağlı olarak da büyük farklılıklar gösterebilmektedir [103].

3.3.2 pH ve TTA Değişimi

Boza numunelerinin fermentasyon süreleri ve depolama olmak üzere bu iki parametreye karşı pH değışimleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Şekilden anlaşılacağı gibi tüm örneklerin başlangıç pH değeri yaklaşık 6.50 olduğu ve fermentasyon süresinin artması ile pH değeri bir azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Depolamadaki pH değeri ise depolama süresince hemen hemen hiç değışmediği ve depolamanın 9.gününde pH değeri 3.50 olduğu söylenebilir. Ayrıca boza örneklerine MSG katılmasının pH üzerinde bir değışiklik yaratmadığı kaydedilmiştir.

Tornuk vd. [102] yaptıkları probiyotik bozaların pH değışiminin 24.saatte yaklaşık 4.08 olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *L. casei shirota* içeren bozalardaki pH değeri ise fermentasyon süresince birbirine yakın olduğunu vurgulamışlardır. Genellikle boza, pH 3.5'e yaklaştığında tüketim için kabul edilebilir olduğu söylenmiştir. Yapılan çalışmalara ek olarak bir çalışma da Hancıoğlu ve Karapınar [104] tarafından yapılmıştır. Fermentasyon sırasında pH'ın 6.13'ten 3.48'e düştüğünü gözlemlemişlerdir. Buğday, mısır, pirinç ve darı boza örneklerindeki pH değeri ise 3.43 ile 3.86 arasında değıştiği belirlenmiştir [105].

Tablo 3.3 Boza örneklerine ait pH ve TTA değişimleri

		Örnek Kodu	pH	TTA (% Laktik asit)
Fermantasyon süresi (saat)	0	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	6.60±0.01 ^{Aa}	0.15±0.01 ^{Ca}
		B (<i>L. brevis</i>)	6.31±0.02 ^{Aa}	0.19±0.01 ^{Da}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	6.69±0.01 ^{Aa}	0.16±0.01 ^{Ca}
		D (<i>L. plantarum</i>)	6.49±0.01 ^{Aa}	0.15±0.01 ^{Da}
	24	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	3.72±0.02 ^{Bb}	0.37±0.02 ^{Bb}
		B (<i>L. brevis</i>)	3.59±0.01 ^{Bb}	0.40±0.01 ^{Cab}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	3.77±0.01 ^{Bb}	0.36±0.01 ^{Bb}
		D (<i>L. plantarum</i>)	3.59±0.01 ^{Bb}	0.44±0.01 ^{Ca}
	48	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	3.58±0.10 ^{Cc}	0.46±0.02 ^{Ab}
		B (<i>L. brevis</i>)	3.43±0.01 ^{Cc}	0.68±0.01 ^{Aa}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	3.61±0.01 ^{Cc}	0.48±0.01 ^{Ab}
		D (<i>L. plantarum</i>)	3.43±0.01 ^{Cc}	0.64±0.02 ^{Aa}
	72	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	3.50±0.01 ^{Dd}	0.48±0.01 ^{Aa}
		B (<i>L. brevis</i>)	3.33±0.01 ^{Dd}	0.53±0.01 ^{Ba}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	3.53±0.01 ^{Dd}	0.51±0.01 ^{Aa}
		D (<i>L. plantarum</i>)	3.37±0.01 ^{Dd}	0.52±0.01 ^{Ba}
Depolama zamanı (gün)	0	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	3.58±0.01 ^{Aa}	0.46±0.01 ^{Bb}
		B (<i>L. brevis</i>)	3.43±0.01 ^{Bb}	0.68±0.01 ^{Aa}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	3.61±0.01 ^{Aa}	0.48±0.01 ^{ABb}
		D (<i>L. plantarum</i>)	3.43±0.01 ^{Bb}	0.64±0.02 ^{ABa}
	3	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	3.57±0.01 ^{Ab}	0.53±0.00 ^{Ab}
		B (<i>L. brevis</i>)	3.42±0.01 ^{Bc}	0.68±0.01 ^{Aa}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	3.60±0.01 ^{Aa}	0.50±0.02 ^{ABb}
		D (<i>L. plantarum</i>)	3.42±0.01 ^{Bc}	0.67±0.02 ^{ABa}
	6	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	3.52±0.01 ^{Ba}	0.48±0.01 ^{Bb}
		B (<i>L. brevis</i>)	3.38±0.01 ^{Cb}	0.67±0.01 ^{Aa}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	3.54±0.01 ^{Ba}	0.51±0.01 ^{Ab}
		D (<i>L. plantarum</i>)	3.39±0.01 ^{Cb}	0.69±0.02 ^{Aa}
	9	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	3.59±0.01 ^{Aa}	0.40±0.01 ^{Cd}
		B (<i>L. brevis</i>)	3.47±0.01 ^{Ab}	0.67±0.01 ^{Aa}
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	3.60±0.01 ^{Aa}	0.45±0.01 ^{Bc}
		D (<i>L. plantarum</i>)	3.46±0.01 ^{Ab}	0.60±0.01 ^{Bb}

*Büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı örneklerin zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05).

*Küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar farklı örneklerin aynı zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Bu çalışmada yapılan tüm boza örneklerindeki pH değişimi 3.40 ile 3.60 arasında olmuştur. pH değerleri ile benzer bulgular, yulaf bazlı boza üretiminde kullandığı suşların etkisini araştıran Göktepe ve Elgün [106] tarafından rapor edilmiştir. Fermantasyon başlangıcında numunelerin pH değerleri 6.28 ile 5.80 arasında

değiştirdiği ve değişimin fermentasyon sonunda 5.67-4.76'a ulaştığı belirtilmiştir. Ayrıca Rathore vd. [107] tarafından yapılan çalışmada iki probiyotik suşun tek ve karışık tahıl substratlarının fermentasyonu üzerindeki etkisini araştırmaları ile fermentasyon sonunda karışık ve tekli tahıl ortamında pH değerinin 3.5'in altında olduğu belirtilmiştir. Boza ile ilgili yapılan bir başka çalışma ise Arslan-Tontul ve Erbas [108] tarafından yapılmıştır. Çalışmalarındaki boza pH değerlerinin sadece fermentasyon süresinden etkilendiğini ($p<0.01$) vurgulamışlardır. Fermentasyon ve depolama sırasında numunelerin ortalama pH değerleri ise sırasıyla 4.83 ve 3.96 olmuştur. Bu sonuçların bulgularımızdan biraz yüksek olduğu görülmüştür. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde sonuçlarımız belirtilen çalışmalarla paralellik göstermiştir. pH değerlerinde azalma meydana gelmesi LAB sayısındaki artma ile ilişkili olması düşünülebilir.

Boza örneklerinde titre edilebilir asitlik ve pH değerlerinin fermentasyon ve depolama sırasında mikroorganizmalar tarafından değiştirildiği gözlemlenmiştir. Tablo 3.3'den görüleceği gibi fermentasyonun başlangıcındaki TTA değerleri laktik asit cinsinden %0.15 ile %0.19 arasında değişim gösterirken, 24.saatteki pH değerindeki hızlı düşüşe bağlı olarak TTA değerlerinde de pozitif yönde bir artış meydana gelmiştir ve bu değişim %0.36 ile %0.44 arasında olmuştur. Kültür tipinin titre edilebilir asitlik değerleri üzerinde fermentasyon başlangıcında olduğu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p<0.05$) etki ettiği fakat iki suş arasında bir farklılık olduğu görülmemiştir. Fermentasyon sırasında numunelerin pH değerlerinde düşüş meydana gelirken, toplam titre edilebilir asitlikte sürekli bir artma meydana gelmiştir. Bu sonuçlar pH değerlerinde azalış meydana gelmesinin ana sebebinin fermentasyon sırasındaki mikrobiyolojik aktiviteye atfedilebilir [106].

3.3.3 Boza Örneklerindeki GABA İçeriğinin Belirlenmesi

γ -Aminobütirik asit (GABA), önemli fizyolojik işlevleri ve birçok hastalığın tedavisine veya önlenmesine yardımcı olan olumlu sağlık etkilerine sahip olmaktadır. Bu nedenle büyük pazar talebi olan güçlü bir biyoaktif bileşik olmaktadır. GABA, bazı meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunmasına rağmen konsantrasyonu 0.03-2.00 $\mu\text{mol/g}$ arasında olup, oldukça düşük biyolojik aktivite sergilemektedir [108]. Bu yüzden GABA ile zenginleştirilmiş gıdaların

fermantasyon yoluyla formülasyonu ve GABA'nın fizyolojik fonksiyonel rollere sahip olması ve sağladığı birçok sağlık yararı nedeniyle yüksek popülerlik kazanmaktadır. GABA ile zenginleştirilmiş birçok gıda ürününün GRAS organizmaların fermentasyonu yoluyla elde edildiği ve ticari olarak temin edildiği belirtilmiştir. Bu tahıl bazlı fonksiyonel gıdalar (ekşi maya, ekmek, kinoa gevreği, esmer pirinç, fermente yulaf vb.) ve peynir, süt, yoğurt gibi süt ürünlerinde ve adzuki fasulyesi, siyah soya fasulyesi, siyah soya fasulyesi ve tempeh benzeri fermente edilmiş soya fasulyesi gibi baklagiller olmaktadır [30].

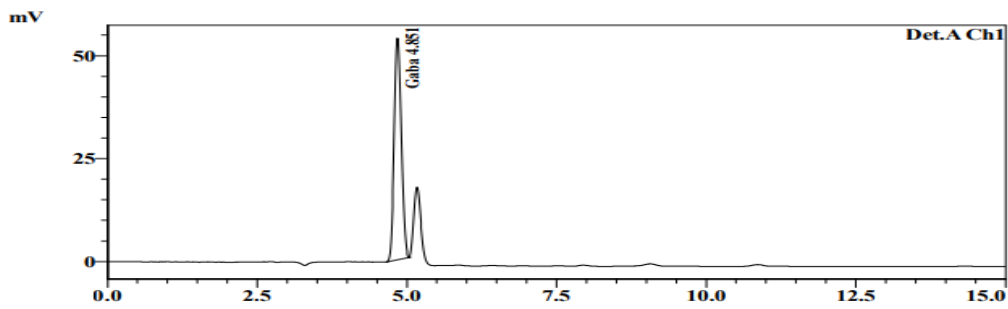
Tablo 3.4 Boza örneklerinin GABA üretim miktarları (mg/mL)

		Örnek Kodu	GABA üretim miktarı (mg/mL)
Fermantasyon süresi (saat)	0	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	0.0028±0.001
		B (<i>L. brevis</i>)	-
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	0.0061±0.000
		D (<i>L. plantarum</i>)	-
	24	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	0.081±0.000
		B (<i>L. brevis</i>)	-
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	0.074±0.002
		D (<i>L. plantarum</i>)	-
	48	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	0.080±0.003
		B (<i>L. brevis</i>)	-
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	0.130±0.014
		D (<i>L. plantarum</i>)	-
	72	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	0.033±0.003
		B (<i>L. brevis</i>)	-
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	0.069±0.004
		D (<i>L. plantarum</i>)	-
Depolama zamanı (gün)	0	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	0.080±0.003
		B (<i>L. brevis</i>)	-
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	0.130±0.014
		D (<i>L. plantarum</i>)	-
	3	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	0.057±0.002
		B (<i>L. brevis</i>)	-
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	0.085±0.013
		D (<i>L. plantarum</i>)	-
	6	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	0.047±0.042
		B (<i>L. brevis</i>)	-
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	0.085±0.009
		D (<i>L. plantarum</i>)	-
	9	A (MSG+ <i>L. brevis</i>)	0.054±0.001
		B (<i>L. brevis</i>)	-
		C (MSG+ <i>L. plantarum</i>)	0.054±0.000
		D (<i>L. plantarum</i>)	-

Çalışmamızda tahıl bazlı fermente bir içecek olan bozada, ekşi hamurdan izole ettiğimiz 45MK-30 *L. plantarum* JCM 1149 ve KCO-48 *L. brevis* ATCC 14869 suşları kullanılmıştır ve bozada GABA üretim potansiyelleri değerlendirilmiştir. Boza üretiminde fermentasyon zamanı ve depolama sürecinin GABA üretimi üzerindeki etkisi Tablo 3.4’de gösterilmiştir. Fermentasyon süresinin başlangıcında *L. plantarum*+MSG’li boza örneğinin GABA üretim miktarının *L. brevis*+MSG içeren boza örneğinden fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca fermentasyonun 48.saatine kadar boza örneklerinde GABA miktarının arttığı ve 72.saatte bu miktarların azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bu azalmanın depolama zamanına bağlı olarak devam ettiği kaydedilmiştir. Yapılan çalışmalarda önerilen GABA alımı ve toksik dozu henüz belirlenmediği gözlemlenmiştir. Klinik bir çalışmada dört haftalık GABA (günlük 300 mg) uygulamasının olumsuz bir etki meydana getirmediği kaydedilmiştir [109].

Çalışmamızda MSG içermeyen örnekler kontrol olarak yapılmıştır ve kontrol örneklerinde GABA üretiminin gerçekleştirilmediği gözlemlenmiştir. Fermente gıdalarda GABA oluşumu, büyüme koşullarına, coğrafi bölgelere, doğal mikrobiyota popülasyonuna, fermentasyon tekniğine ve çevresel koşullara bağlı olarak önemli ölçüde değiştiği söylenebilir [110]. Son yıllarda, laktik asit bakterilerinden (LAB) yararlanılarak GABA ile zenginleştirilmiş gıdaların geliştirilmesi çok dikkat çekmiştir. Bunlardan biri de Khanlari vd. [111] tarafından yapılan çalışma olmuştur. Ekşi hamurdan izole ettikleri ve GABA üretim miktarının yüksek olduğunu belirttikleri *Enterococcus faecium* MDM21 ve *Weissella confusa* MDM8 suşlarını tekli veya ortak kültür olarak *Lactococcus lactis subsp. lactis* BRM3 suşu ile kullanmışlardır. Sonuç olarak bu kültürlerin *Lactococcus lactis subsp. lactis* BRM3 ile birlikte kullanılmasının daha yüksek GABA konsantrasyonu ve daha düşük fermentasyon süresi ortaya konduğunu ve fermentasyon süresinin arttıkça GABA üretim miktarlarının arttığını gözlemlemişlerdir. Shan vd. [112] tarafından GABA substratı olarak MSG’nin kullanılması ile yoğurtta GABA üretim miktarı değerlendirilmiştir. Yoğurttaki GABA üretim miktarının 314.5 mg/100 mL olduğu belirtilmiştir. Dikkat çekici ana farkın sebebinin MSG’nin eklenmesinin olabileceği düşünülmüştür. Çünkü fermente gıdalarda GABA konsantrasyonu; pH, inkübasyon zamanı, sıcaklık, ortam bileşimi ve inokulasyon konsantrasyonundan etkilenebilmektedir [111]. Kittibunchakul vd. [109] tarafından ise kahverengi pirinç

sütünün probiyotik fermentasyonu ile bir GABA içeceği geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için Tayland turşusundan izole edilen ve GABA üreten *Lactobacillus pentosus* 9D3 suşu kullanılmıştır. Ayrıca kahverengi pirinç sütünde maya ekstraktı, izole edilmiş soya proteini ve piridoksin hidroklorür kullanılmıştır. Bunların GABA üretimini (14.3 mg/100 mL) önemli derecede artırdığı belirtilmiştir. Sonuçlarımız paralellik göstermiş olup, fermentasyonu süresinin artması ile üretilen GABA miktarında artış görülmüştür ve *L. plantarum*+MSG içeren boza ürünümüzdeki GABA üretim miktarının 48.saatteki fermentasyon sonucunda 0.130 mg/mL (1.25 mg/mL MSG ortamında) ulaştığı kaydedilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 *L.plantarum*+MSG içeren boza ürünündeki GABA üretim miktarına ait HPLC Kromatogramı

Jin vd. [113] yaptıkları çalışmada GABA üreten suş ile fermente edilmiş yeşil çayın antioksidan aktivitesi ve biyoaktif bileşik içeriği değerlendirilmesi için optimizasyon amaçlanmıştır. 25 izolat arasında *Lactobacillus brevis* GTL 79 suşunun ($324.07 \pm 62.04 \mu\text{g/mL}$) GABA üretim potansiyeline sahip olduğu gözlemlenmiştir. Araştırma sonucunda optimize edilmiş koşullar, %1 fermentasyon alkolü, %6 glikoz ve %1 MSG takviyesi ile 37°C 'de fermentasyon olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar değerlendirildiği zaman özellikle, *L. brevis*'in diğer LAB'den önemli ölçüde daha yüksek GABA üretimine sahip olduğu ve bu nedenle sıklıkla fermente gıdalar için starter kültürlerde kullanıldığı bildirilmiştir [114].

3.3.4 Dinamik Reolojik Özellik

Boza örneklerindeki önemli olan bir diğer parametre viskoelastik özelliklerin belirlenmesi olmaktadır. Bu bağlamda boza örneklerinin reolojik özellikleri fermentasyon başlangıcından itibaren hem fermentasyon süresince hem de depolama zamanlarında meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişikliklerin boza ürünlerine yansımaları amacıyla incelenmiştir. Boza örneklerinin viskoelastik özellikleri frekans tarama testinde altında ölçülmüş olup, K' ve K'' değerlerinin frekansa bağlı değişimi Tablo 3.5'de verilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler Power-law modele göre uyarlanmıştır. K' değeri örneğin elastik olarak kıvam katsayısını ifade ederken, K'' değeri ise örneğin viskoz olarak kıvam katsayısını ifade etmektedir. Hem depolama süresince hem de fermentasyon süresinin artması sonucunda elastik özelliğin, viskoz özellikten büyük olduğu ($K' > K''$) görülmüştür. Ayrıca tüm örneklerdeki R^2 determinasyon katsayısı 0.98-0.99 olarak bulunmuştur. R^2 değeri analizler sonucunda elde edilen deneysel veriler ile model kullanılarak elde edilen tahmini verilerin yakınlığını temsil etmektedir. Görüldüğü gibi R^2 değeri 1'e yakın bulunmuştur. Bu durum Power-Law model ile başarılı bir şekilde açıklandığını göstermektedir. Tüm frekans aralığında G' değerlerinin G'' değerlerinden yüksek olduğu tespit edilmiş olup, viskozdan ziyade elastik bir yapıya sahip olmuştur. Çalışmalarımız Arıcı vd. [100] yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermiştir. Sonuç olarak bozanın reolojik özellikleri, ürün tercihini etkileyen en önemli kalite göstergelerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yüzden reolojik özellikleri etkileyen birincil faktörlerin de ürünün kalitesinin kontrol edilmesinde önemli olması gerekmektedir.

Tablo 3.5 Boza örneklerinin power-law modeline göre viskoelastik özellikleri

		Örnek kodu	$G' = K'(\omega)^{n'}$			$G'' = K''(\omega)^{n''}$		
			$K'(\text{Pa})$	n'	R^2	$K''(\text{Pa})$	n''	R^2
Fermantasyon süresi (saat)	0	A	104.5±15.1 ^{Aab}	0.15±0.01 ^{Aa}	0.99	18.84±1.09 ^{Aa}	0.26±0.01 ^{Ab}	0.99
		B	48.1±0.16 ^{Ac}	0.19±0.00 ^{Aa}	0.98	9.12±0.01 ^{Ab}	0.33±0.02 ^{Aa}	0.99
		C	124.3±12.8 ^{Aa}	0.14±0.01 ^{Ba}	0.99	21.94±1.36 ^{Aa}	0.25±0.01 ^{Bb}	0.99
		D	64.2±16.6 ^{Abc}	0.17±0.02 ^{Aa}	0.99	12.27±2.50 ^{Ab}	0.29±0.06 ^{Aab}	0.98
	24	A	62.3±7.33 ^{Bb}	0.18±0.01 ^{Aa}	0.99	12.94±1.09 ^{Bb}	0.31±0.01 ^{Aa}	0.99
		B	49.2±1.35 ^{Ab}	0.18±0.00 ^{ABa}	0.98	9.31±0.69 ^{Ac}	0.31±0.02 ^{Aa}	0.99
		C	89.3±7.35 ^{Ba}	0.16±0.01 ^{ABa}	0.99	16.13±0.18 ^{Ba}	0.28±0.06 ^{Aa}	0.99
		D	58.9±1.97 ^{Ab}	0.17±0.01 ^{Aa}	0.98	10.94±0.61 ^{Abc}	0.29±0.02 ^{Aa}	0.98
	48	A	93.8±4.86 ^{ABa}	0.15±0.01 ^{Aa}	0.99	16.59±0.59 ^{ABa}	0.27±0.01 ^{Aa}	0.99
		B	49.5±0.50 ^{Ab}	0.18±0.00 ^{ABa}	0.98	8.44±0.35 ^{Aa}	0.32±0.03 ^{Aa}	0.99
		C	63.6±3.86 ^{Bab}	0.17±0.01 ^{Aa}	0.99	12.53±0.48 ^{Ca}	0.29±0.01 ^{Aa}	0.99
		D	58.1±18.7 ^{Aab}	0.18±0.01 ^{Aa}	0.98	13.16±6.58 ^{Aa}	0.26±0.06 ^{Aa}	0.97
	72	A	69.2±8.58 ^{ABa}	0.18±0.01 ^{Aa}	0.99	14.20±1.46 ^{Ba}	0.29±0.02 ^{Aa}	0.99
		B	58.4±6.05 ^{Aa}	0.17±0.01 ^{Ba}	0.98	10.27±0.05 ^{Ab}	0.30±0.01 ^{Aa}	0.99
		C	74.3±4.87 ^{Ba}	0.17±0.01 ^{Aa}	0.99	13.80±0.15 ^{BCab}	0.31±0.01 ^{Aa}	0.99
		D	61.08±3.9 ^{Aa}	0.17±0.00 ^{Aa}	0.98	11.26±0.93 ^{Aab}	0.28±0.01 ^{Aa}	0.99
Depolama süresi (gün)	0	A	93.8±4.86 ^{Ba}	0.15±0.01 ^{Aa}	0.99	16.59±0.59 ^{Ba}	0.27±0.01 ^{Aa}	0.99
		B	49.5±0.50 ^{Bb}	0.18±0.00 ^{ABa}	0.99	8.44±0.35 ^{ABa}	0.32±0.01 ^{Aa}	0.99
		C	63.6±3.87 ^{Bab}	0.17±0.01 ^{Aa}	0.99	12.53±0.48 ^{Ba}	0.29±0.01 ^{Aa}	0.99
		D	58.1±18.7 ^{Aab}	0.18±0.01 ^{Aa}	0.99	13.16±6.58 ^{Aa}	0.26±0.06 ^{Aa}	0.99
	3	A	74.8±9.54 ^{Bab}	0.17±0.01 ^{Aa}	0.98	14.28±0.05 ^{Bab}	0.28±0.01 ^{Aa}	0.99
		B	66.2±5.19 ^{Aab}	0.16±0.01 ^{BCa}	0.99	13.57±2.92 ^{Aab}	0.24±0.01 ^{Aa}	0.99
		C	93.0±9.84 ^{Ba}	0.16±0.00 ^{ABa}	0.99	17.32±0.00 ^{Ba}	0.21±0.06 ^{Aa}	0.99
		D	55.7±0.06 ^{Ab}	0.17±0.01 ^{Aa}	0.99	10.68±0.34 ^{Ab}	0.29±0.01 ^{Aa}	0.99
	6	A	91.5±1.16 ^{Bb}	0.16±0.00 ^{Ab}	0.98	16.90±0.05 ^{Bb}	0.27±0.01 ^{Aab}	0.99
		B	40.6±1.72 ^{Bd}	0.19±0.00 ^{Aa}	0.99	7.08±0.05 ^{Bd}	0.32±0.03 ^{Aa}	0.99
		C	154.7±5.9 ^{Aa}	0.14±0.00 ^{BCc}	0.99	29.00±1.92 ^{Aa}	0.21±0.01 ^{Ab}	0.99
		D	66.8±2.64 ^{Ac}	0.15±0.00 ^{Ab}	0.99	12.66±0.72 ^{Ab}	0.24±0.01 ^{Ab}	0.99
	9	A	123.6±9.2 ^{Ab}	0.14±0.00 ^{Ab}	0.98	21.59±1.55 ^{Ab}	0.23±0.01 ^{Abc}	0.99
		B	66.8±0.98 ^{Ac}	0.15±0.01 ^{Cb}	0.99	12.22±0.25 ^{ABc}	0.25±0.01 ^{Aab}	0.99
		C	180.2±19.7 ^{Aa}	0.13±0.01 ^{Cb}	0.99	32.93±2.89 ^{Aa}	0.20±0.01 ^{Ac}	0.99
		D	43.7±8.94 ^{Ac}	0.18±0.01 ^{Aa}	0.99	8.47±0.00 ^{Ac}	0.28±0.01 ^{Aa}	0.99

*Büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı örneklerin zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05).

*Küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar farklı örneklerin aynı zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05). (A: MSG+*L. brevis*, B: *L. brevis*, C: MSG+*L. plantarum*, D: *L. plantarum*)

Fermantasyon ve depolama boyunca MSG içeren boza örneklerinin kontrol örneklerine (MSG içermeyen) nazaran hem K' değerlerinin K'' değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Genç vd. [115] çalışmalarında boza örneklerinin reolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapmış oldukları ölçümlerde psödoplastik davranış sergilediklerini saptamışlardır. Boza üretiminde standardizasyonun sağlanamaması örneklerdeki reolojik özelliklerin farklılaşmasına sebebiyet verdiği düşünülebilir.

3.3.5 Renk Analizi

Bu çalışmada incelenen boza örneklerinin fermantasyon ve depolama zamanına bağlı olarak renk ölçümleri Tablo 3.6'de verilmiştir. L^* değerleri karşılaştırıldığında kontrol boza örnekleri (MSG içermeyen) ile MSG içeren boza örneklerinin aralarında farklılığın belirlendiği, aynı şekilde fermantasyon zamanına ve depolama süresine bağlı olarak örneklerin kendi aralarında karşılaştırıldıklarında sonuçların önemli düzeyde fark gösterdiği belirlenmiştir. L^* değerleri, sırasıyla 53.76 ile 62.00 arasında değişim göstermiştir.

Starter+MSG'li ve starter+MSG'siz üretilen boza numunelerinde fermantasyonun ilk 24.saatinde a^* değerinde istatistiksel olarak farklılık görülmüş ($p<0.05$) olup, depolama süresinde de bu farklılığın devam ettiği görülmüştür. Depolamanın 6 ve 9.günlerdeki boza örneklerindeki a^* değerinde önemli derecede artış meydana gelmiştir. Boza örneklerindeki b^* değerlerinin (sarılık) fermantasyon süresinde MSG içeren örneklerde başlangıçta yüksek olduğu ancak daha sonra zamana bağlı olarak bir azalma meydana geldiği ve MSG içermeyen örneklerde ise tam tersi bir durumun söz konusu olduğu kaydedilmiştir. Depolama süresinde ise her iki durumdaki örneklerin hepsinde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. b^* değerleri önceki fermantasyon ve depolama sürelerindeki sonuçlarımızla karşılaştırıldığında özellikle 6.günde sarılıkta bir azalmanın meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Tablo 3.6 Boza örneklerine ait renk değerleri (L*, a*, b*)

		Örnek Kodu	L*	a*	b*
Fermantasyon süresi (saat)	0	A	53.95±0.03 ^{Bc}	-5.49 ±0.01 ^{Aa}	5.91 ±0.12 ^{Bb}
		B	57.49 ±0.33 ^{Ab}	-6.15 ±0.26 ^{Abc}	8.51 ±0.49 ^{Aa}
		C	53.76 ±0.06 ^{Bc}	-5.57 ±0.16 ^{Aab}	6.03 ±0.14 ^{Bb}
		D	58.73 ±0.22 ^{Aa}	-6.53 ±0.03 ^{Bc}	9.55 ±0.18 ^{Aa}
	24	A	53.87 ±0.07 ^{Bb}	-5.74 ±0.00 ^{Aa}	4.87 ±0.01 ^{Cb}
		B	57.85 ±0.42 ^{Aa}	-6.34 ±0.07 ^{Ab}	7.39 ±0.18 ^{ABa}
		C	58.11 ±0.42 ^{Aa}	-6.24 ±0.04 ^{ABb}	7.62 ±0.45 ^{Aa}
		D	54.60 ±0.06 ^{Bb}	-5.92 ±0.04 ^{Aa}	5.24 ±0.16 ^{Cb}
	48	A	57.76 ±0.23 ^{Aa}	-6.23 ±0.11 ^{Ba}	7.97 ±0.27 ^{Aa}
		B	54.56 ±0.20 ^{Bb}	-6.13 ±0.01 ^{Aa}	6.50 ±0.02 ^{BCb}
		C	58.58 ±0.23 ^{Aa}	-6.62 ±0.03 ^{Bb}	8.60 ±0.42 ^{Aa}
		D	54.86 ±0.37 ^{Bb}	-6.27 ±0.13 ^{Ba}	6.46 ±0.31 ^{Bb}
	72	A	57.70 ±0.01 ^{Ab}	-6.25 ±0.06 ^{Ba}	7.98 ±0.10 ^{Aa}
		B	54.77 ±0.02 ^{Bc}	-5.92 ±0.09 ^{Aa}	5.81 ±0.15 ^{Cb}
		C	58.12 ±0.04 ^{Aa}	-6.19 ±0.31 ^{ABa}	7.24 ±0.35 ^{ABa}
		D	54.30 ±0.08 ^{Bd}	-5.89 ±0.01 ^{Aa}	5.34 ±0.03 ^{Cb}
Depolama zamanı (gün)	0	A	57.76 ±0.23 ^{Ca}	-6.23 ±0.10 ^{Ca}	7.97 ±0.27 ^{Aa}
		B	54.56 ±0.20 ^{Db}	-6.13 ±0.01 ^{Da}	6.50 ±0.02 ^{Ab}
		C	58.58 ±0.23 ^{Ca}	-6.62 ±0.03 ^{Db}	8.60 ±0.42 ^{Aa}
		D	54.86 ±0.37 ^{Cb}	-6.27 ±0.12 ^{Da}	6.46 ±0.31 ^{Ab}
	3	A	59.55 ±0.61 ^{Ba}	-6.35 ±0.14 ^{Cc}	7.05 ±0.23 ^{Aa}
		B	56.26 ±0.15 ^{Cb}	-5.58 ±0.02 ^{Cab}	4.17 ±0.02 ^{Bb}
		C	59.68 ±0.21 ^{Ba}	-6.01 ±0.28 ^{Cbc}	6.35 ±0.49 ^{Ba}
		D	55.43 ±0.16 ^{Cb}	-5.26 ±0.04 ^{Ca}	3.97 ±0.10 ^{Bb}
	6	A	59.28 ±0.49 ^{BCa}	-2.64 ±0.13 ^{Aab}	2.66 ±0.28 ^{Ca}
		B	57.23 ±0.10 ^{Bb}	-2.80 ±0.03 ^{Ab}	2.12 ±0.02 ^{Da}
		C	58.46 ±0.00 ^{Ca}	-2.47 ±0.04 ^{Aa}	1.33 ±0.01 ^{Db}
		D	56.83 ±0.05 ^{Bb}	-2.61 ±0.02 ^{Aab}	1.38 ±0.06 ^{Cb}
	9	A	61.51 ±0.08 ^{Ab}	-3.26 ±0.03 ^{Bc}	4.70 ±0.18 ^{Ba}
		B	59.26 ±0.07 ^{Ac}	-3.12 ±0.03 ^{Bb}	3.49 ±0.09 ^{Cb}
		C	62.00 ±0.15 ^{Aa}	-3.13 ±0.03 ^{Bb}	4.30 ±0.23 ^{Ca}
		D	59.39 ±0.03 ^{Ac}	-2.99 ±0.01 ^{Ba}	3.23 ±0.16 ^{Bb}

*Büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı örneklerin zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05).

*Küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar farklı örneklerin aynı zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05). (A: MSG+*L. brevis*, B: *L. brevis*, C: MSG+ *L. plantarum*, D: *L. plantarum*)

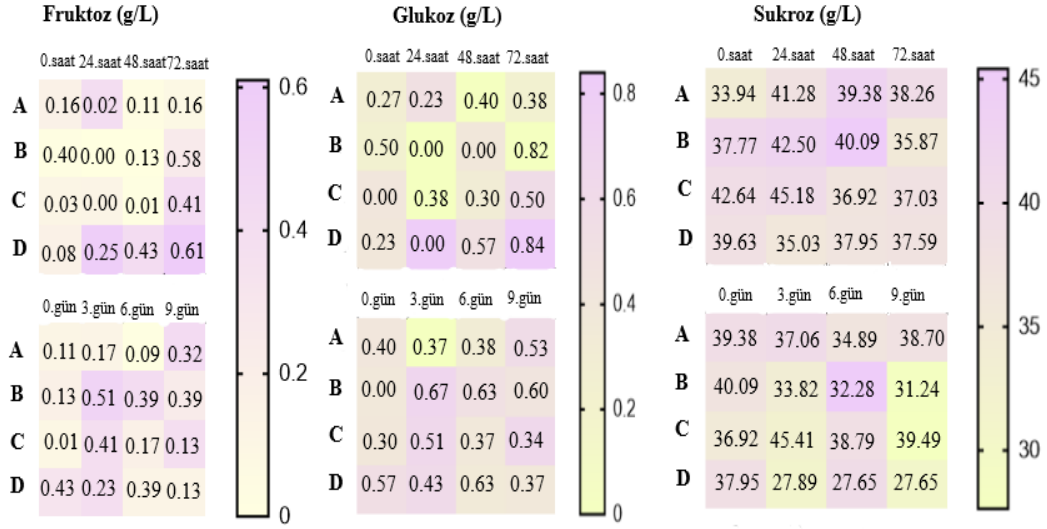
Sonuçlarımız renk açısından genel olarak değerlendirildiğinde örnekler arasında parlaklıkta gözle görülebilir bir farklılığın olmadığı sadece 6.günde *a** ve *b** değerlerinde önemli bir değişim meydana geldiği söylenebilir. Örneklerin kontrol örneklerine göre parlaklık değerlerinin farksız bulunması tüketici bakımından olumsuz karşılanmayacağı, fakat depolama süresinin 6 ve 9. günlerdeki değişim meydana gelmesi üründeki renk değişiminin bu depolama sürelerinde stabil kalmaması olumsuz olarak düşünülebilir. Ayrıca fermantasyon süresince ve

depolamanın ilk 3 günündeki parametrelere bakıldığında renk değerlerinin hem kullanılan suş hem de hammadde olarak kullanılan ürünlerden etkilenmediği söylenebilir. Boza ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, renk değişimlerinde herhangi bir farklılığın meydana gelmediği belirtilmiştir.

3.3.6 Şeker İçeriğinin Belirlenmesi

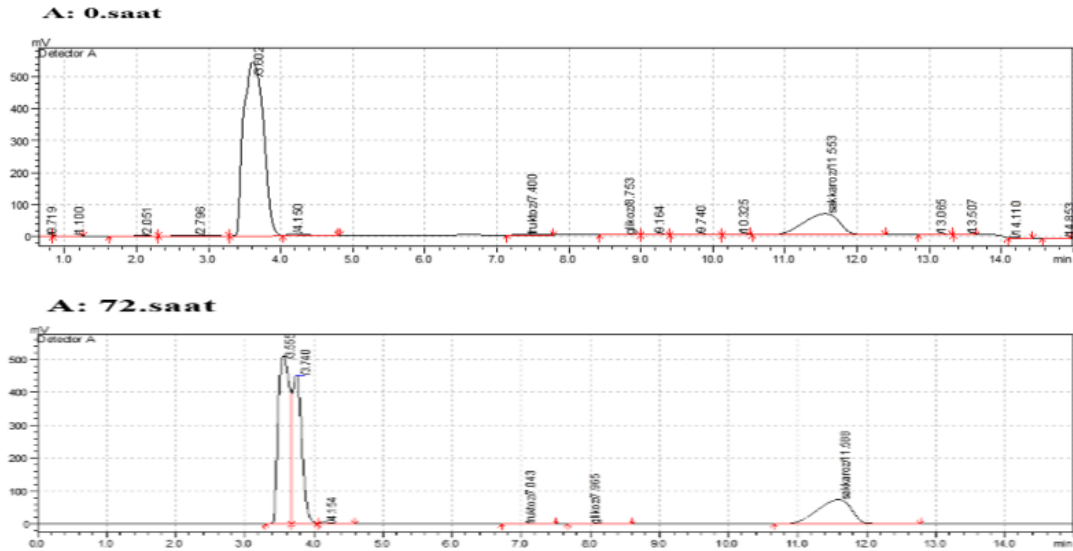
Boza örneklerinde hem fermentasyon süresinde hem de depolama günlerinde şeker içeriğinde meydana gelen değişiklik Şekil 3.6'da gösterilmiştir. HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 7.90-8.75 dk olarak, fruktozun alıkonma süresi 7.00-7.30 dk olarak, sukrozun alıkonma süresi ise 11.46-11.66 dk olarak bulunmuştur. Fermentasyon başlangıcındaki sakkaroz miktarının depolama sonuna kadar azaldığı gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar Arslan vd. [99] fermentasyon koşullarındaki boza örneklerinde de gözlemlenmiştir.

Fermentasyonun 0 ile 48.saatleri arasında fruktoz miktarında azalış olurken, sakkaroz miktarında artış meydana gelmiştir. Depolama koşulunda ise 0-6.gün arasında sukroz içeriğinde önemli bir azalış meydana geldiği görülmüştür (Şekil 3.6). Fermentasyon ve depolama boyunca glikoz miktarının früktoz miktarından fazla olduğu, ayrıca MSG'li ve MSG içermeyen boza örneklerinin sadece 0.saatte arasında önemli bir fark olduğu kaydedilmiştir. 45MK-30 *L. plantarum* JCM 1149 suşunu içeren örneklerde 0-24.saatleri arasındaki glikoz içeriğinin pik aralığı belirlenmemiş olup, glikoz miktarı bulunamamıştır ve boza örneklerine ait önemli birkaç HPLC kromatogramları Şekil 3.7-3.10'da verilmiştir. Fermentasyonun 48. saatinden itibaren glikoz miktarında önemli bir değişikliğin gerçekleşmediği belirlenmiştir.



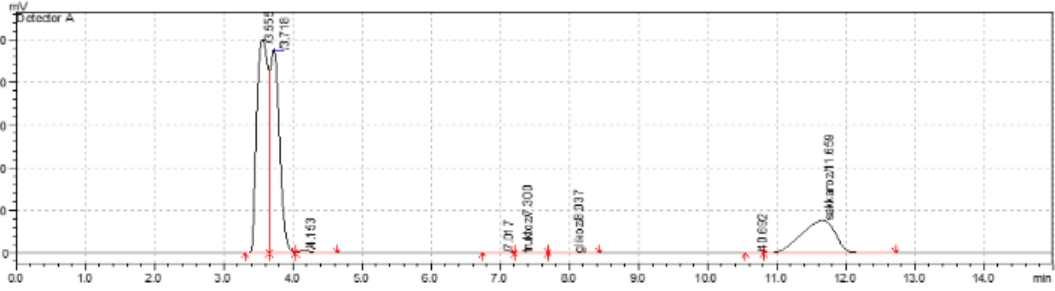
Şekil 3.6 HPLC sonucu boza örneklerindeki fruktoz, glukoz ve sukroz miktarlarını gösteren harita (A: *L. brevis*+MSG, B: *L. brevis*, C: *L. plantarum*+ MSG, D: *L. plantarum*, 1:0.saat, 2:24.saat, 3: 48.saat, 4:72.saat, 6:0.gün, 7:3.gün, 8:6.gün, 9:9.gün)

Sonuçlarımız genel olarak incelendiğinde fermantasyondan itibaren fruktoz ve glukoz miktarında artış, sukroz miktarında ise azalış meydana geldiği görülmüştür. Bunun sebebinin ise sakarozun mikrobiyolojik invertaz enzimleri tarafından parçalanmasından kaynaklandığı düşünülmüştür [99].

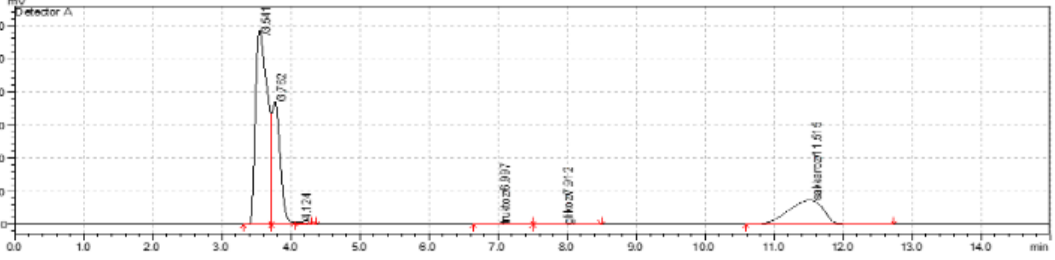


Şekil 3.7 *Lb. brevis*+MSG boza örneklerinin 0th ile 72th ait HPLC kromatogramları. HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 7.53-7.90 dk olarak, fruktozun alıkonma süresi 7.04-7.40 dk olarak, sukrozun alıkonma süresi ise 11.55-11.58 dk olarak gelmiştir.

A: 0.gün

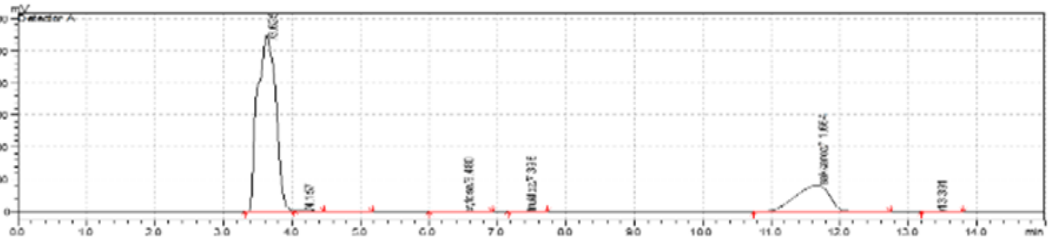


A: 9.gün

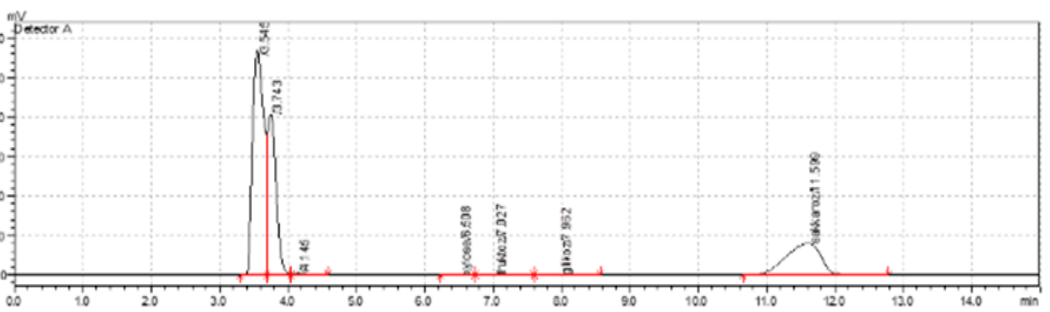


Şekil 3.8 *Lb.brevis*+MSG boza örneklerinin 0.gün ile 9.güne ait HPLC kromatogramları. HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 7.91-8.03 dk olarak, fruktozun alıkonma süresi 6.99-7.30 dk olarak, sukrozun alıkonma süresi ise 11.51-11.65 dk olarak gelmiştir.

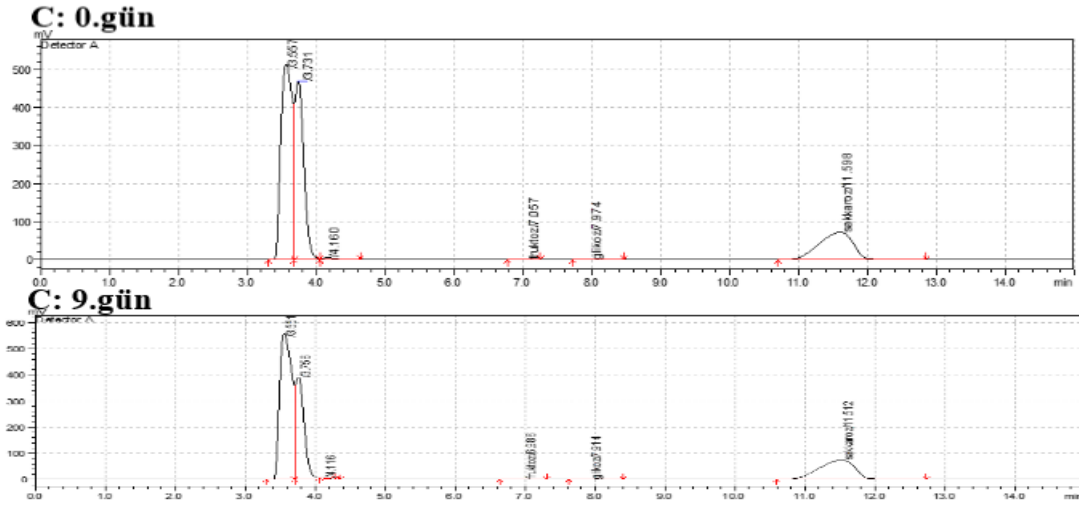
C: 0.saat



C: 72.saat



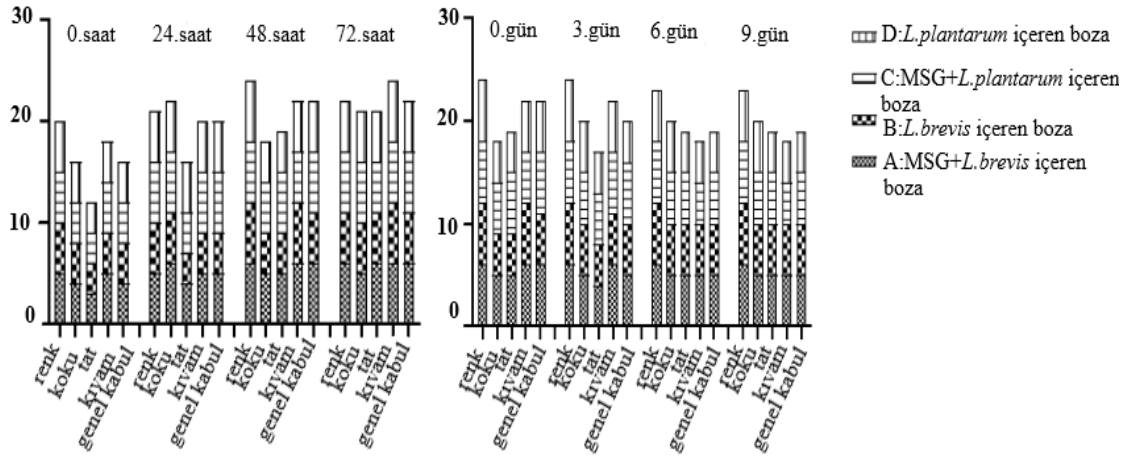
Şekil 3.9 *Lb.plantarum*+MSG boza örneklerinin 0th ile 72th ait HPLC kromatogramları. HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 7.93-7.95 dk olarak, fruktozun alıkonma süresi 7.48-7.93 dk olarak, sukrozun alıkonma süresi ise 11.55-11.58 dk olarak gelmiştir.



Şekil 3.10 *Lb.plantarum*+MSG boza örneklerinin 0.gün ile 9.güne ait HPLC kromatogramları. HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 7.91-7.97 dk olarak, fruktozun alıkonma süresi 7.06-7.08 dk olarak, sukrozun alıkonma süresi ise 11.60-11.51 dk olarak gelmiştir.

3.3.7 Duyusal Analiz

Boza örneklerinin hem fermentasyon sürecindeki hem de depolama boyunca sergiledikleri fiziksel ve kimyasal değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla duyusal teste tabi tutulmuştur. Duyusal puanlarındaki değişimler Şekil 3.11’de gösterilmiştir. 10 panelist tarafından yapılan değerlendirilmede boza örneklerinin kabul edilebileceği kaydedilmiştir. Boza örneklerinin fermentasyonun başlangıcında örneklerin genel kabul edilebilirliği 7 puan skalası üzerinde 4 olmuştur ve aralarında fark olmadığı, fermentasyon süresinin artması ile 48.saat fermentasyonda genel olarak kabul edilebilirliği arttığı kaydedilmiştir. Fermentasyon süresinin boza örneklerinin duyusal kalitesi üzerine bakıldığında MSG içeren boza numunelerinin kontrol (MSG içermeyen) numunelerine nazaran daha kabul edilebilir olduğu görülmüştür.



Şekil 3.11 Boza örneklerine ait duyuşal değeriendirme

Kontrol örneklerinin renk ve koku özellikleri diğeri örneklerle aynı duyuşal puanları almasına rağmen, genel kabul edilebilirlik açısından en düşük örnekler olmuştur. Örneklerin 48 ve 72 saatlerdeki tüm duyuşal özelliklere ait puanların yaklaşık 6 olması, örneklerin panelistler tarafından kabul edildiğini göstermektedir. Depolama süresince ise duyuşal özellik parametrelerinin tüm örneklerde kabul edilebilirliğinin azaldığı gözlemlenmiştir. Depolama süresinin duyuşal özellikler üzerine önemli bir parametre olduğu söylenebilir. Koku, tat, kıvam, genel kabul edilebilirliğin azalması kullanılan starter kültürler tarafından üretilen metabolitlerin üretimi olabilir. GABA'lı boza örneğinin kontrol örneklerden daha beğenilmesi bu örneklerin fonksiyonel nitelikte bir tahıl bazlı içecek olarak kabul edilebilme olasılığının yüksek olduğunu göstermiştir.

***L. brevis* ATCC 14869 ve *L. plantarum* JCM 1149 YARDIMCI KÜLTÜRLERLE YOĞURT ÜRETİMİ**

4.1 Giriş

Fermantasyon, bozulabilir gıdaların daha uzun raf ömrü sağlamak ve nihai gıda ürünlerinin lezzet ve kokusunu arttırmak için binlerce yıldır kullanılan bir yöntem olmaktadır. Neolitik çağlardan beri fermente gıdaların yapıldığı bilinmektedir. Fermente gıdaların en ünlü örnekleri şarap, ekmek ve peynir olmaktadır. Ayrıca Orta Asya bölgelerinde yoğurt ve diğer fermente süt ürünleri (kefir ve kumys gibi), geleneksel alkollü içecekler, sirke ve turşu gibi fermente ürünler de yaygın olmaktadır [116]. Süt ürünleri, sütteki laktozun starter kültür kullanılarak laktik aside dönüştürülmesiyle oluşmaktadır. Buna ek olarak süt ürünleri, yüksek asitli olmalarından dolayı patojenik organizmaları yok etmesi bu ürünleri güvenli tutması nedeniyle dünyanın farklı bölgelerinde, özellikle sıcak iklimlerde, ilkel sıhhi koşullar altında yaşayan insanların çeşitli fermente süt ürünlerini tüketmesi arzu edilmiştir [117].

Yoğurt, dünya çapındaki birçok düzenleyici kurum tarafından laktozun sindirilmesini sağlayan ve tipik olarak *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* suşları olarak tanımlanmış iki mikroorganizmayı içeren fermente bir süt ürünü olarak kabul edilmektedir. Binlerce yıldır katyk (Ermenistan), dahi (Hindistan), zabadi (Mısır), mast (İran), leben raib (Suudi Arabistan), laban (Irak ve Lübnan), roba (Sudan), iogurte (Brezilya), cuajada (İspanya), kömürhada (Portekiz), dovga (Azerbaycan) ve matsoni (Gürcistan, Rusya ve Japonya) gibi birçok ülkede farklı isimlerle anılan eski bir besin olmaktadır. "Yoğurt" kelimesinin Türkçede koyulaştırmak, pıhtılaştırmak veya pıhtılaştırmak anlamına gelen "yoğurtmak" kelimesinden geldiğine inanılmaktadır. Orta çağ Türklerinde yoğurdun kullanımı Kaşgarlı Mahmut'un Divanı Lugatı Türk kitabında ve Kutadgu Bilig kitabında kaydedilmiştir. Ayrıca, Yoğurdun ishal ve kramplar gibi çeşitli hastalık ve semptomlar için tıbbi kullanımını ve güneşten yanmış cildin rahatsızlığını hafifletmek için ilk değerlendiren kişilerin Türkler olduğu kaydedilmiştir [118].

Günümüzde yoğurt, tipik olarak, fermente edilmiş ve canlı ve iyi tanımlanmış bakterilerle asitlendirilmiş, uzun raf ömrüne sahip koyulaştırılmış, genellikle aromalı bir ürün oluşturan fermente süt ürünü olarak belirtilmiştir. Temel besinleri içermekte (eklenen probiyotikler, lifler, vitaminler ve mineraller) ve takviye için bir araç olmaktadır. Yoğurt, 3-8 saatte, düşük bir sıcaklıkta (36-42 °C), steril bir ortamda iki bakteri suşunun (*S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*) simbiyozu oluşan bir ürün olarak tanımlanmıştır. Her iki bakteri suşu son üründe (CODEX 2003'e göre en az 10 milyon bakteri/g) aktif kalmalıdır. Önceden pastörize edilmiş yağsız sütün yoğurda dönüştürülmeden önceki süreci, karbonhidratlarda, proteinlerde ve lipidlerde meydana gelen değişikliklerden sorumludur. Asidik bir aroma ve gelişmiş bir görünüm, tat, tutarlılık ve sindirilebilirliğe sahip bir ürün verir. Süt; laktozu fermentasyon substratı olarak kullandığında, aromasına katkıda bulunan laktik asit ve bir dizi başka bileşik oluşur. İstenmeyen mikroorganizmaların önlenmesi geciktirilir, sütte bulunan kalsiyum ve fosfor kendi çözünür formlarına dönüştürülür ve artık kalsiyum içermeyen proteinlerin çoğu, sindirilebilirliğini ve genel biyoyararlanımını artıran proteolitik enzimler tarafından daha iyi sindirilir.

Günümüzde tüketilen yoğurt türleri, yerel geleneklerden etkilenmekte veya belirli yaşam tarzlarına tekabül etmektedir. Doğu Avrupa ve Asya'da insanlar, bakteri ve mayaları birleştirerek alkollü fermentasyona uğramış sütleri (örn. Kefir, Koumis) tüketirlerken, Almanya'da ve İspanya'da yoğurt tipik olarak bakterileri öldürmek için ısıl işleme tabi tutulur. Diğer ülkelerde ise karışıma çeşitli probiyotikler ve/veya prebiyotikler eklenir [118]. Yoğurt tüketim modelleri ülkeden ülkeye büyük farklılıklar göstermesine rağmen tüketim genellikle düşük olmaktadır. Süt ürünleri tüketiminin beslenme eğitimi çabalarıyla geniş ölçüde teşvik edildiği Amerika Birleşik Devletleri'nde, yoğurt tüketimi çok düşüktür ve nüfusun yalnızca yaklaşık %6'sı günlük olarak yoğurt tüketmektedir. Wisconsin Üniversitesi, Madison'daki AC Nielsen Pazar Araştırmaları Merkezi tarafından 15 ülkede yapılan araştırmada en fazla yoğurt tüketenlerin Hollanda, Fransa, Türkiye, İspanya ve Almanya'da, en az tüketenlerin ise Mısır, Kolombiya, Rusya, Romanya ve Güney Afrika'da yaşadığını gösterilmiştir (Euromonitor 2013 verileri) [119].

4.1.1 Yoğurt Kültürleri

4.1.1.1 *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus, fermente süt ürünlerinin özellikle yoğurdun ev yapımı ya da modern endüstriyel üretiminde uzun bir kullanım geçmişine sahip, homofermentatif fakültatif anaerobik bir laktik asit bakterisi olmaktadır. *S.thermophilus*, süt starteri olarak laktozu hızla laktik aside dönüştürmektedir. Bu da süt proteinlerinin (kazein) pıhtılaşmasında meydana gelen pH'nın hızlı bir düşüşüne neden olur. Ek olarak, bu bakteri yoğurda lezzet, asitlik, viskozite ve su tutma kapasitesi gibi birçok mükemmel işleme özelliği kazandırmaktadır [120]. *S. thermophilus*, gıda fermentasyonunda kullanılan *Streptococcus* cinsindeki tek tür olarak karşımıza çıkmaktadır.

4.1.1.2 *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*

L. delbrueckii subsp. bulgaricus, homofermentatif olup, az sayıda glukoz, laktoz, fruktoz bazen de galaktoz ve mannoz gibi karbonhidratları fermente eder ve yüksek büyüme sıcaklığına sahiptir (48-50 °C). Ayrıca, G+C yüzdesi 49'dan 51'e değişmektedir [121]. Fakültatif anaerobik olan bu türün optimum gelişme sıcaklığının 42 °C olduğu belirtilmiştir [122].

4.1.2 Yoğurt Bakterilerinin Simbiyotik Yaşamı

Termodurik ve homofermentatif laktik asit bakterileri olan *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* arasındaki simbiyotik ilişki yoğurt, İsviçre ve çeşitli italyan peynirlerinin üretiminde uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Özellikle kaliteli yoğurt üretiminde bu organizmalar arasındaki uygun dengenin sağlanması önemli olmaktadır. Arzu edilen aroma ve dokuya sahip yoğurt üretimi sırasında *L. bulgaricus*'un *S. thermophilus*'a oranının yaklaşık 1:1 olması gerektiği kaydedilmiştir. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* arasında simbiyotik bir ilişki olduğu varsayılmasına rağmen, tüm suşlar uyumlu değildir ve büyümede bir dengesizlik meydana gelebilir [123].

Çalışmalarda belirtildiği gibi bir laktik asit bakterisi olan *S. thermophilus*'un beslenme gereksinimleri vardır. Süt, yetersiz aminoasit ve peptit içeriğine sahip olması nedeniyle bu mikroorganizma için optimal bir büyüme ortamı oluşturmamaktadır. Bu nedenle, karışık bir kültürde *S. thermophilus* ile kombine

edilmiş bakterinin ya belirli büyüme faktörlerinin eklenmesi ya da sembolik aktivitesinin sütte kültürlenene bu termofilik streptokokun hem gelişimi hem de asitleştirme aktivitesi üzerinde önemli bir uyarıcı etki gösterebileceği düşünülebilir. [10]. Üstelik, ortamın fizikokimyasal koşullarını değiştiren bakteriyosinler, antibiyotikler ve diğer substratların üretimi veya substratlara karşı rekabeti rekabetçi etkileşimlerin kaynağı olabilir [11]. Bu yüzden, bir bakteri türünün diğerinin büyümesini engellemesi mümkündür. Süt endüstrisinde, *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarının inkübasyonu, iki suş arasındaki sinerjiyi teşvik etmek için genellikle 42°C ile 45°C arasındaki bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Bu kombinasyon, her iki tür için de faydalı olduğunda protokol iş birliği olarak adlandırılır.

S. thermophilus ve *L. bulgaricus* arasındaki etkileşim, karşılıklı büyümeyi uyarıcı etkiler sağlayan çeşitli metabolitlerin değişimine dayanır. Bu etkiler süütün asitlenme oranını ve büyüme sonunda bakteri popülasyonlarını arttırırken, ürünün son pH'sını düşürürler. Ayrıca, asetaldehit gibi aromatik bileşiklerin üretimini, hücre dışı polisakkaritlerin (EPS) daha iyi üretimini ve nihai ürünün stabilitesini uyarırlar. Sonuç olarak, *S. thermophilus* pürvik asit, formik asit, folik asit, ornitin, uzun zincirli yağ asitleri ve CO₂ üreterek *L. bulgaricus*'un büyümesini uyarır. Formik asit üretimi; suşa, ortama ve sıcaklığa bağlı olmaktadır. Ek olarak, *S. thermophilus* tarafından üretilen laktik asit, *L. bulgaricus* için süütün pH'sını uygun seviyede azaltır. *L. bulgaricus* ise, *S. thermophilus*'un büyümesini uyararak peptitler, serbest aminoasitler ve putresin sağlamlasına olanak tanıyan yüksek proteolitik aktivite sergiler [124].

4.1.3 Yoğurt Jelinin Oluşumundaki Fiziksel-Kimyasal Mekanizmalar

Süütün asitleştirilmesi, kalsiyum-kazeinat-fosfat'ın (CCP) çözünmesinden dolayı kazein misellerinin iç yapısal özelliklerinin bozulmasına yol açmaktadır. Kazeinler izoelektrik noktalarına (pH 4.6) yaklaştıkça, kazein üzerindeki net negatif yük azalır, bu da CCP çözündüğünde açığa çıkan fosfoserin kalıntıları dahil olmak üzere yüklü gruplar arasındaki elektrostatik itmeyi azaltır. Elektrostatik çekim artar ve protein-protein çekimi de artan hidrofobik etkileşimler yoluyla artar. Asit süt jellerinin oluşumu için fiziko-kimyasal mekanizmalar üç pH bölgesi için tartışılabilir.

- pH 6.7 ile 6.0

Sütün pH'ı 6.6'dan 6.0'a düştüğünde, kazein misellerindeki net negatif yük azalır, bu da elektrostatik itmede bir azalmaya neden olur. pH>6.0'da sadece küçük bir miktar CCP çözündüğünden, kazein misellerinin boyutu büyük ölçüde değişmez.

- pH 6.0 ile 5.0

Sütün pH'sı 6.0'dan 5.0'a düştükçe, kazein misellerindeki net negatif yük büyük ölçüde azalır ve κ -kazeinin yüklü "kılları" küçülebilir (veya kıvrılabilir). Bu, her ikisi de orijinal sütteki kazein misellerinin stabilitesinden sorumlu olan elektrostatik itme ve sterik stabilizasyonda bir azalma ile sonuçlanır. pH $\leq$ 6.0'da CCP'nin çözünme hızı artar, bu da kazein misellerinin iç yapısını zayıflatır ve açığa çıkan fosfoserin kalıntıları arasındaki elektrostatik itmeyi arttırır. Sütte, CCP, kazein misellerinde pH~5.0 ile tamamen çözünür.

-pH $\leq$ 5.0

Sütün pH'ı kazeinin izoelektrik noktasına (pH 4.6) yaklaştığında, kazein üzerindeki net negatif yükte bir azalma olur, bu da kazein molekülleri arasındaki elektrostatik itmede bir azalmaya yol açar. Öte yandan, artan hidrofobik ve artı-eksi (elektrostatik) yük etkileşimleri nedeniyle kazein-kazein çekicilikleri artar. Asitleştirme işlemi, kazein kümeleri ve zincirlerinden oluşan üç boyutlu ağ oluşumu ile sonuçlanır [125].

4.1.4 Yoğurt Tüketimi ve Sağlık Üzerindeki Etkileri

Genellikle bir ürünün besin değerinin bileşenlerine bağlı olduğu belirtilmiştir. Sütün içindeki değerli bileşiklerin varlığı nedeniyle yoğurt büyük önem taşımaktadır. Fermantasyon işlemi yoğurt üzerinde faydalı olurken, süt ve yoğurdun kimyasal bileşiminde herhangi bir değişiklik oluşturmadığı kaydedilmiştir [126]. Tablo 4.1, tam yağlı süt, yağsız süt ve bunlara karşılık gelen yoğurtların bileşenlerini göstermektedir. Sütte, özellikle fermente süt ürünlerinde, çok önemli olan ve belirli spesifik proteinler, vitaminler, biyoaktif peptitler, organik asitler ve oligosakkaritler içeren çeşitli biyoaktif bileşikler bulunur [116].

Literatür çalışması gözden geçirildiğinde, sağlıklı bir diyetin parçası olarak önerilen düzeyde süt ve fermente süt ürünleri tüketiminin birçok hastalık riskini azaltabileceği ortaya çıkmıştır. Fermente süt ürünleri, bağırsak yolunda "faydalı" ve

“istenmeyen” bakteri dengesini iyileştirmeye yardımcı olan probiyotikler gibi belirli canlı ve aktif kültürlerin yeterli seviyelerini içerir. Fermente süt ürünleri üzerine yapılan çeşitli araştırmalar, bunların bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini ve bağırsak sağlığını desteklediğini göstermiştir. Yoğurt gibi fermente ürünlerin tüketilmesinin vücutta kanserojenlere ve zararlı toksinlere karşı bağışıklık fonksiyonunu iyileştirmeye etkisi araştırılmaktadır. Süt ve süt ürünleri alımının hastalık riskini azaltmadaki etkisini ortaya çıkarmak için gastrointestinal sistem hastalıkları, kardiyovasküler sistem hastalıkları, kas-iskelet sistemi hastalıkları, ürogenital sistem hastalıkları, bağışıklık sistemi hastalıkları, alerji, sinir sistemi, sistem hastalıkları, bilişsel sistem hastalıkları, kilo kontrolü, obezite, yaşlanma ve diş sağlığı gibi hastalıklar üzerinde klinik araştırmalar yapılmıştır [116].

Tablo 4.1 Tam yağlı süt, yağsız süt ve muadil yoğurtların besin bileşimi (100 g) [116].

Bileşenler	Birim	Tam yağlı süt	Tam yağlı yoğurt	Yağsız süt	Yağsız yoğurt
Enerji	Kcal	68	70	35	39
Protein	G	3.3	3.8	3.5	4.4
Yağ	G	3.8	3.8	0.1	0.1
Laktik asit	G	0	0.8	0	1.0
Potasyum	mg	157	157	150	187
Kalsiyum	mg	120	120	123	143
Fosfor	mg	92	92	97	109
Magnezyum	mg	12	12	14	14
Sodyum	mg	48	48	53	57
İyot	mg	0.46	0.46	0.45	0.44
Klor	mg	102	102	100	121
Retinol	µg	52	28	1	8
Karoten	µg	21	21	Tr	5
B1 vitamini	µg	30	60	40	50
B2 vitamini	µg	170	270	170	250
B6 vitamini	µg	60	100	60	90
B12 vitamini	µg	0.4	0.2	0.4	0.2
C vitamini	µg	1	1	1	1
D vitamini	µg	0.03	0.04	Tr	0.01
E vitamini	µg	90	50	Tr	10
Folik asit	µg	6	18	5	17
nikotinik asit	µg	100	200	100	100
pantotenik asit	µg	350	500	320	450
Biotin	µg	1.9	2.6	1.9	2.9
Kolin	mg	12.1	-	4.8	0.6

Yoğurt gibi ürünler, bağırsak rahatsızlıklarını ve kronik hastalıkları azaltmada potansiyel rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalara göre; konjuge linoleik asit ve bütirik asit gibi yoğurtta bulunan bazı besleyici olmayan bileşenlerin, kanser

önleyici ajanlar olarak rol oynayabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca, yoğurdun teknolojik üretimi ile ilişkili suşlar (*S. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) veya probiyotik fonksiyon sağlamak için ilave suşlar (genellikle *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium*) ile faydalı etkiler sağlanabilir. Yoğurt bakterilerinin, laktoz intoleransı olmayan bireylerde laktoz sindirimini iyileştirdiği, bağırsak düzenini ve sindirimi artırdığı, ishali önlediği inflamatuvar bağırsak hastalığı, bağırsak bağışıklık sistemini uyaran ve sindirim sağlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [120,127].

4.2 Materyal ve Yöntem

4.2.1 Bakteri Kültürlerinin Geliştirilmesi

Yoğurt üretimi için *Streptococcus thermophilus* ve *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* starterleri ile yüksek GABA üreticisi 45MK-30 *L. plantarum* JCM 1149 ve *L. brevis* ATCC 14869 yardımcı kültürleri kullanılmıştır. *Streptococcus thermophilus* suşu (%1 laktoz içeren) M17 sıvı besiyeri içerisinde, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (%1 fruktoz içeren) MRS sıvı besiyeri içerisinde 42 °C 24 saat, 45MK-30 *Lb. plantarum* JCM 1149 ve KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 ise MRS sıvı besiyeri içerisinde 37 °C 24 saat aktiveleştirildi. Daha sonra aktiveleştirilen yoğurt bakterileri ilgili sıvı besiyeri içerisinde (2.25 mg/mL monosodyum glutamat (MSG) içeren) 42 °C 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Fakat 45MK-30 *Lb. plantarum* JCM 1149 ve KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 MSG içeren sıvı besiyeri içerisinde 30 °C 24 saat gelişime bırakılmıştır.

4.2.2 Yoğurt Üretimi

(2.25 mg/mL) MSG içeren tam yağlı süt 90 °C 15 dak kaynatılmıştır. Daha sonra 42 °C soğumaya bırakılmıştır. Sütler soğutulduktan sonra bakteriler 10⁸ olacak şekilde ve *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (1:1 oranında) inokule edilmiştir. 45MK-30 *Lb. plantarum* JCM 1149 ve KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 içermeyen yoğurt kontrol grubu olarak alınmıştır. Kontrol grubu yoğurt sadece *S. thermophilus* ve *Lb.delbrueckii subsp. bulgaricus* suşunu içerir. Diğer taraftan ayrı ayrı 45MK-30 *Lb. plantarum* JCM 1149 ve KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 suşları inokule edilmiştir. İnokulasyonun ardından yoğurtlar 200 mL kavanozlarda 42 °C pH 4.6 olana kadar yaklaşık 5 saat fermente edilmiştir (Şekil 4.1). Örnekler daha sonra 4 °C soğumaya bırakıldı ve 28 gün bu sıcaklıkta depolamaya bırakılmıştır. Canlı hücre sayımı, GABA miktarı, pH ve TTA, su tutma kapasitesi, sinerezis,

viskoelastik özelliği, su aktivitesi, renk ölçümü ve duyusal analizleri yapılmıştır. Bunun için belirlenen günler 3, 7, 14, 21 ve 28 olmuştur.



Şekil 4.1 Çalışmada yapılan yoğurt örnekleri

4.2.3 Mikrobiyolojik Analiz

Canlı sayımı için *S. thermophilus* için MM17 (%1 laktoz içeren), *L. bulgaricus* için MMRS (%1 fruktoz içeren), 45MK-30 *L. plantarum* JCM 1149 ve KCO-48 *L. brevis* ATCC 14869 için MRS, toplam mezofilik aerobik bakteri için PCA (Plate Count Agar), maya/küf sayımı için DRBC ve koliform bakteri sayımı için VRB agar kullanılmıştır (Şekil 4.2). Bunun için 10 gram yoğurt örnekleri tartılmıştır ve 90 mL (%0.85 serum fizyolojik) FTS içerisinde stomacher yardımıyla homojen hale getirilmiştir ve diğer taraftan seri dilüsyonlar oluşturulmuştur. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* için petriler anaerobik koşullar altında 42 ° C'de 48 saat inkübasyona bırakılırken, 45MK-30 *L. plantarum* JCM 1149, KCO-48 *L. brevis* ATCC 14869 ve koliform bakteriler 37 ° C'de 24 saat, maya/küf ve toplam bakteri için 72 saat gelişime bırakılmıştır.



Şekil 4.2 Çalışmada kullanılan agarların görselleri

4.2.4 pH ve TTA

10 gram örnek tartılıp 10 mL saf su içerisinde homojen hale getirildikten sonra pH değerleri ölçülmüştür. TTA değerleri ise % 0.5 fenolftaleyn damlatıldıktan sonra 0.1 N NaOH ile titre edildi. Ve sonuçlar laktik asit cinsinden hesaplanarak verilmiştir.

$$\% \text{ Laktik asit} = (\text{Harcanan } 0.1 \text{ N NaOH (mL)} \times 0.009 \times 100) / \text{Örnek miktarı (g)}$$

4.2.5 Sinerezis

Sinerezis için 25 gram yoğurt örneği tartıldı ve 2 saat 4 ° C de bırakıldıktan sonra ayrılan serum ölçülerek belirlenmiştir.

4.2.6 Su Tutma Kapasitesi

Su tutma kapasitesi için 5 gram örnek tartıldı. 30 dak 12 000 rpm 10 ° C santrifüj edilmiştir. Ayrılan serum tartılmıştır ve WHC % = $\frac{NY-WE}{NY} \times 100$ NY cinsinde ölçülüp değerlendirilmiştir.

4.2.7 Su Aktivitesi (aw)

Su aktivitesi (aw), su aktivite metresi ile 25 ° C'de ölçülmüştür. Tüm ölçümler paralel olarak alınmıştır.

4.2.8 Renk Ölçümü

Yoğurt örneklerinin renk ölçümleri için CR-400 colorimetre aleti (Konica Minolta Inc., Japan) kullanılmıştır. Sonuçlar L^* , a^* ve b^* olarak ifade edilmiştir. L^* değeri koyuluk/parlaklık (100-beyaz), a^* değeri kırmızı (+a)/yeşile (-a), b^* değeri ise sarı (+b)/mavi (-b) olarak ifade edilmiştir.

4.2.9 Yoğurtların Viskoelastik Özelliklerinin Belirlenmesi

Yoğurt örneklerinin viskoelastik özelliklerinin belirlenmesi için reometre (Anton Paar, MCR 302, Avusturya) kullanılmıştır. Prob olarak PP50 kullanılmıştır. Bu test 10 °C'de 0.1-100 rad/s aralığında, % 0.5 strain değerinde gerçekleştirilmiştir. Örnekler cihaza verilmeden önce 30 s karıştırılmıştır. Örneklerle ait G' elastik modül, G'' viskoz modül değerleri belirlenmiştir. Elde edilen viskoelastik model parametreleri Power law model kullanılarak modellenmiştir.

4.2.10 Yoğurtlardaki GABA Miktarlarının HPLC ile Belirlenmesi

Yoğurt örnekleri santrifüj edildikten sonra süpernatantlarından 100 µL, 100 µL dansil klorid solüsyonu ve 800 µL 0.2 M Sodyum borat:NaOH çözeltisi (pH 9.0) içerecek şekilde son hacim 1000 µL olarak hazırlanmıştır. Daha sonra miks ultrasonik banyoda 40 °C'de 30 dak inkubasyona tabi tutulmuştur. Ardından süpernatantları 12 000 rpm'de 10 dak santrifüjlenerek toplanmıştır ve MeOH (1:1) ile seyreltilip, HPLC aşamasında kullanılmıştır [56]. *Lb. brevis* optimizasyonunda kullanılan HPLC şartları kullanılmıştır.

4.2.11 Duyusal Değerlendirme

Yoğurt örnekleri santrifüj edildikten sonra süpernatantlardan 100 uL, 100 uL dansil klorid solüsyonu ve 800 uL 0.2 M Sodyum borat:NaOH çözeltisi (pH 9.0) içerecek şekilde son hacim 1000 uL olarak hazırlanmıştır. Daha sonra miks ultrasonic banyoda 40 °C'de 30 dak inkubasyona tabi tutulmuştur. Ardından süpernatantları 12 000 rpm'de 10 dak santrifüjlenerek toplanmıştır ve MeOH (1:1) ile seyreltilip, HPLC aşamasında kullanılmıştır [56]. KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 optimizasyonunda kullanılan HPLC şartları kullanılmıştır. Duyusal analiz puanlama testi ile ürünlerin dış görünüşü, kaşıқта kıvam, ağızda kıvam, koku, tat ve genel beğeni 5 (çok iyi)-4 (iyi)-3 (normal)-2 (kötü)-1 (çok kötü) olarak değerlendirilmiştir. Duyusal analize panelist olarak üniversitemizin yüksek lisans öğrencilerinden oluşan 10 kişi katılmıştır. Örnekler duyusal analiz sırasında kapalı şeffaf plastik kaplar içerisinde panelistlere servis edilmiştir.

4.2.12 İstatistiksel Analiz

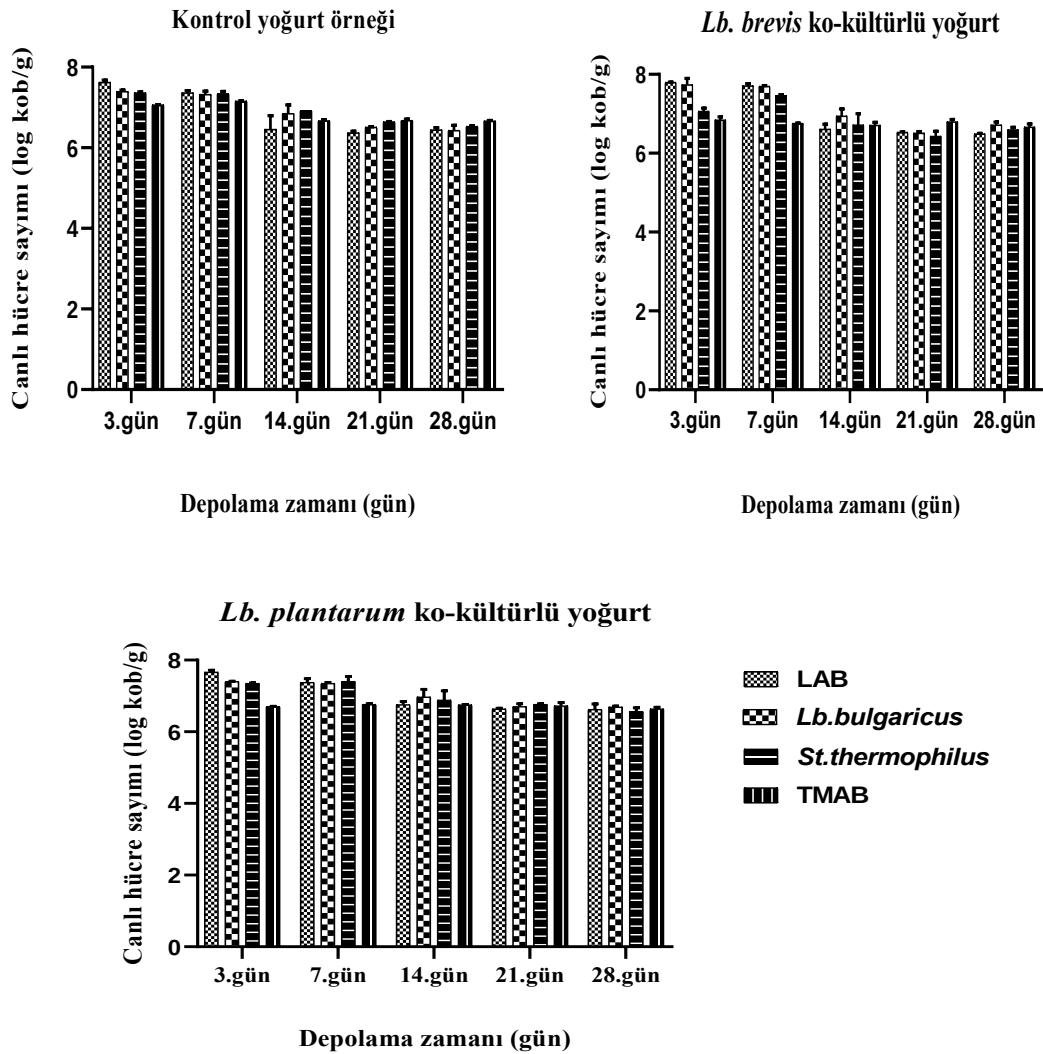
One-way ANOVA metodu için tüm analizlerin verileri için JMP 9 programı kullanılarak uygulanmıştır. Ortalama karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılarak $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.3 Araştırma Bulguları ve Tartışma

4.3.1 Mikrobiyolojik Analiz

Yoğurt üretiminde kullanılan tüm bakterilerin inokulasyonu başlangıçta yaklaşık 7 log'du. Sonuçlarda yapılan yoğurtların uzun süreli depolama sırasında canlılığını korumak için etkili bir gıda matrisi olduğu gösterilmiştir [128].

Yoğurtların mikrobiyolojik ekim sonuçları Şekil 4.3'de verilmiştir. Depolama süresi arttıkça laktik asit bakterisinde bir azalma meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Özellikle 7 ve 14. gün arasında tüm yoğurt örneklerinde yaklaşık 1 logaritmik birim azalma meydana gelmiştir. Yoğurtların buzdolabında (+4 °C) saklanması sırasında kullandığımız bakterilerin canlı sayıları depolama süresine bağlı olarak aralarında önemli farklılıkların olduğu görülmüştür. Tüm depolama boyunca koliform ve maya/küf ekiminde gelişme gözlemlenmemiştir. Tüm örneklerde LAB canlılığının azalması, LAB'nin büyümesini desteklemek için ihtiyaç duyduğu besinlerdeki laktozun azalmasının bir sonucu olabilir [128]. Genel olarak değerlendirildiğinde yardımcı kültürle yapılan yoğurtlardaki LAB değerlerinin kontrol grubuna nazaran daha yüksek olmuştur. Bunun nedeni antagonistik etkiye dayandırılabilir. Antagonistik etki ile LAB'lerin hayatta kalma oranı etkilendiği düşünülebilir.



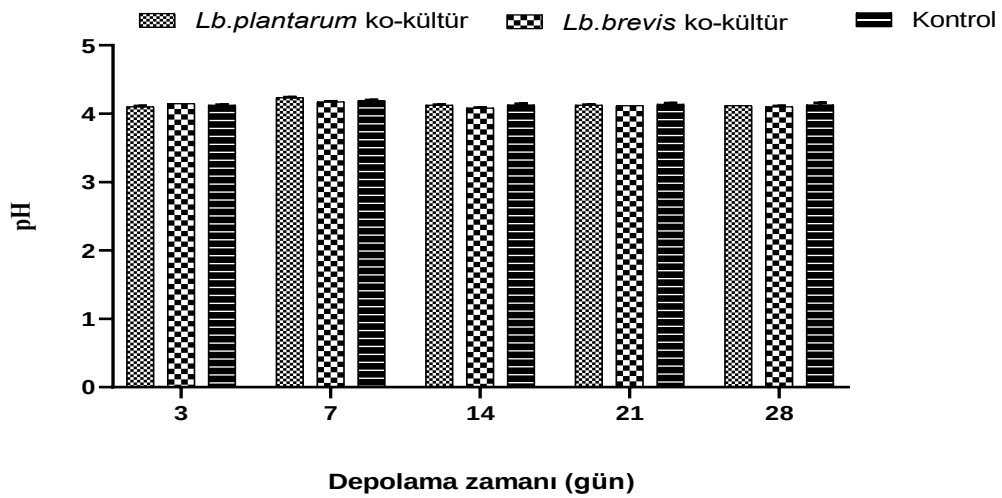
Şekil 4.3 Depolama süresinde meydana gelen mikrobiyal değişim (log kob / g)

İsa ve Razavi, [129] yaptıkları yoğurt örneklerindeki *L. plantarum* sayısının başlangıçta 8 log olduğu ve depolama süresi (14.gün) arttıkça canlılığında (7.32 log) azalma meydana geldiğini gözlemlemişler. Ayrıca 28. gün depolamada *Lb. plantarum*'un ko-kültürle hazırlanmış yoğurtta *L. bulgaricus* ve *St. thermophilus* bakterine nazaran daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun Zhang vd. [130] sonucuyla benzer olduğu söylenebilir. Sonuçlarımız genel olarak depolama süresine bağlı olarak kullanılan starterlerin sayımında azalma olması bakımından yapılan çalışmalarla benzerlik göstermiştir.

4.3.2 pH ve TTA

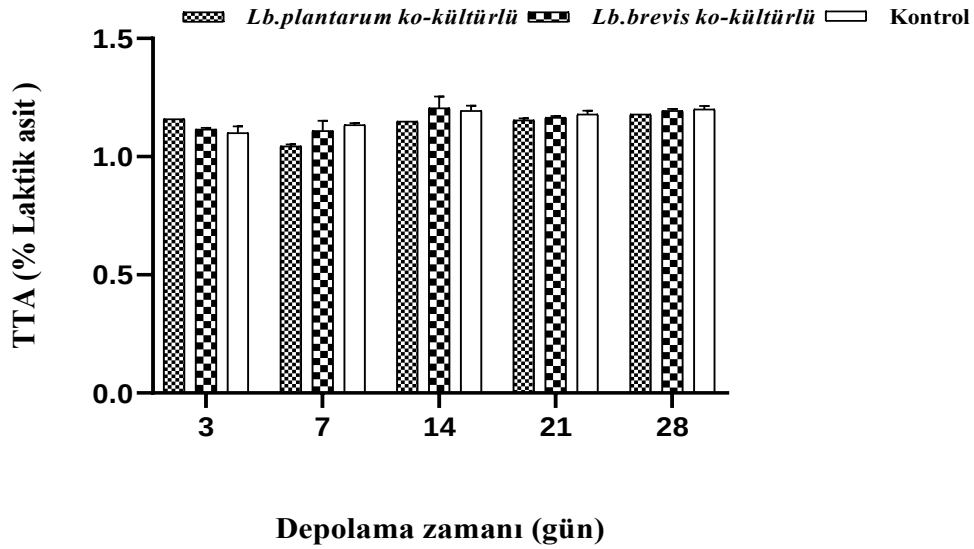
Yoğurt örneklerindeki bir diğer önemli faktör pH ve titre edilebilir asitlik olmaktadır. Ürünün saklama süresi boyunca pH'ın düşmesi, bakteriler tarafından asit üretiminin artmasıyla ilişkili olup, üretilen asitlerin çoğu laktik asittir. Bu asidin miktarının fazla olması ürünün tadını etkilemekte ve ürün için elverişsiz koşullar oluşturmaktadır [131].

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi yoğurt örneklerinin pH değerleri 3. günde birbirlerine yakın olup bu değer 4.10-4.15 arasında değişmiştir. 7.günde pH değerlerinde bir artış gözlemlenmiş olup, sonraki günlerde pH değerlerinde düşme yaşanıp durağan bir pH sergilemişlerdir. 28 gün boyunca tüm yoğurt örneklerinin pH değerleri yaklaşık 4.10 civarı olmuştur ve KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 eklenmiş yoğurdun pH değerlerinin, kontrol ve *Lb. plantarum* eklenmiş yoğurtlara nispeten biraz daha düşük olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4 Yoğurt örneklerinin depolama zamanına bağlı olarak pH değişimleri

Depolama sırasında pH değerleri ve asitlik ile ilgili sonuçlar (Şekil 4.5), pH değerlerinin zamanla azaldığını ve asitlik değerlerinin arttığını göstermektedir. Bunun nedeni daha çok iki laktoz molekülünden dört molekül laktik asit üretebilen laktik asit bakterileri tarafından laktik asit üretimi ile canlı LAB sayısı olduğu söylenebilir [132]. Yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi bunun, depolama sırasında pH'ı düşürme ve asitliği artırma eğilimi beklenmektedir [131].



Şekil 4.5 Yoğurt örneklerinin depolama zamanına bağlı olarak TTA değişimleri

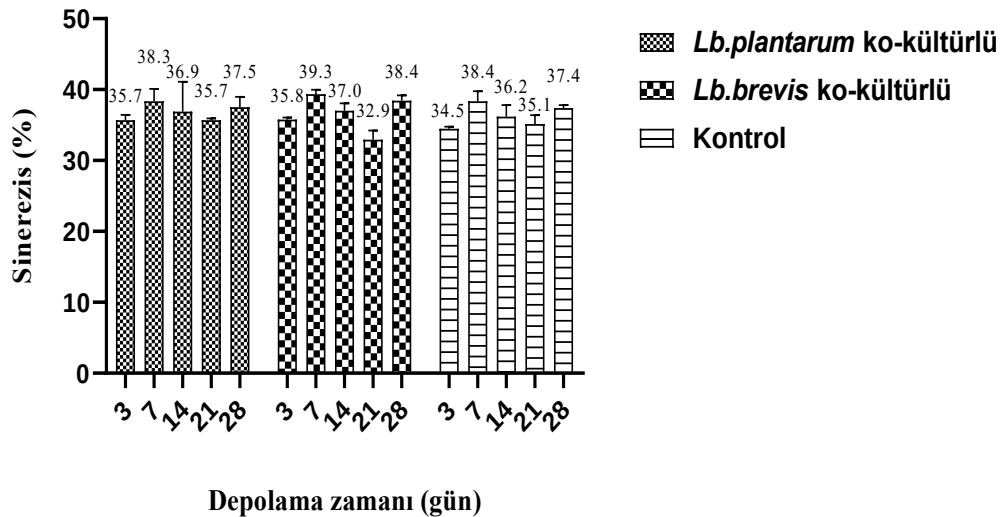
Mırlohi vd. [133] yaptıkları çalışmada yoğurt starterlerinin yanı sıra *L. plantarum* kültürünü kullanarak yoğurt üretimini gerçekleştirmişlerdir. Depolamanın başlangıcında *L. plantarum* yardımcı kültürle yapılmış yoğurt örneğinin pH değeri 4.89 iken, depolamanın 21.gününde bu değer 4.18 olmuştur. Depolamanın son günlerindeki pH değerlerimiz benzerlik göstermiştir. Yoğurdun pH değerleri soğukta depolama sırasında düşmesinin nedeni LAB'nin kalıntı aktivitesine bağlanabilir. Çünkü karışık kültürlerin yüksek metabolik aktivitesi, depolama boyunca laktik asit üretimini ve pH azalması ile sonuçlanabilir. Ek olarak titre edilebilir asitlik değişkenleri; LAB'nin kalıntı aktivitesine ve organik asitlerin sürekli üretimine atfedilir [128].

4.3.3 Sinerezis ve Su Tutma Kapasitesi

Yoğurdun en büyük dezavantajlarından biri, yoğurt yüzeyinde serum veya peynir altı suyu görünümüne ve pH protein ağının üç boyutlu yapısının büzülmesine yol açan sinerezis olmaktadır. Peynir altı suyu proteinlerinin bağlanma gücünü azaltan

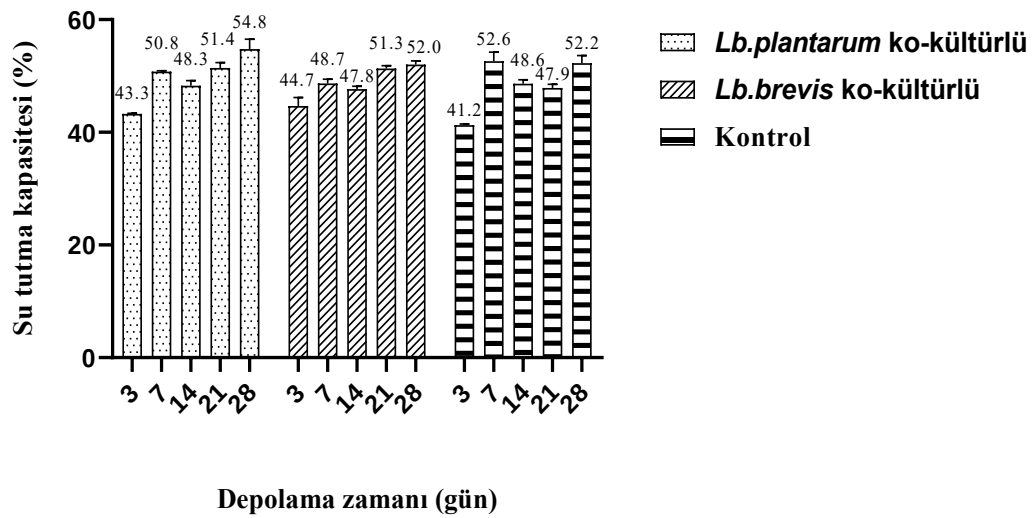
değişiklikler nedeniyle yoğurttaki sinerez oluşur ve bu süreç yoğurttaki suyun dışarı akmasına neden olur [134].

Yoğurt örneklerinin sineresiz verileri (salınan serum) Şekil 4.6'da verilmiştir. 3. ve 7. günler arasında tüm yoğurt örneklerinde bir artış meydana gelirken, sinerezis miktarlarının bu günlere kıyasla 14, 21 ve 28. günlerde doğrusal bir artma meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca, depolama süresi arttıkça sineresiz miktarlarında bir artma olduğu kaydedilmiştir. Salınan su katı ağdan ayrılarak dokuyu bozmuştur. Bunun yanı sıra pH değişikliklerinin sinerezis ile uyumlu olduğu görülmüştür [168]. *Lb. plantarum* yardımcı kültürle hazırlanan yoğurt ile kontrol yoğurtlarının arasında pek fark olmadığı söylenebilir. KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 ile yapılan yoğurdun 21.günde (%32.9), kontrol (%35.1) ve *Lb. plantarum* (%35.7) içeren yoğurtlara kıyasla daha düşük sinerezis değerlerine sahip olmuştur. Sinerezis sırasında meydana gelen değişim tam olarak anlaşılamamasına rağmen saklama süresi ile artması, sinerezisin, serum salınımını artıran kazein ağının yeniden düzenlemesi ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Yeniden düzenlemeler partikül bağlantılarını arttırmaktadır. Bu yüzden ağ, serumu ayırarak sıkıştırma ve küçültme eğiliminde olur [134]. Ek olarak sineresiz, fermente süt jellerinin sütün çeşitli bileşenlerine, özellikle su fazına bağlanma yeteneğini ifade etmekte olup, fermente süt kalitesinin tersine çevrilebilir göstergesidir [135].



Şekil 4.6 Yoğurtların sinerezis (%) miktarları

Sonuçlarımız genel olarak değerlendirildiğinde depolama sırasında sinerezis oranının (%32.9-39.3) arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Probiyotik olan bakterilerin proteolitik enzimlerin eksikliğinden dolayı fermente ürünlerin temel kültüründe yavaş büyüdüğü bazı çalışmalarda vurgulanmıştır [135]. Bu veriler Chen vd. [136] yaptıkları çalışma ile benzer sonuçlar sergilemiştir. Sinerezis oranının katı içeriği ve yoğurttaki kullanılan starter kültürün türünden etkilenebildiği söylenebilir. Katı içeriğinin artması, yoğurt jel gücünü artırmakta ve gözenek boyutunu küçültmektedir. Bunun sonucunda da su daha sıkı bağlanır ve bu da yoğurdun sertliğini artırmaktadır [131].



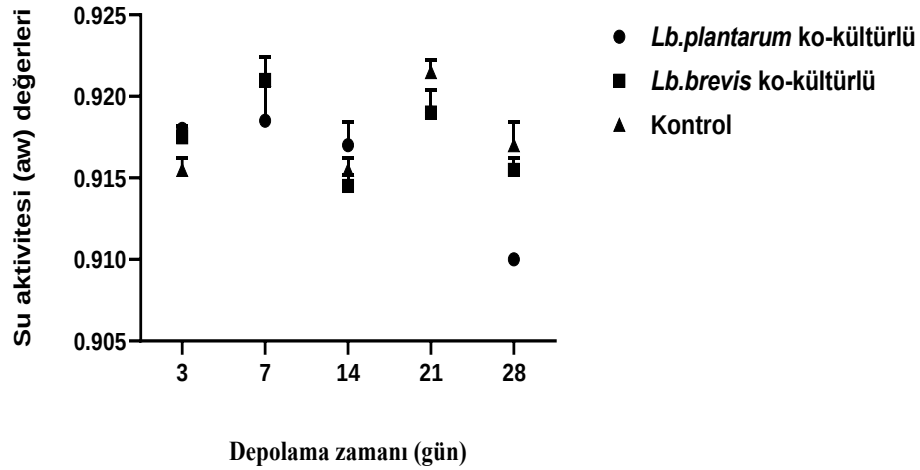
Şekil 4.7 Yoğurtların su tutma kapasiteleri (%)

Yoğurt örneklerinin su tutma kapasitelerinde ise, 3. gün ve 7. gün arasında önemli bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.7) ve 21.gündeki yardımcı kültürle hazırlanan yoğurt örneklerinin kontrole nazaran yüksek olduğu görülmüştür. Fakat genel olarak değerlendirildiğinde kontrol ve ko-kültürle üretilen yoğurtların arasında önemli bir farklılık görülmemiştir.

4.3.4 Su Aktivitesi

Su aktivitesinin hücre canlılığını veya hayatta kalmasını önemli ölçüde etkilediği belirtilmiştir. Ek olarak su aktivitesi, kimyasal ve enzimatik reaksiyonların yanı sıra mikroorganizmaların büyümesini, sporlanmayı, spor çimlenmesini ve metabolit üretimini doğrudan etkileyebilmektedir [137]. Depolama süresince a_w değerlerinin önemli ölçüde değişmediği görülmektedir. Yoğurt örneklerinin a_w değerlerinin

0.914 ile 0.922 arasında değişen değerleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Su aktivitesinin daha uzun bir lag fazı ve daha yavaş bir büyüme oranı ile sonuçlandığı vurgulanmıştır. Ayrıca düşük aw değeri mikroorganizma türüne göre değişiklik gösterdiğinden gelişebilecek mikroorganizma türünü de etkilediği kaydedilmiştir. Minimum aw değeri altında mikroorganizmalar daha yavaş ölür ve aw değeri ölüm gerçekleşmektedir [138].



Şekil 4.8 Yoğurt örneklerinin depolama zamanına bağlı olarak su aktivitesi değerleri

4.3.5 Renk Ölçümü

Maddelerin niteliğini ve kalitesini belirleyen önemli özelliklerden biri de renk olmaktadır. Gıda ve tarım alanında renk, incelenen malzemenin kalitesini belirlemede kullanılan önemli bir özelliktir [139]. Farklı yoğurt örneklerinin $4\pm1^{\circ}\text{C}$ ’de 3, 7, 14, 21 ve 28 gün depolama sonrasında belirlenen renk değerleri (L^* , a^* , b^*) Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Yoğurt örneklerinin renk değerlerinde depolama süresince açıklığın çoğunlukla azaldığı ve b^* değerindeki sarımsı renkte artış olduğu ve a^* değerinde gözle görülebilir bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Depolamanın artması ile parlaklığın çoğunlukla KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 yardımcı kültürü ile üretilen yoğurtta olduğu görülmüştür.

Tablo 4.2 Yoğurt örneklerinin 3,7,14,21 ve 28.gün 4±1 °C’de depolama sonrası renk değerleri

Depolama zamanı (gün)	Örnek	L^*	a^*	b^*
3	<i>L. plantarum</i> ko-kültür	77.52±0.12 ^{Ab}	-7.88±0.03 ^{Da}	7.25±0.01 ^{Aa}
3	<i>L. brevis</i> ko-kültür	77.93±0.06 ^{Ba}	-7.91±0.07 ^{Ca}	7.50±0.30 ^{Aa}
3	Kontrol	77.70±0.05 ^{Aab}	-7.90±0.01 ^{Ea}	7.28±0.02 ^{Aa}
7	<i>L. plantarum</i> ko-kültür	77.59±0.53 ^{Aa}	-7.89±0.07 ^{Dab}	7.35±0.10 ^{Ab}
7	<i>L. brevis</i> ko-kültür	78.71±0.18 ^{Aa}	-8.04±0.01 ^{Cb}	7.96±0.15 ^{Aa}
7	Kontrol	77.85±0.15 ^{Aa}	-7.79±0.02 ^{Da}	7.21±0.07 ^{Ab}
14	<i>L. plantarum</i> ko-kültür	75.39±0.19 ^{Bab}	-7.35±0.03 ^{Ca}	5.81±0.01 ^{Ba}
14	<i>L. brevis</i> ko-kültür	74.94±0.04 ^{CDb}	-7.26±0.11 ^{Ba}	5.70±0.42 ^{Ba}
14	Kontrol	75.79±0.10 ^{Ba}	-7.20±0.01 ^{Ca}	5.66±0.08 ^{Ba}
21	<i>L. plantarum</i> ko-kültür	74.90±0.11 ^{BCab}	-7.16±0.01 ^{Bb}	5.45±0.07 ^{Ca}
21	<i>L. brevis</i> ko-kültür	75.53±0.34 ^{Ca}	-7.16±0.03 ^{Bb}	5.64±0.23 ^{Ba}
21	Kontrol	74.40±0.23 ^{Cb}	-7.04±0.03 ^{Ba}	5.92±0.01 ^{Ba}
28	<i>L. plantarum</i> ko-kültür	73.85±0.20 ^{Ca}	-6.83±0.02 ^{Aa}	4.79±0.08 ^{Da}
28	<i>L. brevis</i> ko-kültür	74.66±0.14 ^{Da}	-6.89±0.03 ^{Aa}	4.90±0.26 ^{Ba}
28	Kontrol	74.47±0.35 ^{Ca}	-6.81±0.01 ^{Aa}	4.83±0.31 ^{Ca}

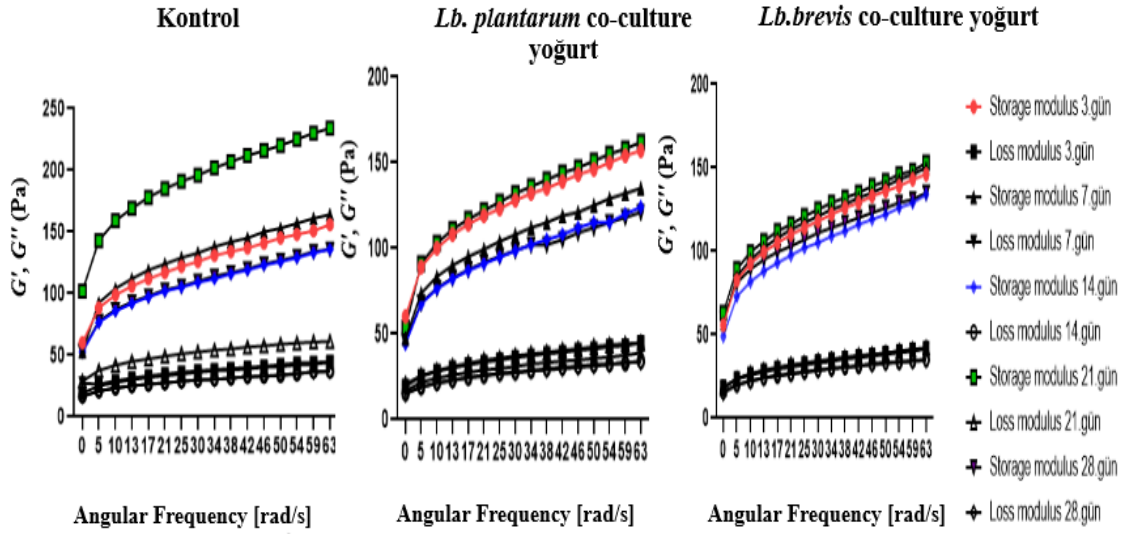
*Büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı örneklerin zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05).

*Küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar farklı örneklerin aynı zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05).

4.3.6 Reolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Gıda reolojisi, gıda malzemelerinin deformasyonu ve akışının incelenmesi olmaktadır. Süt jelleri viskoelastik özelliğe sahip olduğundan dolayı yoğurdun reolojik özellikleri hem viskoz hem de elastik bileşenler kullanılarak karakterize edilebilir. Viskoelastik, malzemenin ideal bir katının bazı elastik özelliklerine ve ideal (viskoz) bir sıvının bazı akış özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir [140].

Yoğurt örneklerinin 3, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki depolama zamanlarına bağlı olarak viskoelastik özellikleri frekans tarama testinde % 0.5 strain altında ölçülmüş olup G' ve G'' değerlerinin frekansa bağlı değişimi reogramlarda verilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Yoğurtların viskoelastik özelliklerini gösteren reogramlar

Frekans tarama testinde G' (elastik modulu) ve G'' (viskoz modulu) ifade etmektedir. Çalışmada yapılan analiz sonucunda elde edilen veriler Power-law modele göre uyarlanmıştır. Örnekler, $G' > G''$ göstermiş olup, elastik özellik sergilemişlerdir. Jel oluşumu sırasında, protein parçacıkları arasında ek bağların oluşması, protein ağındaki yeniden düzenlemeler ve sarkan jel ipliklerinin ağa olası bağlanması nedeniyle G' değerlerinin arttığı belirtilmiştir [141]. Benzer sonuçlar Pan vd [181] tarafından da kaydedilmiştir. Yoğurt, psödoplastik malzeme olarak sınıflandırılabilir (akışın başlaması için aşılması gereken bir akma gerilimi içerir). Eğer karıştırılan veya içilen yoğurtla uğraşıyorsak viskoelastik bir sıvı veya set yoğurt ile uğraşıyorsak viskoelastik bir katı olarak karşımıza çıkar [141].

Kontrol yoğurt örneğinin 21. gün analizinde yardımcı kültürü yoğurt örneklerine nazaran G' değerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Tüm örneklerde elastik özellik fazla iken 28. günde kısmen azalma meydana geldiği söylenebilir (Şekil 4.9).

Tablo 4.3 Yoğurt örneklerine power-law model uygulanarak viskoelastik özelliklerin belirlenmesi

		Örnek kodu	$G' = K'(\omega)^{n'}$			$G'' = K''(\omega)^{n''}$		
			$K'(\text{Pa})$	n'	R^2	$K''(\text{Pa})$	n''	R^2
Depolama zamanı (gün)	3	K	72.27±16.8 ^{ABa}	0.19±0.03 ^{Aa}	0.96	22.36±6.2 ^{Aa}	0.18±0.04 ^{Aa}	0.96
		L	59.41±3.0 ^{Aa}	0.22±0.00 ^{Aa}	0.99	17.77±0.8 ^{Aa}	0.20±0.01 ^{Aa}	0.99
		P	50.31±3.7 ^{Ba}	0.22±0.00 ^{Aa}	0.96	15.39±2.3 ^{ABa}	0.19±0.02 ^{Aa}	0.96
	7	K	66.92±2.9 ^{ABa}	0.21±0.01 ^{Aa}	0.99	19.82±0.6 ^{Aa}	0.19±0.00 ^{Ab}	0.99
		L	62.96±5.9 ^{Aab}	0.22±0.00 ^{Aa}	0.99	18.82±2.5 ^{Aa}	0.19±0.01 ^{Aab}	0.99
		P	47.60±3.1 ^{Bb}	0.23±0.01 ^{Aa}	0.99	15.03±1.1 ^{ABa}	0.21±0.01 ^{Aa}	0.99
	14	K	54.85±2.5 ^{ABa}	0.22±0.00 ^{Aa}	0.99	15.97±0.9 ^{Aa}	0.20±0.00 ^{Aa}	0.99
		L	53.63±6.2 ^{Aa}	0.22±0.01 ^{Aa}	0.99	15.86±1.5 ^{Aa}	0.20±0.00 ^{Aa}	0.99
		P	44.52±1.7 ^{Ba}	0.23±0.01 ^{Aa}	0.99	14.86±0.9 ^{ABa}	0.18±0.02 ^{Aa}	0.99
	21	K	84.25±1.6 ^{Aa}	0.20±0.00 ^{Aa}	0.99	24.12±0.2 ^{Aa}	0.18±0.01 ^{Aa}	0.99
		L	66.58±3.6 ^{Ab}	0.20±0.00 ^{Aa}	0.99	18.62±1.9 ^{Ab}	0.20±0.01 ^{Aa}	0.99
		P	62.42±2.2 ^{Ab}	0.22±0.01 ^{Aa}	0.99	19.02±0.3 ^{Ab}	0.20±0.00 ^{Aa}	0.99
	28	K	49.90±6.0 ^{Ba}	0.22±0.00 ^{Aa}	0.98	14.32±1.5 ^{Aa}	0.20±0.01 ^{Aa}	0.98
		L	52.56±9.5 ^{Aa}	0.21±0.03 ^{Aa}	0.99	13.94±0.8 ^{Aa}	0.20±0.01 ^{Aa}	0.99
		P	46.41±2.1 ^{Ba}	0.22±0.01 ^{Aa}	0.99	13.56±0.6 ^{Ba}	0.20±0.01 ^{Aa}	0.99

*Büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı örneklerin zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05).

*Küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar farklı örneklerin aynı zamanlar arasındaki farklılığı göstermektedir (p<0.05). (K: Kontrol yoğurt örneği, L: *L. brevis* ko-kültür yoğurt örneği, P: *L. plantarum* ko-kültür yoğurt örneği)

Farklı örnek türleri farklı depolama koşullarındaki dinamik reolojik ölçümlerin verileri Tablo 4.3'de verilmiştir. Yoğurt örneklerinin belirlenen kesme aralığında bulunan değerlerin kesme hızı-kesme stresi değerleri Power-Law modeli uygulanarak, örneklerin kıvam katsayısı ve akış davranış indeksi değerleri bulunmuştur. Elastik kıvam katsayısı değerlerinde 3,7 ve 14. günlerde azalma olurken, 21.günde artış meydana gelmiştir. Akış davranış indeksi ile Kıvam katsayıları arasında ters orantı gözlemlenmiştir. R^2 değerleri ise 0.96-0.99 arasında değişiklik göstermiştir.

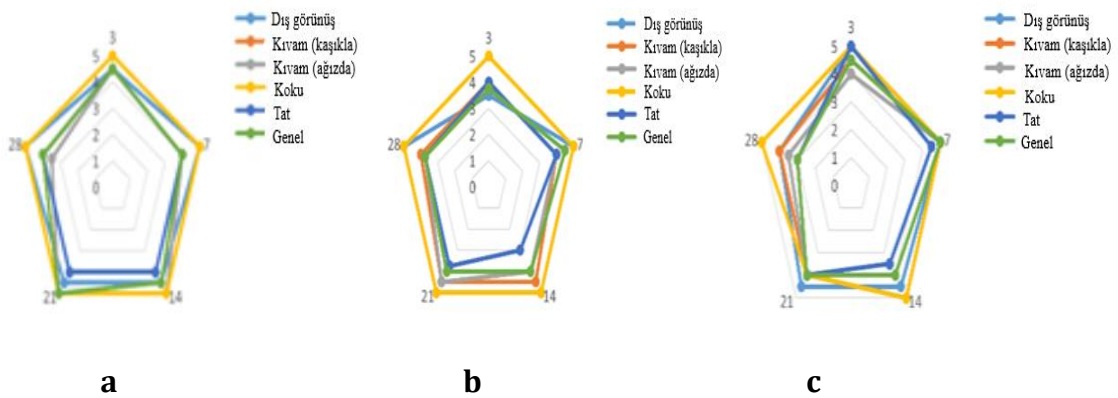
4.3.7 Yoğurt Örneklerindeki GABA Miktarlarının Belirlenmesi

2.25 mg/mL MSG kullanılan yoğurt örneklerinde GABA üretim miktarları kontrol ile kıyaslandığında aralarında bir fark görülmediğinden sonuçlar verilmemiştir. Yardımcı kültür ile üretilen yoğurtların GABA miktarının kontrol örneğinden farksız olması üretimde kullanılan KCO-48 *L. brevis* ATCC 14869 ve 45MK-30 *L. plantarum* JCM 1149 bakterilerinin yoğurttaki fermantasyon koşuluna uygun olmadığı söylenebilir. *L. plantarum* suşlarının yoğurt üretiminde ek kültür olarak yaygın

olarak kullanılmadığı yapılan çalışmalarda kaydedilmiştir. Bunlardan bir tanesi Mırlohi vd. [133] yaptıkları çalışma olmuştur. *L. plantarum*, yoğurt kültürüne yardımcı kültür olarak uygulanmasının ticari yoğurt fermantasyon prosesinde yer alan termofilik koşullara duyarlı olmasından dolayı kabul edilebilir bir ürünle sonuçlanmadığı gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak kullanılan suşların her ikisinin fermantasyon sıcaklığından etkilenmesi GABA üretimi üzerinde olumsuz etkiye neden olduğu söylenebilir.

4.3.8 Duyusal Analiz

Duyusal değerlendirme özellikle öznel ve bu nedenle kişisel zevk sonuçlara yansiyabilir. Bu nedenle sonuçlardaki farklılıkların bireysel varyasyonlardan etkilenebileceği anlaşılmıştır. Puanlama ve sıralama testi uygulanarak elde edilen duyusal analiz verileri ile yardımcı kültürle yapılmış yoğurt örnekleri üzerine tüketici algısının etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Genel veri beğenilerine göre en çok beğenilen örneğin KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 ilaveli yoğurt örneği olduğu gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak en az beğenilen örnek türünün *Lb. plantarum* ilaveli olduğu belirlenmiştir. Puanlama testi sonuçlarına göre dış görünüş, kıvam (kaşıkla), kıvam (ağızda), koku ve tat açısından en yüksek değere KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 ilaveli yoğurt örneği olmuştur. Genel olarak tüm örnekler koku açısından değerlendirildiğinde aralarında bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Yoğurt ürünlerine uygulanan duyusal analiz puanlama testi (**a**: *L. brevis* ko-kültür, **b**: *L. plantarum* ko-kültür, **c**: Kontrol)

Song vd. [142] yaptıkları çalışmada *Lb. brevis* suşunun yoğurtta fonksiyonel özelliği geliştirdiğini fakat duyusal değerlendirme açısından diğer yoğurt örneklerine kıyasla herhangi bir farklılığın olmadığını belirtmişlerdir.

EKŞİ HAMUR ORJİNLİ MAYALARIN PROBİYOTİK NİTELİKLERİNİN BELİRLENMESİ

5.1 Giriş

Günümüzde insanlar ve hayvanlar için fizyolojik sağlık yararları olan gıdalar ve besinler topluca “sağlık/fonksiyonel gıda” olarak tanımlanmaktadır. Bağırsak mikrobiyal dengesinin düzenlenmesi, bağışıklık modülasyonu ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının azaltılması gibi konakçı için yararlı etkiler sağlayabilen, yeterli miktarlarda canlı mikroorganizmalarla desteklenmiş gıdaların pazarlanmasına odaklanılmıştır. Bu mikroorganizmalar, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Gıda ve Tarım Örgütü tarafından probiyotik olarak kabul edilmiştir [143]. Probiyotikler canlı mikroorganizmalar (bakteri veya mayalar) olarak tanımlanmaktadır ve uygun bir konsantrasyonda yutulduğunda, konakçı üzerinde çeşitli faydalı etkiler göstermektedir. Bilinen probiyotik mikroorganizmalar arasında, laktik asit bakteri (LAB) türleri (örn., *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Enterococcus*) ve *Bifidobacterium* bulunmaktadır [144]. Probiyotik aktiviteler suşla ilgili olduğundan, endüstriyel uygulama için uygunluklarını ve performanslarını belirlemek için suş tanımlamasının tavsiye edildiğini belirtmek önem arz etmektedir [145].

5.1.1 Probiyotiklerin Seçilmesinde Belirlenen Kriterler

Uygun bir probiyotik kültürün seçimi fonksiyonel gıdalarda başarılı bir şekilde uygulanabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Giraffa [146] gıda endüstrisinde kullanılacak probiyotikler için seçim kriterlerini güvenlik yönleri, fonksiyonel yönler, teknolojik yönler ve stres tepkisi olarak sıralamıştır ve bu özellikleri içerenler aşağıda belirlenen önemli kriterlere dayanmalıdır:

- a) İnsan veya hayvan kökenli
- b) endojenik bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen bakteriyosinlere ve asitlere karşı direnç;
- c) bağırsak ekosisteminin mikrobiyotası ile rekabet gücü;

- d) Bitmiş ürünlerde yüksek depolamada hayatta kalma oranı;
- e) bakteriyofajlara direnç;
- f) onaylanmış ve belgelenmiş sağlık etkileri;
- g) iyi duyuşal özellikler;
- h) büyük ölçekli üretim;
- i) düşük gastrik pH'da hayatta kalmak;
- j) endüstriyel üretim ve depolama koşullarında hayatta kalma;
- k) düşük pH ve proteolitik enzimlerde hayatta kalma;
- l) asit ve safra toleranslı;
- m) mukozal yüzeylere yapışma;
- n) patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite;
- o) safra tuzu hidrolaz aktivitesi;
- p) sindirim sisteminin çoğalması ve kolonizasyonu;
- q) gıdada canlılık;
- r) gıdada işlevsellik;
- s) gıda kalitesi üzerindeki etkisi;
- t) hayatta kalmayı artırmak için savunma mekanizmalarının varlığı;
- u) ticarileştirmeye uygun olmalıdır;
- v) plazmit stabilitesi dahil fenotip ve genotip stabilitesi;
- w) karbonhidrat ve protein kullanım tarzı;
- x) antibiyotik direnç tarzı;
- y) ekzopolisakkarit üretme kapasitesi; ve
- z) epitel hücrelerine yapışma gibi özellikler sayılabilmektedir [147].

Sayılan bu özelliklere bakıldığında yapılan çalışmaların çoğu bakterilerin probiyotik mikroorganizmalar olarak kullanımına odaklanırken, mayaların probiyotik özelliklerinin belirlenmesi üzerine çalışmaların yetersiz olduğu görülmüştür [143].

5.1.2 Probiyotik Olarak Mayalar

Günümüzde modern maya biyoteknolojisinin ürünleri, gıda, içecek, ilaç, endüstriyel enzimler ve diğerleri dahil olmak üzere ticari açıdan önemli birçok sektörün bel kemiğini oluşturmaktadır. EFSA'ya (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) göre QPS (Qualified Presumption of Safety) statüsüne sahip olan *Saccharomyces cerevisiae*, çeşitli teknolojik özellikler gösterdiği gıda fermantasyonunda en yaygın kullanılan

maya türü olmaktadır. Mayalar, birçok yerli gıda ürününün kendiliğinden fermentasyonunda da önemli bir rol oynamaktadır. Probiyotik potansiyeli olan maya suşlarının bulunmasına büyük ilgi vardır. *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lodderae* gibi farklı maya türleri, gastrointestinal kanaldan geçişe veya enteropatojenlerin inhibisyonuna tolerans göstermiştir. Ancak *Saccharomyces boulardii*, klinik etkileri olan tek maya ve çift kör çalışmalarda probiyotik etkinliği kanıtlanmış tek maya preparatı olmaktadır. *S. boulardii*, 1920'lerde Henri Boulard tarafından Çinhindi'ndeki litchi meyvesinden izole edilmiştir. Özellikle ilaç endüstrisinde probiyotik maya olarak ve ishalin önlenmesi ve tedavisi için liyofilize formda yaygın olarak kullanılmaktadır [148]. *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* suşları günümüzde probiyotik maya türleri olarak karşımıza çıkmış olup, bunlardan, *S. cerevisiae* suşunun hayvanlar için canlı kültür olarak eklenmesi durumunda konakçılarda büyüme, sağlık ve bağışıklık tepkisini iyileştirdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, mayaların doğal kaynaklardan probiyotik olarak izolasyonu ve karakterizasyonu için özel hususlar gerekmektedir [149]. Birçok geleneksel tahıl gıdası (biza, tarhana, şalgam, Fura, brembali, buruku vb.), canlı formda maya içerebilmektedir. Bu nedenle, bu ürünler veya diğer geleneksel tahıl ürünleri için probiyotik/fonksiyonel mayaların kullanılması, bunların değerlendirilmesi için uygun bir yol olabilir [150]. Mayalar bitkiler, hayvanlar, toprak ve su gibi farklı ortamlarda yaşayabilirler. Deri, su hayvanları da dahil olmak üzere hayvanların gastrointestinal sistemi ve ayrıca fermente gıdalar ile de ilişkilendirilebilirler [149].

5.1.3 Gastrointestinal Koşullara Direnç

Mayalar büyük ve heterojen bir ökaryotik grubu oluşturmaktadır. İnsanların, bitkilerin, havadaki partiküllerin ve gıda ürünlerinin gastrointestinal dahil olmak üzere doğal ortamlarda yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar olmaktadır [151]. Proteinlerin, B vitamininin, eser minerallerin ve çeşitli bağışıklık uyarıcı bileşiklerin (proteazlar, β glukanlar ve mannan oligosakkaritler) yüksek içeriği, mayaların probiyotik olarak kullanımına olan ilgiyi artırmıştır [144]. Bağırsak mikrobiyotasındaki bakteri sayısı vücuttaki insan hücrelerinden on kat daha fazla olmaktadır. Çoğunluğu anaerobik olmak üzere 1000 farklı tür içerir ve insan genomundan 200 kat daha fazla gen kodlar. Mikrobiyotadaki maya yüzdesi yaklaşık

%0,1 olmaktadır ve sağlıklı yetişkinlerin yaklaşık %70'inin bağırsaklarında saptanabilme özelliğine sahiptir. Gastrointestinal sistemin mikroorganizma izolasyonunda, *Torulopsis glabrata* ve *Candida tropicalis* gibi maya türleri zaman zaman sistem boyunca farklı konsantrasyonlarda geri kazanılır; örneğin midedeki maya konsantrasyonunun 10^2 olduğu ve bunun da kolonda maksimum 10^6 'a yükseldiği belirtilmiştir. Gastrointestinal sistem için midedeki birincil bariyer, düşük pH'ı ve enzim varlığı ile ilgili olarak engelleyici bir etkiye sahip olan mide asidi olmaktadır. Yapılan çalışmalarda fekalden ve kefirde izole edilen mayalar, insan mide-bağırsak sisteminin koşullarına yüksek adaptasyon ile karakterize edilir. 37°C 'de 8 saat boyunca pH 2.5'e maruz bırakıldığında, hayatta kalma oranı % 86-97 olmuştur. Dışkıdan elde edilen mayaların pH 1.5'te hayatta kalma oranı ise % 85-92 olarak kaydedilmiştir [149]. Araştırmalarda görüldüğü gibi probiyotiklerin gastrointestinal sistemden geçişi tolere etme yeteneği, Chen vd. [152] tarafından gösterildiği gibi suşa bağlı olmaktadır. Bununla birlikte, GIT'den maya geçişi sırasında, hücrelerinin hızlı kendi kendine kümelenme (ortalama 30 dakika) yaşadığı ve atılmadan önce hızla mukozaya yapışabileceği belirtilmelidir. Ek olarak, tek bir maya hücresinin, bağırsak hücresinin yüzeyine yapışması için bakterilerden daha büyük bir alana ihtiyacı olduğu vurgulanmıştır [144].

5.1.4 Epitel Hücrelere Tutunma

Probiyotik özelliklerin belirlenmesinde bir diğer önemli nokta epitel hücrelere yapışma parametresidir. Epitelyal hücrelere mikrobiyal yapışma, probiyotik suş hücre yüzeyinin kimyasal ve fizyo-kimyasal bileşimine bağlı olan iki zarı (yani mikrobiyal ve insan hücreleri) içeren karmaşık bir temas sürecini içermektedir. Bu davranış, yüzeyde bulunan elektrostatik ve Van der Waals etkileşimlerinin dengesine bağlı olmaktadır. Ancak bazı çalışmalar bakteriyel hücre dışı bileşenlerin ve onu çevreleyen bileşimin yapışmayı etkileyebileceğini göstermiştir. Mikroorganizmaların epitel hücrelerine yapışması, hücre yüzeyinin hem otoagregasyon kapasitesi hem de hidrofobik özelliklerine bağlı olmaktadır. Mikrobiyal hücre otoagregasyon yeteneği, probiyotiğin, yapışma mekanizmasına katkıda bulunan bağırsakta yüksek bir hücre yoğunluğuna ulaşmasını sağlarken, hücre yüzeyi hidrofobikliği, mikroorganizma ve insan epitel hücreleri arasında gelişmiş bir etkileşime izin vermektedir [144]. Epitel ve endotel hücrelerini istila

etme ve kan dolaşımına erişim sağlayan dokulara zarar verme kabiliyeti bazı patojenlerle ilişkili olduğundan, maya gelişiminin psödohipal formda değerlendirilmesi de gerekli olmaktadır [153].

Probiyotiklerin konakçı (epitelyal) hücrelerle yapışma yoluyla etkileşimi, bağışıklık modülasyonuna yol açan bir sinyal kaskadını tetikleyebilir. Probiyotiklerin konak epitel hücrelerine doğrudan yapışması birçok in vitro çalışmada gösterilmiştir. Bununla birlikte, in vivo olarak bağırsak epitel hücrelerine probiyotik ve kommensal bakteriyel yapışma gösterilememiştir. Çünkü bu tür bakteriler sadece dış mukus tabakasına yapışır ve onu istila eder, ancak epitel hücrelerinin kendilerine ulaşamazlar. Probiyotikler ve bağırsaktaki konak hücreler arasındaki bir başka doğrudan temas, bakterilerin epitel hücrelerinin (M-hücreleri olmayan) altında lokalize olan DC'ler tarafından içselleştirilmesiyle oluşmasıdır [154]. Bunlara ek olarak, probiyotik mikroorganizmalar, bağırsak mukus tabakası ve epitel ile doğrudan etkileşime girerek, bağırsak bariyer fonksiyonunu ve mukozal bağışıklık sistemini etkileme özelliğine de sahiptir [147].

5.1.5 Antibiyotik Direnci

Maya, antibiyotik etkisine karşı bağışık olduğundan dolayı probiyotik bakterilere iyi bir alternatif olmaktadır ve antibiyotikle ilişkili insan bağırsak hastalıklarını önleyebilir, antibiyotik kullanımını azaltabilir ve bu nedenle antibiyotik direncinin gelişimini sınırlayabilir. Bu nedenler, araştırmacıların dikkatlerini probiyotik özelliklere sahip diğer maya türlerinin çalışmasına odaklamaya yöneltmiştir [143].

5.1.6 Antimikrobiyal Aktivite

Patojenik bakterileri inhibe etmek için antagonistik bakterilerin kullanımı yıllar içinde kapsamlı bir şekilde araştırılırken, benzer bir role sahip olan mayalara ilgi az olmaktadır. Mayalar tarafından mikroorganizmaların antagonizmi başlıca; besinler için rekabete, büyümeye bağlı iyon değişimi veya organik asit üretiminin sonucu olarak ortamda pH değişimine, yüksek konsantrasyonlarda etanol üretimine ve antibakteriyel bileşiklerin salgılanması ve öldürücü toksinler veya "mikosinler" gibi antimikrobiyal bileşiklerin salınmasına bağlı olmaktadır. Mikotoksinler, bileşik için reseptör taşıyan duyarlı mayalarda hücre zarı işlevini bozan ekstrasellüler proteinler veya glikoproteinler olmaktadır. Mikosin, sitoplazmik zar üzerinde kanalların oluşmasıyla iyon sızıntısına neden olur ve DNA sentezini bloke ederek

hücre bölünmesini kesintiye uğratar. Mikotoksinlerin faaliyetleri öncelikle koruyucu bir faktöre sahip olan üretici bir suşla yakından ilişkili olan mayalara yönelik olmaktadır. Mikotoksin üretimi *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* ve *Zygosaccharomyces* gibi birçok maya cinsi arasında meydana gelmektedir [155].

Probiyotikler, bağırsağa yapıştıktan sonra karbonhidratları, proteinleri ve diğer küçük bileşikler organik asitler, enzimler, hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve düşük moleküler gibi patojenik bakterileri öldürebilecek önemli maddelere dönüştürerek hücre dışı antimikrobiyal bileşenler üretirler. Probiyotik antagonizma ile diğer mekanizmalar arasında besin için rekabet, patojenlerle pıhtılaşma ve bağışıklık sistemi uyarımı yer alır. Bu antagonist aktiviteler mikrobiyal türlere göre değişmektedir [144].

5.1.7 Anti-kolesterol Aktivite

Araştırmalarda probiyotiklerin kolesterol serum seviyesini düşürerek kalp rahatsızlığını önlediği kaydedilmiştir. Probiyotikler, kolesterolün çözünürlüğünü azaltmak için hareket etmekte ve sonuç olarak bağırsaktan alımını azaltmaktadır [144].

5.1.8 Anti-obezite ve Anti-diyabetik Faaliyetler

Probiyotikler, bağırsak flora kompozisyonunu modüle ederek ve glukagon benzeri peptit-1 ve gastrik inhibitör polipeptit gibi bağırsak hormonlarının oluşumunu uyararak vücut ağırlığı artışı ve insülin direncini baskılayabilme özelliğine sahiptir. *L. acidophilus* La5, *L. casei* DN001, *L. gasseri* SBT2055, *L. paracasei* F19 ve *B. Lactis* Bb12 gibi belirli probiyotik suşların in vivo çalışmaları, tip II diyabeti ve kilo alımını önleme potansiyellerini göstermiştir. Ancak, bu çalışmalarda özellikle probiyotik dozajı ve kullanılan türler büyük önem arz eder. Anti-obezite ve anti-diyabetik aktiviteye sahip probiyotiklerin seçimi, farklı in vitro taramalarla başlatılabilir [144].

5.1.9 Mayaların Fitaz Aktiviteleri

Fitazlar; filamentli küfler, gram pozitif ve gram negatif bakteriler ve mayalar dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalarda yaygındır. Mayalardan *Candida krusei* (*Issatchenkia orientalis*), *Schwanniomyces castellii*, *Debaryomyces castellii*, *Arxula*

adeninivorans, *Pichia anomala*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia spartinae*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula gracilis*, *S. cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida spp.* ve *Kluyveromyces lactis* fitaz üreticileri olarak tanımlanmıştır. *S. cerevisiae* tarafından fitaz üretimi farklı çalışmalarda araştırılmıştır. *S. cerevisiae*'nin fitaz aktivitesi, kısmen hücreler tarafından büyüme ortamına salgılanan ve inorganik fosfat (Pi) tarafından baskılanan salgı asit fosfatazların (SAP'ler) aktivitesine bağlı olmaktadır [148].

5.1.10 Probiyotik Mayaların Sağlık Üzerine Etkisi

Probiyotik mayalara atfedilen faydalı etkilerin sayısı Tablo 5.1'de listelenmiştir. Probiyotik mayalar büyüklükleri (bakterilerden daha büyük), antibiyotiklere karşı dirençleri ve aerobik koşulların büyümesi için talep açısından probiyotik bakterilere kıyasla farklı fizyolojik yapıya ve etkilere sahiptir [156].

Tablo 5.1 Probiyotik mayaların sağlık üzerine olumlu etkileri [156]

Probiyotik mayalar	İşlevi	Sağlık üzerine faydası
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Probiyotik etkiler	Enterik bakteriyel patojenlerin ve toksinlerin nötralizasyonu Antimikrobiyal ve Anti-maya özellikler
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		Epitel hücre bariyerinin korunması Epitel bariyer bütünlüğünün korunması Anti-inflamatuar özellikler Bağışıklık düzenleyici etkiler
<i>Metschnikowia gruessii</i>		Bağırsak mukozasında trofik etkiler İrritabl bağırsak sendromu (IBS), kolit, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) ve Crohn hastalığında adjuvan tedavi Çeşitli ishal türleri üzerinde klinik etkiler; enfeksiyöz diyare, edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromundan (AIDS) kaynaklanan diyare ve enteral tüple beslenmeden kaynaklanan diyare <i>H. pylori</i> eradikasyonu Serum kolesterol seviyelerinde azalma Besin alımını geliştirme

Probiyotik mayalar konakçılarını üç ana yolla etkilemektedir.

(i) Probiyotik mayalar, A ve B *Clostridium difficile* toksinleri, Kolera toksini ve *Escherichia coli* LPS gibi yaygın bakteriyel toksinlere karşı antitoksik faktörler olarak işlev görür. Ayrıca, antimikrobiyal aktiviteye sahip olarak, hücrelerin sıkı bağlantılarını da koruyabilir ve patojenik bakterilere yapışarak istilalarını azaltabilir.

ii) Probiyotik mayalar (özellikle *S. boulardii*), tropik poliaminler (spermin ve spermidin) ya da besin parçalanması ve emilimi üzerinde pozitif bir etkiye sahip olan sukroz, izomaltaz, maltaz-glukoamilaz, α -glukosidaz ve alkalın fosfataz gibi diğer enzimler tarafından salınarak enterositlerin olgunlaşmasını uyarmaktadır.

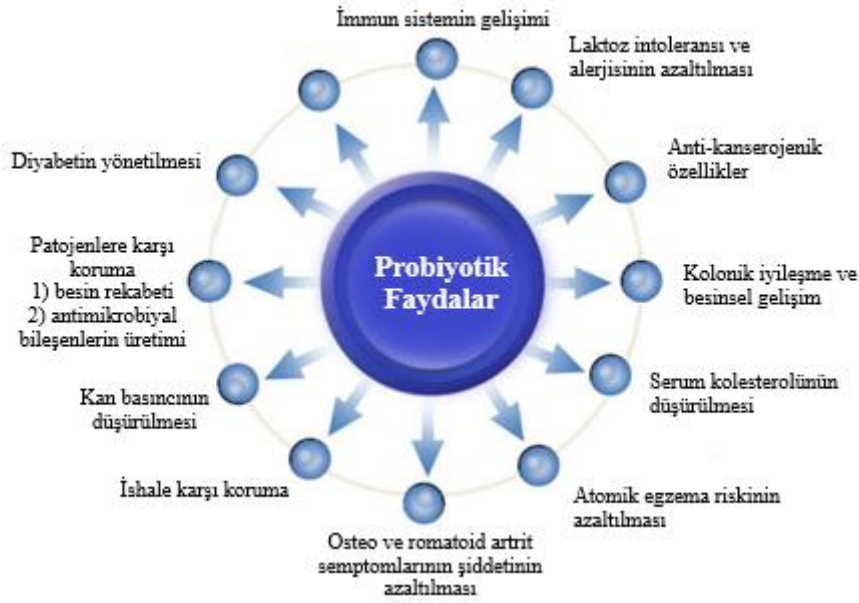
iii) Akut nekrotizan pankreatit (ANP) sıçanlarında *S. boulardii*'nin uygulanması, salgılayıcı fosfolipaz A₂ (sPLA₂) ve IL-6'yı azaltmıştır. Fosfolipaz A₂, araşidonik asit yoluyla eikosanoidler ve trombosit aktive edici faktörler gibi proinflatuar lipid mediatörlerinin üretilmesinden sorumlu bir enzimdir [156].

Probiyotik mayaların diğer önemli faydaları arasında düzenli olarak 10⁶–10⁷ cfu/g'dan fazla tüketildiği zaman serum kolesterol seviyelerini düşürmesi, GI hastalıklarının oluşumunu azaltması, bağışıklık sistemini uyarması, besin alımını artırması ve özellikle bağırsak kanseri insidansını düşürmesi sayılabilmektedir.

5.1.11 Kanser Üzerine Etkisi

Probiyotikler ve metabolitlerinin (organik asitler, bakteri cinsi, peptidler vb.) hücresel proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, inflamasyon, anjiyogenez, metastaz düzenleyen önemli metabolik yollarla etkileşime girdiği kaydedilmiştir. Patojenik bağırsak florasının rekabetçi dışlanması, bağırsak mikroflora enzim aktivitesinin değiştirilmesi, karsinojenik sekonder safra asitlerinin azaltılması, kanserojenlerin ve mutajenlerin bağlanması yoluyla karsinogenezin başlamasını ve ilerlemesini engelleyen çok sayıda laktik asit bakterisi (LAB) bulunmaktadır. Benzer şekilde, *S. cerevisiae* suşunun da in vivo ve in vitro olarak önemli anti-proliferatif ve antitümör etkiler gösterdiği kaydedilmiştir. Ayrıca, kanserin önlenmesinde, konakçının bağışıklık tepkisinin güçlendirilmesi, potansiyel kanserojenlerin bağlanması ve parçalanması, bağırsak mikroflorasındaki değişiklikler, anti-tümör geni üreten veya anti-mutajenik bileşiklerin üretilmesi, bağırsak mikroflorasının metabolik

aktivitelerinde iyileşme, kolondaki fiziko-kimyasal koşulların değiştirilmesi, konakçının fizyolojisi üzerindeki etkiler, antioksidan fonksiyon ve son olarak apoptoz ve anti-proliferatif etkilerin uyarılması varsayılan karsino genlerinin (örneğin, safra asidini bozan bakteriler) üretilmesiyle suçlandığı belirtilmiştir. Bu faydalı etkiler, bazı probiyotik maya suşlarının kanser tedavisinde adjuvan olarak kullanılmasını önermektedir [156]. Probiyotiklerin sağlık üzerine etkileri Şekil 5.1’de gösterilmiştir.



Şekil 5.1 İnsan sağlığı ve beslenmesi üzerine probiyotiklerin faydaları [156]

5.2 Materyal ve Yöntem

5.2.1 Oto-agregasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

Oto-agregasyon yeteneklerinin belirlenmesi Gut vd. [157] tarafından tanımlanan metoda göre belirlenmiştir. Oto-agregasyon sonuçları;

$Au = (OD_t / OD_0) \times 100$ olarak verilmiştir.

OD_t ve OD_0 inkübasyondan önce ve inkübasyondan sonra optimal yoğunluk olmaktadır. Yüzde değerleri $Au < 30$ düşük, 30-60 arası orta ve $60 < Au$ yüksek olarak değerlendirilmiştir.

5.2.2 Hidrofobisite Testi

14 maya kültürünün hidrofobisite yeteneklerinin belirlenmesi için YPD sıvı besiyeri içerisinde mayalar 24 saat 30 ° C’de gelişime bırakılmıştır. Daha sonra hücreler PBS

ile 2 kere yıkanmıştır ve aynı solüsyonda süspanse edilmiştir. Ardından spektrofotometre ile OD değerleri 560 nm’de yaklaşık olarak 1’e ayarlanmıştır. Süspansiyondan 3 mL alınarak 0.6 mL dietileter ve n-heksadekan ile vorteks yardımıyla karıştırılmıştır ve 1 h 37 ° C’ye bırakılmıştır. 1 h sonunda üst faz alınarak OD 560 nm’de değerler ölçülmüştür. Hücre yüzey hidrofobisite değerleri şu formüle göre ölçülmüştür [157]:

$$H\% = [(OD_0 - OD_t) / OD_0] \times 100$$

OD₀ ve OD_t optik yoğunlukları dietileter ve n-heksadekan ekstraksiyonundan önce ve sonrasını ifade etmektedir.

5.2.3 Antibiyotik/Antifungal Disklerine Karşı Direnç

Ekşi hamurdan izole edilen 14 maya izolatının antibiyotiklere karşı hassasiyeti belirlemek için mayalar YPD sıvı besiyeri içerisinde 24 saat 30 °C’de gelişime bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra YPD agar üzerine 10⁻² dilüsyonundan yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır ve ampicillin (AM, 10 mcg), kanamycin (K, 30 mcg), penicillin (P, 10 U), amphotericin B (AMB, 20 mcg), clotrimazole (CLT, 10 mcg), flucanazole (FLU, 25 mcg), ketoconazole (KTC, 10 mcg) ve nystatin (NY, 100 U) diskleri yerleştirilmiştir. Son olarak 24 saat 30 ° C’de inkübe edilmiştir.

5.2.4 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Geleneksel olarak yapılan ekşi hamur örnekleri Türkiye’nin 6 farklı kısmından (Bozcaada, Kıbrıs/Lefkoşa, Manisa/Kırkağaç, Bilecik, Bursa/Osmangazi, Ankara/Pursaklar) toplanmıştır. 62 izolatın 14 maya kültürünün probiyotik özelliklerine bakılmıştır. Maya suşlarının antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi Demirbaş vd. [55] göre yapılmıştır. Çalışmada *Escherichia coli* ATCC25922, *Listeria monocytogenes* (ATCC®R 13932), *Salmonella typhimurium* (ATCC®R 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC®R 29213), *Bacillus cereus* ATCC11778 patojenleri kullanılmıştır. Patojen bakterilerin, TSB (Tryptic Soy Broth, Merck) sıvı besiyerine %1 inokulasyonu gerçekleştirildikten sonra aerobik koşullarda 37°C’de 24 saat gelişime bırakılmıştır. Maya izolatları ise YPB sıvı besiyerine %1 inokulasyonu gerçekleştirildikten sonra aerobik koşullar altında 30°C’de 24 h inkubasyona bırakılmıştır. Maya kültürleri 1 gece geliştikten sonra 10 dakika 5000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan hücre kültürlerinin uzaklaştırılması için 0.22

üm steril filtrelerden geçirilmiştir. Filtre edilen süpernatantın pH'sı NaOH ile 6.0'a ayarlandıktan sonra üzerine H₂O₂ katalaz (Merck) ilave edildikten sonra oda koşullarında yaklaşık 30 dak bekletilmiştir. Bekletilme süresi sonunda tekrar filtreleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan patojen bakteriler dökme yöntemle TSA'ya yayılmıştır. Açılan steril kuyucuklara filtreden geçirilmiş maya kültürlerinin süpernatantlarından 20 µL damlatılmıştır ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda zon çapları mm olarak kaydedilmiştir.

5.2.5 Düşük pH ve Safra Tuzuna Direnç

Maya kültürlerinin düşük pH ve safra tuzuna karşı dirençliliği İspirli vd. [158] belirlediği metoda göre yapılmıştır. İlk önce maya kültürleri YPD broth içerisinde 24 h 30 °C'de gelişime bırakılmıştır. Daha sonra YPD sıvı besiyerinin pH'sı 1 M HCl kullanılarak 2.5'e ayarlanmıştır. Diğer taraftan başka bir YPD Broth'a %0.3 (w/v) konsantrasyonda safra tuzu ilave edilmiştir. Bu sıvı besiyerine maya inokülasyonu yapılarak 24 saat 30 ° C'de inkübasyona bırakılmış ve 0., 24., 48. ve 72. saatlerdeki gelişme seviyeleri OD 600 nm'de ölçülmüştür.

5.2.6 Antifungal Aktivite

Antifungal aktivite için PDA agar üzerine küfler çizilerek 5-6 gün 25 ° C'de gelişime bırakılmıştır. Küf suşları olarak; *A.niger*, *A.flavus*, *Penicillium carneum*, *A.oryzae*, *A. brasiliensis*, *Penicillium commune* kullanılmıştır. Diğer taraftan mayalar PDA agar üzerine spot yöntemiyle (her bir spot 20 µL olacak şekilde) damlatıldıktan sonra 25 ° C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır Gelişen mayaların üzerine 10⁴ küf içeren yumuşak PDA agar (% 0.85) dökülüp ve 1 gün gelişime bırakılarak zon ölçümü mm olarak kaydedilmiştir [55].

5.2.7 İstatistiksel Analiz

Deneylerin verileri paralel sonuçların ortalaması alınarak yapılmıştır. One-way ANOVA metodu için tüm analizlerin verileri için JMP 9 programı kullanılarak uygulanmıştır. Ortalama karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılarak p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5.3 Araştırma Bulguları ve Tartışma

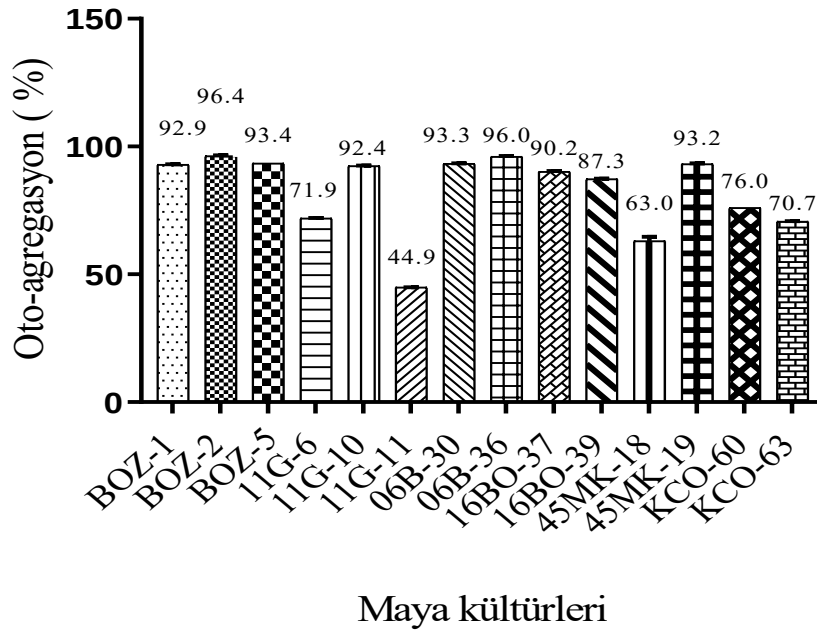
5.3.1 Oto-agregasyon ve Hidrofobisite Yeteneklerinin Değerlendirilmesi

Oto-agregasyon, küme oluşumunun mikroskopik bir gözlemdir ve hücrelerin inorganik veya hücre dışı ölçümlerine bağlıdır. Kolonda biyofilm oluşumunu ve kolonizasyonunu kontrol etmek için önem arz etmektedir [159]. Ayrıca oto-agregasyon, probiyotik mayaların yapışkan özelliklerini ölçmenin bir başka dolaylı yolu olmaktadır [160].

Aynı zamanda otoagregasyon ve hücre yüzeyi hidrofobikliği yüzey özelliklerinin analizleri, probiyotiklerin epitel hücrelerine yapışmasını desteklemektedir. Otoagregasyon, hücrelerin ortamda kendiliğinden çökelmelerine neden olan geri dönüşümlü bir birikim olarak karşımıza çıkar. Kendi kendine toplanma, farklı hücre duvarı bileşimlerinden ve uzantıların varlığından veya adezinlerin miktarından da etkilenebilmektedir. Bir probiyotik potansiyeli incelenirken, hücresel agregatlar da dikkate alınmalıdır. Çünkü agregatlar, mikroorganizmaların GI sisteminde kalıcılığı ve kolonizasyonu için ön koşul olarak bilinen bağırsaklara yapışma yeteneğini artırabilir. Mayaların otoagregasyon yetenekleri bakterilerden daha iyi olmaktadır. Çünkü mayalar, daha büyük ve ağırdır. Bu özellik de onların daha hızlı ve daha yüksek oranlarda çökelmelerini sağlar [161]. Otoagregasyona genellikle topluca otoagglütininler olarak adlandırılan proteinler ve ekzopolisakkaritler gibi kendi kendini tanıyan yüzey yapıları aracılık eder. Bununla birlikte, yaygın bir fenomen olmasına rağmen, bazı durumlarda otoagregasyonun işlevi tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı veriler, toplanan bakteri veya maya hücrelerinin, probiyotik süşun özelliklerinden biri olarak kabul edilen çevresel streslerden veya konak tepkilerinden korunduğunu göstermektedir [162].

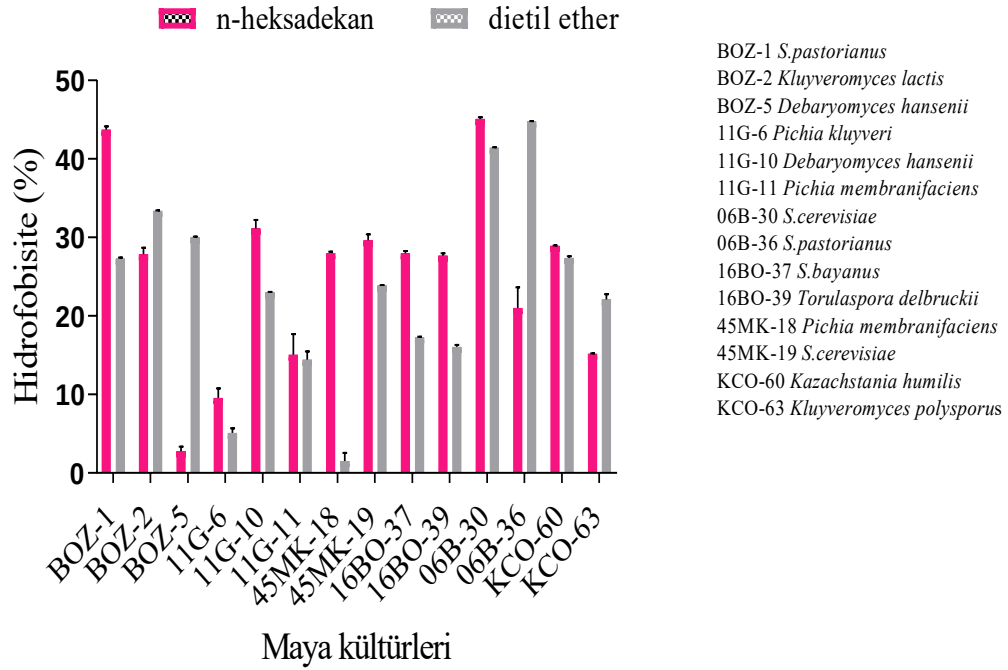
Bu çalışmada 14 maya kültürünün 2 saat sonra otoagregasyon yetenekleri belirlenmiş ve bu değerlerin 44.9 ± 0.06 ile 96.36 ± 0.14 arasında değiştiği görülmüştür. En düşük otoagregasyon değerine 11G-11 *Pichia membranifaciens* süşu ulaşırken, en yüksek otoagregasyon değeri BOZ-2 *Kluyveromyces lactis* süşunda gözlemlenmiştir (Şekil 5.2). Bizim bulgumuza benzer şekilde Guluarte vd. [163] çalışmalarında *Kluyveromyces lactis* maya süşunun %87'den fazla otoagregasyon kabiliyetine sahip olduğunu bulmuşlardır. Farklı maya süşlerinin farklı otoagregasyon yeteneklerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni,

otoagregasyonun farklı hücre yapılarından etkilenmesi veya hücresel agregatlar ve agregatların mikroorganizmaların bağırsaklara tutunmak için yüzeylerini arttırması olabilir [164]. Çalışmamızda bir diğer önemli nokta ise *D. hansenii* ve *Saccharomyces* türlerinin kendi aralarında yaklaşık olarak aynı otoagregasyon değerlerine sahip olmaları ve *S. cerevisiae* suşlarının değerlerinin Speranza vd. [165] yaptıkları çalışmadaki değerlerle benzer olmasıdır.



Şekil 5.2 Ekşi hamur izolasyonundan seçilen maya kültürlerinin oto-agregasyon yüzdelikleri (BOZ-1 *S. pastorianus*, BOZ-2 *K. lactis*, BOZ-5 *D. hansenii*, 11G-6 *P. kluyveri*, 11G-10 *D. hansenii*, 11G-11 *P. membranifaciens*, 06B-30 *S. cerevisiae*, 06B-36 *S. pastorianus*, 16BO-37 *S. bayanus*, 16BO-39 *T. delbruckii*, 45MK-18 *P. membranifaciens*, 45MK-19 *S. cerevisiae*, KCO-60 *K. humilis*, KCO-63 *K. polysporus*)

Maya suşlarının hidrofobiklik testleri, hidrokarbon olarak dietileter ve polar olmayan bir çözücü olan n-hekzadekana karşı test edilmiştir. Hücre yüzeyi hidrofobikliği, sindirim sistemindeki suşların kolonizasyonu için gereklidir ve hidrokarbonların hücrelere bağlanmasının ölçülmesini ifade eder. Ayrıca LAB ve maya suşlarının bağırsak epitel hücrelerine yapışma ve patojenlerin kolonizasyonunu önleme yeteneğini de gösterir [166]. Çalışmamızda maya suşlarının n-heksadekan ve dietileter hidrokarbonlara karşı en yüksek hidrofobiklik değerleri sırasıyla BOZ-1 *S. pastorianus* (%43.7) ve 06B-36 *S. pastorianus* (%44.8) olmuştur (Şekil 5.3).



Şekil 5.3 Ekşi hamur izolasyonundan seçilen maya kültürlerinin hidrofobisite yüzdelikleri

Simoës vd. [164] yaptıkları çalışmada fermente edilmiş Brezilya sofralık zeytinlerden izole ettikleri mayaların probiyotik potansiyelini değerlendirmişlerdir. Çalışmada 18 maya suşunun hidrofobisite değerlerinin %42.5-92.2 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. En yüksek hidrofobisite değerine *D. Hansenii* suşunun ulaştığını kaydetmişlerdir. Ayrıca *D. hansenii* (CCMA 1761) mayası en yüksek hidrofobikliği sergilerken, *S. cerevisiae* (CCMA 1746) mayası otoagregasyon aktivitesi için en yüksek değeri göstermiştir. Otoagregasyon ve hidrofobiklik arasındaki ilişkinin her zaman pozitif olduğu düşünülemez [167]. Çünkü o, hücre duvarındaki β -(1-3)-D-glukanların içeriği gibi diğer etkileşim mekanizmalarını içerir ve hücre duvarındaki bazı proteinler mayaların oto-agregasyon yeteneklerinden sorumlu faktörler olarak kaydedilmiştir [164].

Yapılan bir diğer çalışmada Adesokan vd. [168] Nijerya'daki fermente ürünlerden izole edilen mayaların probiyotik özelliklerini belirlemişlerdir. Çalışmada isolatların ksilen, toluen ve n-heksadekan gibi hidrokarbonlara yapışmasını ölçmüşlerdir. En yüksek hidrofobisite yüzdeliğine %83.45 *Saccharomyces cerevisiae* OBB17 maya suşunun ulaştığı görülmüştür. Ksilene karşı en düşük yapışmanın %35.66 ile *Saccharomyces cerevisiae* AGG23A maya kültürünün olduğunu belirtmişlerdir.

Ayrıca, tüm maya izolatlarının hidrofobik olduğunu göstermişlerdir. Perriocone vd. [169] ayrıca bağlayıcı ajan olarak heksadekan kullanarak sadece 9 izolatın hidrofobik olduğunu bildirmiştir. Hsu ve Chou, [170] çeşitli kaynaklardan izole ettikleri mayaların probiyotik özelliklerine bakmışlardır. Çalışmada 23 suş (%38.3) %25 ile %50 arasında orta derecede bir hidrofobiklik oranı gösterirken, 21 suş (%35) %50'nin üzerinde yüksek bir hidrofobiklik oranı göstermiştir. *K. marxianus* JYC2557 en yüksek hidrofobikliği (79.4 ± 4.9) gösteren maya suşu olurken, *S. cerevisiae* JYC2535 en düşük hidrofobikliğine (6.61 ± 2.68) sahip olduğunu kaydetmişlerdir. Toplamda ise 52 suş (%86,4) *S. boulardii*'ninkinden daha yüksek bir hücre yüzeyi hidrofobikliğine sahip olduğu belirtilmiştir. Hidrofobiklik muhtemelen mikroorganizmaların yüzeyindeki negatif yüklü, pozitif yüklü, hidrofobik ve hidrofilik bileşenler arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklanmaktadır. Çözücülere karşı hidrofobik olmayan varyasyon, yapışmanın suşların kökenine bağlı olduğu kadar yüzey özelliklerine de bağlı olduğu gerçeğiyle açıklanabilir. Burada, maya izolatlarının yüksek hücre yüzeyi hidrofobikliği gösterdiği görülmüştür.

5.3.2 Antibiyotik / Antifungal Dirençleri

Mayaların probiyotik özelliklerini belirlemede bir diğer önemli parametre antibiyotik / antifungal direnç yeteneklerinin belirlenmesidir. Yaygın olarak kullanılan antibiyotikler arasında streptomisin, tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, penisilin ve ampicilin bulunur. Probiyotik mikroorganizmaların çoğu bakteridir ve birçoğu bu antibiyotiklere direnemez veya tolere edemezken, mayalar onlara doğal bir direnç sahiptir ve antibiyotik tedavisi gören hastalarda kullanılabileceği vurgulanmıştır. Direnç genlerinin patojenik bakterilere transferi, probiyotik bakterilerle ilişkili olup, bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle, bakteri ve maya arasında genetik materyal aktarımı olmadığından antibiyotik tedavisi sırasında maya kullanımı güvenli bir alternatif haline gelmektedir [171].

Ekşi hamurdan izole edilen 14 maya suşu antibakteriyel disklerle direnç gösterdiğinden veri verilmemiştir. KCO-60 *Kazachstania humilis* suşu, tüm maya karşıtı disklerle karşı en iyi aktiviteyi göstermiştir. Tüm maya kültürleri içinde en iyi aktivite Nystatin antifungal diskine karşı olmuştur. 45MK-18 *Pichia membranifaciens* suşu, maya karşıtı disklerle karşı en düşük aktiviteyi göstermiştir.

Sc.cerevisiae suşlarının kullandığımız hemen hemen tüm maya karşıtı disklere duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak beklendiği gibi tüm maya izolatları anti-fungal disklerle özellikle Nystatin, Amfoterisin B ve Fluconazole karşı duyarlı olmuştur (Tablo 5.2).

Tablo 5.2 Antibiyotik / antifungal duyarlılığı (Sonuçlar iki paralelin ortalaması olarak mm cinsinden verildi)

Suşlar	KTC	FLU	AMB	CLT	NY
BOZ-1	1.0 ^B	8.5 ^{AB}	3.5 ^{ABC}	2.5 ^B	5.5 ^{BC}
BOZ-2	-	3.5 ^C	3.5 ^{ABC}	-	5.5 ^{BC}
BOZ-5	-	8.5 ^{AB}	4.5 ^{AB}	-	5.5 ^{BC}
11G-6	-	-	1.1 ^C	1.5 ^B	3.5 ^C
11G-10	-	-	2.7 ^{ABC}	-	4.5 ^C
11G-11	-	8.5 ^{AB}	3.1 ^{ABC}	13.0 ^A	5.5 ^{BC}
06B-30	-	9.5 ^{AB}	3.5 ^{ABC}	4.5 ^B	4.5 ^C
06B-36	1.5 ^{AB}	7.5 ^B	5.0 ^A	-	4.5 ^C
16BO-37	-	8.5 ^{AB}	4.5 ^{AB}	1.5 ^B	5.5 ^{BC}
16BO-39	-	9.5 ^{AB}	2.5 ^{ABC}	-	4.5 ^C
45MK-18	-	-	1.1 ^C	-	3.5 ^C
45MK-19	1.0 ^B	11 ^A	2.2 ^{BC}	-	5.5 ^{BC}
KCO-60	3.5 ^A	9.5 ^{AB}	4.5 ^{AB}	2.5 ^B	7.5 ^{AB}
KCO-63	-	3.5 ^C	3.5 ^{ABC}	-	9.5 ^A

AMB: Amphotericin B, CLT: Clotrimazole, FLU: Fluconazole, KTC: Ketoconazole, NY: Nystatin. *S. pastorianus* BOZ-1, *K. lactis* BOZ-2, *D. hansenii* BOZ-5, *P. kluyveri* 11G-6, *D. hansenii* 11G-10, *P. membranifaciens* 11G-11, *S. cerevisiae* 06B-30, *S. pastorianus* 06B-36, *S. bayanus* 16BO-37, *T. delbrückii* 16BO-39, *P. membranifaciens* 45MK-18, *S. cerevisiae* 45MK-19, *K. humilis* KCO-60 ve *K. polysporus* KCO-63. Aynı sütunda farklı harflere sahip ortalamalar, önemli ölçüde farklıdır (p < 0.05).

Göktaş vd. [172] çalışmalarında kefirde izole ettikleri mayaların antifungal direnci için Amphotericin B (AMB, 20 µg), clotrimazole (CLT, 10 µg), fluconazole (FLU, 25 µg), ketoconazole (KTC, 10 µg) ve nystatin (NY, 100 U) disklerini kullanmışlardır. Sadece iki mayanın (KY-1 ve KY-6) antifungal ajan amfoterisin B'ye dirençli olduğu ve diğer mayaların antifungal ajanlara karşı duyarlı olduğu bulmuşlardır. Ayrıca tüm maya izolatlarının en yüksek antifungal direnci amfoterisin B diskine karşı gösterdiğini kaydetmiş olup, sonuçlarımız paralellik göstermiştir.

5.3.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Patojenlerin konağın GIT'ini koruma yeteneği özellikle probiyotik mikroorganizmalar için önem arz etmektedir. Bu nitelikler, patojenlere agregasyonu, bağırsak mukozasına yapışmanın inhibisyonunu ve antimikrobiyal moleküllerin üretimini içerir. Mayaların antimikrobiyal aktivitesi, organik asitler

gibi antagonistik etkiye sahip poliaminler, proteazlar ve miyokinler veya öldürücü toksinler gibi moleküllerin üretimi ile ilişkili olmaktadır. Öldürücü toksinler, bakteriler, diğer mayalar ve filamentli küfler üzerinde etki eden, büyümeyi engellemek veya rakiplerini öldürmek için salgılanan protein kökenli bileşikler olarak adlandırılmaktadır [164].

Merchán vd. [173] geleneksel peynirden izole ettikleri 54 mayanın probiyotik özelliğini belirlemeye çalışmışlardır. Bu maya izolatlarından 16 tanesinin patojen bakterilere karşı aktivite gösterdiği ve hiçbir maya suşunun *L. monocytogenes* CECT 911 patojenine karşı aktivite göstermediği belirtilmiştir. Aynı zamanda peynirden izole edilen *K. marxianus*, *K. lactis*, *C. lusitaniae*, *P. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* ve *Galactomyces spp.* maya izolatlarının *E. coli*, *Salmonella enteritidis* ve *S. aureus* patojenlerine karşı herhangi bir aktivite göstermediği kaydedilmiştir.

Yapılan bir diğer çalışma Younis vd. [174] tarafından yapılmıştır. Süt ve et ürünlerinden izole ettikleri mayaların antimikrobiyal aktivitelerini belirlemişlerdir. Çalışmada maya izolatlarının *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı değişken antimikrobiyal aktivite sergilediği görülmüştür. *S. cerevisiae* suşunun *E.coli* patojenine karşı orta düzeyde, *P. aeruginosa* patojenine karşı ise düşük aktivite sergilediği kaydedilmiştir. Sonuç olarak izole edilmiş mayaların kullanılan bakteri türlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi, uçucu termolabil toksik ekstrakt gibi bazı maya ürünlerinin üretimine atfedilebilir.

Acuña-Fontecilla vd. [175] tarafından yapılan çalışmada ise şaraptan izole ettikleri 103 maya izolatının *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitelerini test etmişler ve sonuç olarak *Pichia*, *Candida* ve *Saccharomyces* mayalarının aktivite sergilediği vurgulanmıştır.

Ekşi hamurdan izole ettiğimiz mayaların antibakteriyel aktiviteleri *E.coli*, *Salmonella*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, *Bacillus cereus* patojenlerine karşı test edilmiştir. Antimikrobiyal peptitler ve organik asit yoluyla antimikrobiyallerin etkileri, probiyotik özellikler için önemli bir rol oynamaktadır [176]. Bakterilerin mayalar tarafından antagonizmi, gıda rekabetine, organik asit üretimine ve yüksek konsantrasyonlarda etanol üretimine, antibakteriyel bileşenlerin veya mikosin gibi antimikrobiyal bileşenlerin salınımına bağlıdır [155]. Çalışmamızdaki tüm mayaların patojen bakterilere karşı inhibisyon sağlamadığı gözlemlenmiştir. 11G-6 *Pichia kluyveri* maya izolatı hariç tüm mayaların sadece *S. aureus* patojenine karşı

antibakteriyel aktivite sağladığı ancak sonuçların mm olarak çok düşük olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle sonuçlar verilmemiştir. Bu sonuçlar Andrade vd. [177] yaptıkları çalışma sonuçlarıyla benzer olmaktadır. Bu veriler, mayaların patojenlere karşı probiyotik etkisinin, patojenik bakterilerin fiziksel olarak ortadan kaldırılmasıyla ilişkili diğer mekanizmalarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

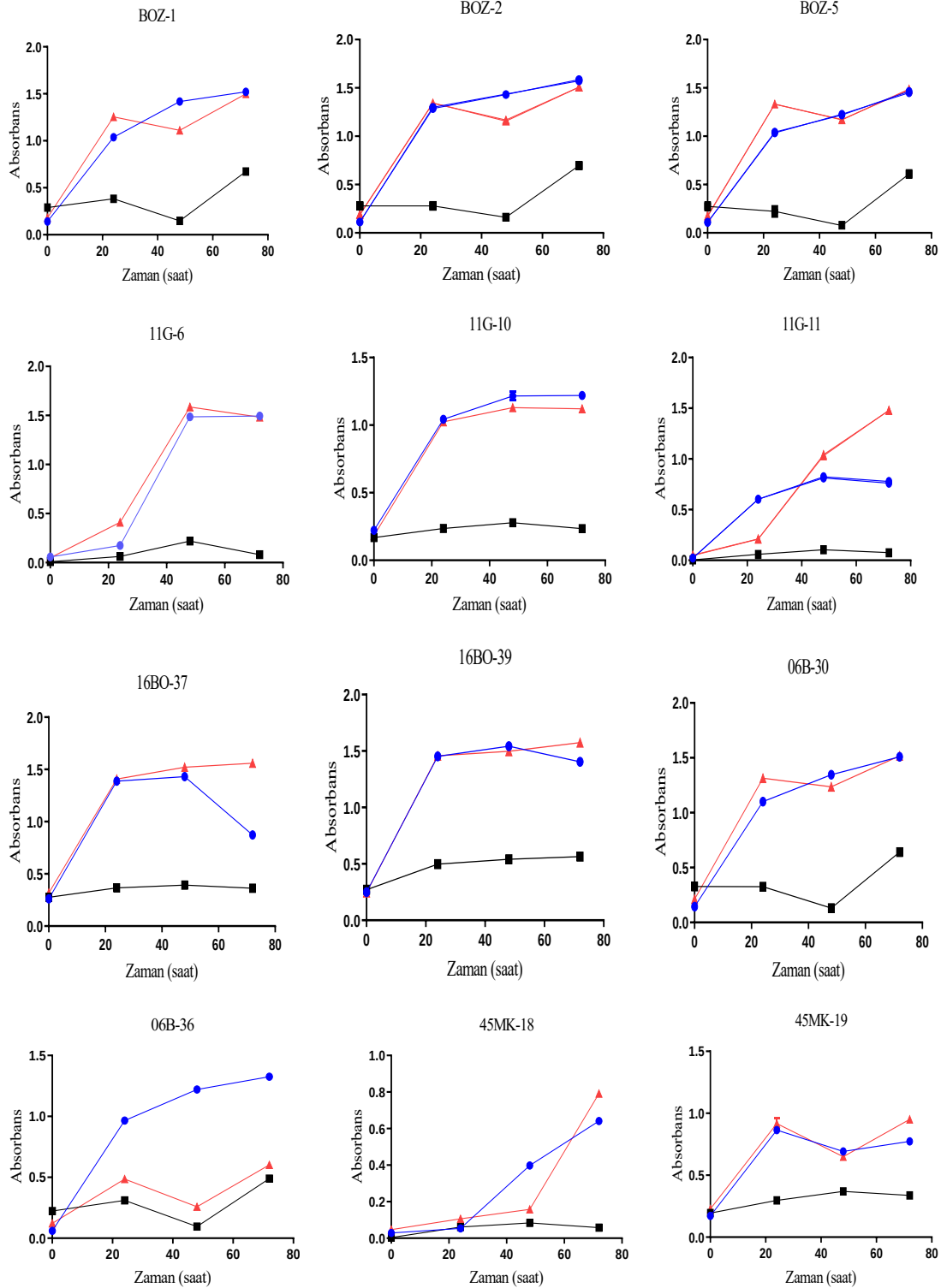
5.3.4 Düşük pH ve Safra Tuzuna Direnç

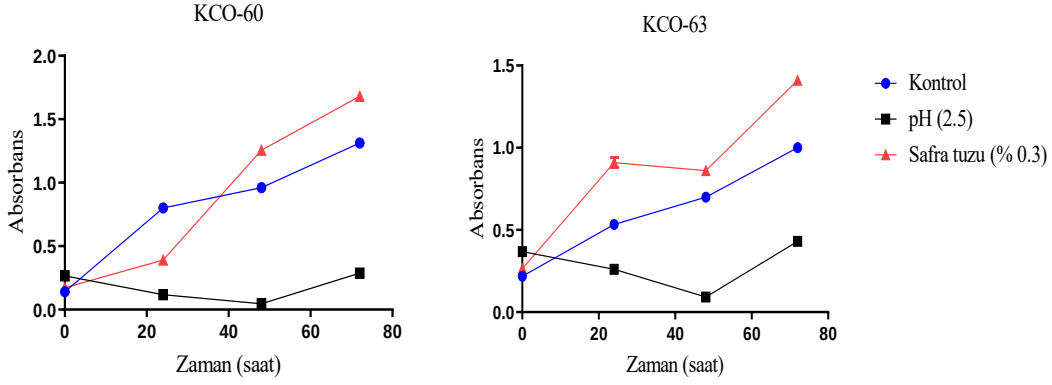
Probiyotikler yaygın olarak ağızdan verildiğinden, GIT'den geçişte hayatta kalma ve kolona ulaşma yeteneğine sahip olmalıdırlar. Probiyotik yetenek ile ilgili olarak, bu, asidik mide suyu, pepsin, safra tuzları, temel pankreas enzimleri ve fizyolojik sıcaklıkta hayatta kalma yeteneğini içerir [164]. Midenin pH'ı 2.5-3.5 arasında değişir. Bu nedenle mide suyunun salgılanması birçok mikroorganizma için ölümcüldür. Çeşitli maya türlerinin asidik koşullarda (pH 1.5) geniş bir pH aralığında hayatta kaldığı bildirilmiştir. Ayrıca insan midesinde bulunan hidroklorik asit (HCl) güçlü bir oksitleyicidir ve bakterileri öldürerek, gıda yoluyla vücuda girebilecek patojenik mikroplardan insan vücudunu korur. Hücrelerdeki yağ asitlerini, proteinleri, kolesterolü ve DNA'yı okside edebilir ve indirgenirken onları bozabilir [170].

Mikroorganizmaların safra direnci, konjuge safranin toksik etkisinin azalmasına katkıda bulunan safra tuzu hidrolaz aktivitesi ile ilişkili olmasıdır [82]. Safra tuzları, mevcut hücreler için tehlikeli olmakta ve hücrenin en dış tabakasının yapısını bozmaktadırlar. Daha önce yapılan çalışmalar, insan bağırsağında standart safra tuzu miktarının %0.30 (w/v) civarında olduğunu göstermiştir [4]. Bu da maya suşlarının safra tuzuna toleransının, bağırsakta canlı kalabilen yeni suşlar için önemli bir varlık olduğu ve bu miktarın safraya toleranslı suşlar için kullanılması gerektiği düşünülmüştür. Safra asitlerine maruz kalındığında, hücresel homeostaz bozulmaları, lipid çift katmanlarının ve hücre zarlarındaki integral proteinlerin ayrışmasına neden olarak, mikrobiyal içeriğin sızmasına ve nihayetinde hücre ölümüne neden olur [168].

Bu çalışmada maya kültürlerinin pH (2.5) ve safra (%0.3) direncine karşı hayatta kalma oranları belirlenmiştir. Tüm maya kültürlerinin pH (2.5)'te 24 saat hayatta kaldığı, ancak 11G-6, 11G-10, 11G-11, 45MK-18 gibi *Pichia* türlerine ait mayaların direncinin düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.4). Buna karşılık, tüm maya

susları ilk 24 saatte safra tuzu direncinde artış (%0.3) göstermiştir. Safra, gıda alımından sonra duodenuma salınan lipid emülsifiye edici bir ajandır ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğundan, probiyotiklerin bağırsak ortamında hayatta kalabilmesi için bir safra toleransı veya dışlama mekanizmasına sahip olması gerekir [97].





Şekil 5.4 0., 24., 48., ve 72. saatlerde ölçülen mayaların düşük pH ve safra direnci. (*S. pastorianus* BOZ-1, *K. lactis* BOZ-2, *D. hansenii* BOZ-5, *P. kluyveri* 11G-6, *D. hansenii* 11G-10, *P. membranifaciens* 11G-11, *S. cerevisiae* 06B-30, *S. pastorianus* 06B-36, *S. bayanus* 16BO-37, *T. delbruckii* 16BO-39, *P. membranifaciens* 45MK-18, *S. cerevisiae* 45MK-19, *K. humilis* KCO-60 ve *K. polysporus* KCO-63)

Zahoor vd. [162] çalışmalarında 104 izolattan 94'nün 30 °C ve 37 °C sıcaklıklarda, 12 izolatın ise 42 °C'de gelişebildiğini belirtmişlerdir. 58 ve 4 izolatın, pH 2.0-2.5, %0.3 (a/h) safra tuzu ve 37 °C'de uyarılmış gastrointestinal koşul altında büyüme yeteneği sergilediğini kaydetmişlerdir. Bir diğer çalışma Tadesse vd. [178] tarafından yapılmıştır. Fermente ürünlerden izole ettikleri mayalardan 10 tanesinin dirençli olduğunu ve 24 h boyunca pH 2, 2.5 ve 3.0'de iyi gelişim gösterdiklerini gözlemlemişlerdir. Sıcaklık olarak ise 25, 37 ve 45 °C seçilmesine rağmen en iyi gelişimin 37 °C olduğu belirtilmiştir. Y66, Y82 ve Y36 izolatları pH 2.5'deki OD değerlerinin 1.45, 1.40 ve 1.09 olduğu kaydedilmiştir. Çalışmamızdaki sonuçlar bununla karşılaştırıldığında OD değerlerinin düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalara bakıldığında mayaların asidik koşulları tolere ettiği fakat bazılarının pH 2.5'te büyümediği belirtilmiştir. Çünkü, midedeki mikroorganizmalar için ana bariyer gastrik asit olmaktadır. Ancak, safra direnci de bir mikroorganizmanın bağırsak yolunda büyümesine izin veren bir probiyotik kültür seçiminde dikkate alınması gereken önemli bir özellik olmaktadır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde aynı türün suşları arasında bile yüksek farklılıklar görülebilmektedir. Bu yüzden probiyotik özellikler diğer yazarların da bildirdiği gibi suşa bağlı olarak değişim göstermesi düşünülebilmektedir [173].

5.3.5 Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi

14 maya kültürünün antifungal aktiviteleri ekmekten izole edilen küfler (*A.niger*, *Penicillium carneum*, *A.oryzae*, *A. brasiliensis*, *Penicillium commune*) kullanılarak belirlenmiştir. Laktik asit bakterileri ve mayaların, mikotoksin üreten küflerin büyümesini engelleme potansiyeline sahip oldukları bilinmektedir. Ayrıca mayalarda gıda bozulmasına neden olan küflere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Maya türlerinin bir diğer özelliği de mikotoksinleri azaltabilen enzimlere sahip olmalarıdır. Bu nedenle, laboratuvar ve mayalar, fermantasyon [179] gibi metabolik süreçlerde gıda kalitesini iyileştirmesi ve antifungal metabolit üretimi ve substrat rekabeti yoluyla küf gelişimini sınırlaması nedeniyle gıda işlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Esas olarak mayaların antifungal aktivitesi, alkol üretimine ve gıda rekabetine dayanır. Ayrıca antifungal güçlerinden CO₂, etanol, reuterin, diasetil, proteinli bileşikler, düşük moleküler ağırlıklı bileşikler veya bunların kombinasyonlarının sorumlu olduğu vurgulanmıştır [180].

Tablo 5.3 Mayaların antifungal aktiviteleri

Maya suşları	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium carneum</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus niger</i>
BOZ-1	+	-	+	+	+
BOZ-2	+	-	+	+	+
BOZ-5	+	-	+	+	+
11G-6	+	-	+	+	+
11G-10	+	-	+	+	+
11G-11	+	-	+	+	+
06B-30	+	-	+	+	+
06B-36	+	-	+	+	+
16BO-37	+	-	+	+	+
16BO-39	+	-	+	+	+
45MK-18	-	-	-	+	+
45MK-19	-	-	+	+	+
KCO-60	+	-	-	-	+
KCO-63	+	-	+	-	-

(*S. pastorianus* BOZ-1, *K. lactis* BOZ-2, *D. hansenii* BOZ-5, *P. kluyveri* 11G-6, *D. hansenii* 11G-10, *P. membranifaciens* 11G-11, *S. cerevisiae* 06B-30, *S. pastorianus* 06B-36, *S. bayanus* 16BO-37, *T. delbruckii* 16BO-39, *P. membranifaciens* 45MK-18, *S. cerevisiae* 45MK-19, *K. humilis* KCO-60 ve *K. polysporus* KCO-63). Sonuçlar pozitif (+) ve negatif (-) olarak verildi.

Bu çalışmada tüm mayaların *Penicillium carneum* küfüne karşı antifungal etki göstermediği gözlemlenmiştir. KCO-60 *Kazachstania humilis* maya kültürü tüm küflere karşı en düşük etkiyi göstermiştir. Maya türlerinin tüm küflere karşı benzer bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 5.3). Benzer sonuçlar Merchán vd.,

[173] çalışmalarında da görülmüştür. Mayaların antifungal aktiviteleri öldürücü toksinlerin veya 'mikosinlerin' üretimi ile ilişkilendirilebilir.

Laktik asit (LA) fermentasyonu, bozulabilen gıdaları korumak ve duyu özelliklerini geliştirmek için yüzyıllardır kullanılmaktadır. LAB'lerin fermentasyon sırasında oluşan metabolik aktivite gıdalarda birtakım değişiklikler meydana getirmektedir. Bu sonucunda peptitler, amino asitler, vitaminler, antioksidanlar ve nörotransmitterler gibi biyoaktif bileşiklerin üretilir. LAB'lerin fermentasyon yoluyla GABA üretmesi sağlık yararlarından faydalanmak için bizlere potansiyel alternatifler sunmaktadır. Bu yüzden son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında kimyasal GABA yerine LAB'lerden GABA elde edilmesi ve fermente ürünlerde kullanılması görülmüştür. Uluslararası literatüre bakıldığında GABA açısından zengin ürünler açısından birçok çalışma mevcut olup, ülkemizde ise bu alanda yapılmış çalışmalar istenen boyuta ne yazık ki ulaşılamamıştır. Bu nedenle sağladığı sağlık ve teknoloji ile ilgili avantajlardan faydalanılamamıştır. Bu sebepten ötürü bu çalışmanın amacı; ekşi hamur örneklerinden izole edilen LAB'lerde yüksek GABA üreticisi suşun izolasyonu ve karakterize edilmesi ardından fonksiyonel nitelikte GABA açısından zengin boza üretimi ve yoğurt üretimi gerçekleştirilmesi olmuştur. Bunun yanı sıra probiyotik aday olma potansiyeline sahip mayalar aranmıştır. Belirlenen hedefler doğrultusunda tez kapsamında elde edilen sonuçların ortaya koyduğu parametreler şu şekilde değerlendirilebilir:

- ✓ Türkiye'nin 6 bölgesinden (Manisa/Kırkağaç, Bozcaada, Kıbrıs/Lefkoşa, Bilecik/Gölpazarı, Ankara/Çubuk, Bursa/Osmangazi) ekşi hamur örnekleri toplanmış, laktik asit ve maya izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Ekşi hamur örneklerindeki maya ve LAB sayılarında bölgeler arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Ekşi hamur örneklerinden toplam 253 bakteri ve 62 maya izolatu elde edilmiştir. Hem fenotipik hem de genotipik olarak tanımlaması yapılmıştır. Fenotipik açıdan basit boyama ve katalaz testi yapılmış olup basil çıkan LAB'lere genotipik açıdan ise RAPD-PCR ve FT-IR tanımlama ile ön eleme yapılmıştır.
- ✓ Ön eliminasyondan sonra LAB'lerde GABA üretiminden sorumlu *gad* gen bölgeleri açığa çıkarılmıştır. Fakat izole edilen her basil'in *gad* gen bölgesi pozitif bulunmamıştır. Pozitif bulunan suşlar ile devam edilmiştir. Literatüre

bakıldığında yüksek GABA üreticisi bulunan suşların *gad* gen bölgelerinin pozitif sonucu ile örtüştüğü belirlenmiştir.

- ✓ GAD gen bölgesine sahip olan LAB suşları HPLC ile analiz edilerek GABA üretim miktarı yüksek olan suşlar belirlenmiştir.
- ✓ Ekşi hamur kaynaklarından izole edilen 2 LAB suşunun yüksek GABA üreticisi olduğu gözlemlenmiş olup, 16s rRNA bölgesi belirlendikten sonra sekansa tanımlanması amacıyla gönderilmiştir. Tanımlanan iki bakterinin KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 ve 45MK-30 *Lb. plantarum* JCM 1149 olduğu belirlenmiştir.
- ✓ KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 suşunun GABA üretimi için fermantasyon koşullarının optimizasyonu Box-Behnken dizayn ile tasarlanmıştır. Fermantasyon süresi (24, 48, 72 saat), pH değerleri (4.5, 5.75 ve 7.0), sıcaklık (30, 35 ve 40 °C), Monosodyum glutamat konsantrasyonu (50, 225, 400 mM) olarak alınmıştır. Maksimum GABA verimine izin veren en iyi proses parametrelerinden **sıcaklığın 30 °C, MSG konsantrasyonunun 130.71, pH'nın 4.74 ve sürenin 72 saat** olması gerektiği görülmüştür.
- ✓ Seçilen iki kültür (KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 ve 45MK-30 *Lb. plantarum* JCM 1149) ile önce yoğurt denemesi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grup olarak sadece yoğurt starterleri ile yapılan yoğurt kullanılmıştır ve üretimi gerçekleştirilen yoğurtlara su tutma kapasitesi, su aktivitesi, sinerezis, pH ve TTA, mikrobiyolojik analiz, viskoelastik özelliklerinin belirlenmesi, HPLC ile yoğurt örneklerinde GABA üretim miktarlarının belirlenmesi ve duyu analizi testlerine tabi tutulmuştur. Seçilen iki LAB suşunun yoğurt fermantasyon koşullarına uygun olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle GABA üretimi açısından yardımcı kültür olarak kullanılması uygun bulunamamıştır. GABA açısından fonksiyonel nitelikte yoğurt üretiminin gerçekleştirilmesi ya yoğurt starterlerinin (*S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*) GABA üretiminin yüksek olması ya da kullanılan yardımcı kültürün yoğurt fermantasyon sıcaklığında aktif olması gerektiği düşünülebilir.
- ✓ GABA üreticisi 45MK-30 *Lb. plantarum* JCM 1149 ve KCO-48 *Lb. brevis* ATCC 14869 suşları ile boza üretimi gerçekleştirilmiştir. Boza üretimi için bu iki suş hem MSG hem de MSG'siz boza üretiminde kullanılmıştır. Kontrol grup olarak MSG içermeyen boza örnekleri alınmıştır. Boza örneklerinde

mikrobiyolojik analiz, pH ve TTA, GABA üretim miktarlarının HPLC ile belirlenmesi, şeker miktarlarının HPLC ile belirlenmesi, viskoelastik özelliklerinin reometre ile belirlenmesi ve duyu analizi gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Boza örneklerinde GABA üretim miktarlarının fermentasyon süresince arttığı gözlemlenmiştir. Boza üretiminde kullanılan fermentasyon sıcaklığının optimizasyon sıcaklığı ile pozitif yönde bir korelasyon sergilediği belirlenmiştir.
- ✓ Boza örneklerindeki bir diğer önemli parametre fermentasyon ve depolama süresince şeker içeriğinde sakkarozun azaldığı, fruktoz ve glukoz miktarlarında artma meydana gelmiş olmasıdır. Bu fermentasyon ve depolama süresinin boza örnekleri üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu göstermiştir.
- ✓ Diğer taraftan ekşi hamurlardan izole ettiğimiz 62 maya izolatının FT-IR tanımlaması yapılmıştır. Verilerimizde FT-IR tanımlamanın %90'nın üzerinde bir doğruluk payına sahip olduğu görülmüştür.
- ✓ Maya izolatlarının FT-IR tanımlaması gerçekleştirilerek 14 suş seçilerek probiyotik potansiyel olma adayı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca FT-IR tanımlamanın doğruluğunun tespiti için seçilen 4 maya kültürünün 26s bölgesi belirlenerek sekans sonucu tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Tanımlama sonucunun FT-IR ile aynı olduğu gözlemlenmiştir. İzole edilen mayalardan FTIR'da tanımlandıktan sonra 26S rDNA sekanslaması sonuçlarına göre baskın türün *S. cerevisiae* belirlenmiştir. Bunun dışında *Kazachstania*, *Pichia*, *Debaryomyces* ve *Torulaspora* vb. suşları da tanımlanmıştır.
- ✓ Bu çalışmada 14 maya kültürünün 2 saat sonra otoagregasyon yetenekleri belirlenmiş ve en düşük otoagregasyon değerine 11G-11 *Pichia membranifaciens* suşu ulaşırken, en yüksek otoagregasyon değeri BOZ-2 *Kluyveromyces lactis* suşunda gözlemlenmiştir.
- ✓ Çalışmamızda maya suşlarının n-heksadekan ve dietileter hidrokarbonlara karşı en yüksek hidrofobiklik değerleri sırasıyla BOZ-1 *S. pastorianus* (%43.7) ve 06B-36 *S. pastorianus* (%44.8) olmuştur.

- ✓ Ekşi hamurdan izole edilen 14 maya suşu antibakteriyel disklerle direnç gösterdiğinden veri verilmemiştir. KCO-60 *Kazachstania humilis* suşu, tüm maya karşıtı disklerle karşı en iyi aktiviteyi göstermiştir. Tüm maya kültürleri içinde en iyi aktivite Nystatin antifungal diskine karşı olmuştur.
- ✓ Ekşi hamurdan izole ettiğimiz mayaların antibakteriyel aktiviteleri *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *L. monocitogenes*, *Bacillus cereus* patojenlerine karşı test edilmiştir. Çalışmamızdaki tüm mayaların patojen bakterilere karşı inhibisyon sağlamadığı gözlemlenmiştir. 11G-6 *Pichia kluyveri* maya izolatu hariç tüm mayaların sadece *S. aureus* patojenine karşı antibakteriyel aktivite sağladığı ancak sonuçların mm olarak çok düşük olduğu gözlenmiştir.
- ✓ 14 maya kültürünün antifungal aktiviteleri ekmekten izole edilen küfler (*A.niger*, *Penicillium carneum*, *A.oryzae*, *A. brasiliensis*, *Penicillium commune*) kullanılarak belirlenmiştir. Tüm mayaların *Penicillium carneum* küfüne karşı antifungal etki göstermediği gözlemlenmiştir. KCO-60 *Kazachstania humilis* maya kültürü tüm küflere karşı en düşük etkiyi göstermiştir
- ✓ Bu çalışmada maya kültürlerinin pH (2.5) ve safra (%0.3) direncine karşı hayatta kalma oranları belirlenmiştir. Tüm maya kültürlerinin pH (2.5)'te 24 saat hayatta kaldığı, ancak BOZ-2 *Kluyveromyces lactis*, BOZ-5 *Debaryomyces hansenii*, KCO-60 *Kazachstania humilis*, KCO-63 *Kluyveromyces polysporus* mayasının direncinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu dört maya 48. saatte azalmaya devam etmiştir. Buna karşılık, tüm maya suşları ilk 24 saatte safra tuzu direncinde artış (% 0.3) göstermiştir.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde ekşi hamur örneklerinden izole edilen yüksek GABA üreticisi LAB'lerin boza üretiminde bu çalışma ile ilk defa kullanılmıştır. Böylelikle fermente bir tahıl bazlı ürün olan bozanın GABA açısından zenginleştirilebileceği ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda tüm parametreler göz önüne alındığında yüksek GABA üreticisi iki suşun boza üretiminde starter kültür olarak kullanılabileceği ve ileride GABA açısından zengin boza olarak piyasaya sürülebileceği ancak klinik çalışmaya ihtiyaç duyulduğu açıktır. Ayrıca piyasadaki boza ürünlerine bakıldığında ürün üretimi ve içerisinde bulunan mikroorganizmaların stabil olmaması boza üretiminde starter kültür kullanılması gerektiği söylenebilir. Bu noktada ülkemizde suşlarımızın hem starter kültür olarak

hem de yüksek GABA üreticisi olması ve bunun teknolojiye uyarlanması ile ticarileşmesi nedeniyle büyük önem taşımaktadır.

- [1] Kohajdová, Z. (2017). Fermented cereal products. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 91-117). Elsevier.
- [2] Kabak, B., & Dobson, A. D. (2011). An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(3), 248-260.
- [3] Ashaolu, T. J. (2020). Safety and quality of bacterially fermented functional foods and beverages: A mini review. *Food Quality and Safety*, 4(3), 123-127.
- [4] Lau, S. W., Chong, A. Q., Chin, N. L., Talib, R. A., & Basha, R. K. (2021). Sourdough Microbiome Comparison and Benefits. *Microorganisms*, 9(7), 1355.
- [5] Yıldız, B., Ceyhan, T., & Çakıcı, A. (2019). Sourdough Yeasts In Bread Making: A Review. *International Journal of Food Engineering Research*, 5(2), 33-46.
- [6] Calvert, M. D., Madden, A. A., Nichols, L. M., Haddad, N. M., Lahne, J., Dunn, R. R., & McKenney, E. A. (2021). A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ*, 9, e11389.
- [7] Oshiro, M., Zendo, T., & Nakayama, J. (2021). Diversity and dynamics of sourdough lactic acid bacteriota created by a slow food fermentation system. *Journal of bioscience and bioengineering*.
- [8] Martín-García, A., Riu-Aumatell, M., & López-Tamames, E. (2021). Influence of Process Parameters on Sourdough Microbiota, Physical Properties and Sensory Profile. *Food Reviews International*, 1-15.
- [9] Reese, A. T., Madden, A. A., Joossens, M., Lacaze, G., & Dunn, R. R. (2020). Influences of ingredients and bakers on the bacteria and fungi in sourdough starters and bread. *Msphere*, 5(1), e00950-19
- [10] Siepmann, F. B., de Almeida, B. S., Waszczynskyj, N., & Spier, M. R. (2019). Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds evolution on type II sourdough and wheat bread. *LWT*, 108, 199-206.
- [11] Minervini, F., Dinardo, F. R., Celano, G., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2018). Lactic acid bacterium population dynamics in artisan sourdoughs over one year of daily propagations is mainly driven by flour microbiota and nutrients. *Frontiers in microbiology*, 9, 1984.
- [12] Pulvirenti, A., Solieri, L., Gullo, M., De Vero, L., & Giudici, P. (2004). Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Letters in Applied Microbiology*, 38(2), 113-117.
- [13] Katsi, P., Kosma, I. S., Michailidou, S., Argiriou, A., Badeka, A. V., & Kontominas, M. G. (2021). Characterization of Artisanal Spontaneous Sourdough Wheat Bread from Central Greece: Evaluation of Physico-Chemical, Microbiological, and Sensory Properties in Relation to Conventional Yeast Leavened Wheat Bread. *Foods*, 10(3), 635.

- [14] Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H., 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*.
- [15] Bigey, F., Segond, D., Friedrich, A., Guezenec, S., Bourgaïs, A., Huyghe, L., ... & Sicard, D. (2021). Evidence for two main domestication trajectories in *Saccharomyces cerevisiae* linked to distinct bread-making processes. *Current Biology*, 31(4), 722-732.
- [16] Landis, E. A., Oliverio, A. M., McKenney, E. A., Nichols, L. M., Kfoury, N., Biango-Daniels, M., ... & Wolfe, B. E. (2021). The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *Elife*, 10, e61644.
- [17] Fernández-Peláez, J., Paesani, C., & Gómez, M. (2020). Sourdough technology as a tool for the development of healthier grain-based products: an update. *Agronomy*, 10(12), 1962.
- [18] Zhao, C. J., Kinner, M., Wismer, W., & Gänzle, M. G. (2015). Effect of glutamate accumulation during sourdough fermentation with *Lactobacillus reuteri* on the taste of bread and sodium-reduced bread. *Cereal Chemistry*, 92(2), 224-230.
- [19] Dongmo Nsongning, S., Kollmannsberger, H., Fischer, S., & Becker, T. (2018). Exploration of high-gravity fermentation to improve lactic acid bacteria performance and consumer's acceptance of malt wort-fermented beverages. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(7), 1753-1759.
- [20] Sakandar, H. A., Hussain, R., Kubow, S., Sadiq, F. A., Huang, W., & Imran, M. (2019). Sourdough bread: A contemporary cereal fermented product. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(3), e13883.
- [21] Jenkins, S. (1975). Baker Technology, Book 1, Bread. *Toronto: Lester & Orpen Ltd.*
- [22] Torrieri, E., Pepe, O., Ventorino, V., Masi, P., & Cavella, S. (2014). Effect of sourdough at different concentrations on quality and shelf life of bread. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 508-516.
- [23] Alkay, Z., Kilmanoğlu, H., & Durak, M. Z. (2020). Prevention of Sourdough Bread Mould Spoilage by antifungal Lactic Acid Bacteria Fermentation. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (18), 379-388.
- [24] Poutanen, K., Flander, L., & Katina, K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food microbiology*, 26(7), 693-699.
- [25] Benedickt, G., Meyer, B. (2003). Die Geschichte der Backmittel, Backmittel Institut, Bonn.
- [26] Cataldo, P. G., Villegas, J. M., de Giori, G. S., Saavedra, L., & Hebert, E. M. (2020). Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus brevis* CRL 2013 based on carbohydrate fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108792.
- [27] Rayavarapu, B., Tallapragada, P., & Usha, M. S. (2021). Optimization and comparison of γ -aminobutyric acid (GABA) production by LAB in soymilk

using RSM and ANN models. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(1), 1-15.

- [28] Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Falah, F., & Vasiee, A. (2020). Gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* A3: Optimization of production, antioxidant potential, cell toxicity, and antimicrobial activity. *Food Science & Nutrition*, 8(10), 5330-5339
- [29] Sarasa, S. B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Thankappan, B., Selta, D. R. F., & Angayarkanni, J. (2020). A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): its production and role in microbes. *Current microbiology*, 77(4), 534-544.
- [30] Grewal, J. (2020). Gamma-Aminobutyric Acid (GABA): A versatile bioactive compound. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 7(7), 3068-3075
- [31] Ramos-Ruiz, R., Poirot, E., & Flores-Mosquera, M. (2018). GABA, a non-protein amino acid ubiquitous in food matrices. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1), 1534323.
- [32] Dhakal, R., Bajpai, V. K., & Baek, K. H. (2012). Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1230-1241.
- [33] Ngo, D. H., & Vo, T. S. (2019). An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid. *Molecules*, 24(15), 2678.
- [34] Lie, Y., Farmer, T. J., & Macquarrie, D. J. (2018). Facile and rapid decarboxylation of glutamic acid to γ -aminobutyric acid via microwave-assisted reaction: Towards valorisation of waste gluten. *Journal of Cleaner Production*, 205, 1102-1113.
- [35] Luo, H., Liu, Z., Xie, F., Bilal, M., Liu, L., Yang, R., & Wang, Z. (2021). Microbial production of gamma-aminobutyric acid: applications, state-of-the-art achievements, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), 491-512.
- [36] Diana, M., Quílez, J., Rafecas, M. (2014). Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *J. Funct. Foods* 10, 407–420.
- [37] Díez-Gutiérrez, L., San Vicente, L., Barron, L. J. R., del Carmen Villaran, M., & Chávarri, M. (2020). Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market. *Journal of Functional Foods*, 64, 103669.
- [38] Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S., & Qu, X. (2020). Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 995.
- [39] Rashmi, D., Zanan, R., John, S., Khandagale, K., & Nadaf, A. (2018). γ -aminobutyric acid (GABA): biosynthesis, role, commercial production, and applications. In *Studies in natural products chemistry* (Vol. 57, pp. 413-452). Elsevier.
- [40] Li, H., & Cao, Y. (2010). Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino acids*, 39(5), 1107-1116.

- [41] Di Cagno, R.; Mazzacane, F.; Rizzello, C.G.; Angelis, M.D.E.; Giuliani, G.; Meloni, M.; Servi, B.D.E.; Marco, G. (2010). Synthesis of γ aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 731–741.
- [42] Kumar, S.; Punekar, N.S.; Satyanarayan, V.; Venkatesh, K.V. (2000). Metabolic fate of glutamate and evaluation of flux through the 4- aminobutyrate (GABA) shunt in *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 575–584
- [43] Yang, S. Y., Lü, F. X., Lu, Z. X., Bie, X. M., Jiao, Y., Sun, L. J., & Yu, B. (2008). Production of γ -aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation. *Amino acids*, 34(3), 473-478.
- [44] Lu, X.; Xie, C.; Gu, Z. (2009). Optimisation of fermentative parameters for GABA enrichment by *Lactococcus lactis*. *Czech. J. Food Sci.* 27(6), 433–442
- [45] Li, H.; Qiu, T.; Huang, G.; Cao, Y. (2010). Production of gammaaminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microb. Cell Fact.* 9, 85.
- [46] Wu, C., Huang, Y., Lai, X., Lai, R., Zhao, W., Zhang, M., & Zhao, W. (2014). Study on quality components and sleep-promoting effect of GABA Maoyecha tea. *Journal of functional foods*, 7, 180-190
- [47] Powers, M. E., Yarrow, J. F., McCoy, S. C., & Borst, S. E. (2008). Growth hormone isoform responses to GABA ingestion at rest and after exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, 40(1), 104.
- [48] Tujioka, K., Ohsumi, M., Horie, K., Kim, M., Hayase, K., & Yokogoshi, H. (2009). Dietary γ -aminobutyric acid affects the brain protein synthesis rate in ovariectomized female rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 55(1), 75-80.
- [49] Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., & Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European journal of clinical nutrition*, 57(3), 490-495
- [50] Kimura, M., Hayakawa, K., & Sansawa, H. (2002). Involvement of γ -aminobutyric acid (GABA) B receptors in the hypotensive effect of systemically administered GABA in spontaneously hypertensive rats. *Japanese journal of pharmacology*, 89(4), 388-394.
- [51] Yoshida, S. I., Haramoto, M., Fukuda, T., Mizuno, H., Tanaka, A., Nishimura, M., & Nishihira, J. (2015). Optimization of a gamma-aminobutyric acid (GABA) enrichment process for Hokkaido white rice and the effects of GABA-enriched white rice on stress relief in humans.
- [52] Xie, Y., Heida, T., Stegenga, J., Zhao, Y., Moser, A., Tronnier, V., ... & Hofmann, U. G. (2014). High-frequency electrical stimulation suppresses cholinergic accumbens interneurons in acute rat brain slices through GABAB receptors. *European journal of neuroscience*, 40(11), 3653-3662.
- [53] İspirli, H. (2016). Tulum peynirinden Laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu, moleküler metotlarla tanımlanması ve ekzopolisakkarit (EPS)

üretim Potansiyelinin genetik olarak belirlenmesi. (Yüksek lisans tezi), Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [54] Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and environmental microbiology*, 73(22), 7283-7290.
- [55] Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A. A., Yilmaz, M. T., & Dertli, E. (2017). Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 361-366.
- [56] Tuberoso, C. I. G., Congiu, F., Serreli, G., & Mameli, S. (2015). Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food chemistry*, 175, 29-35
- [57] Syrokou, M. K., Themeli, C., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Bosnea, L., Argyri, A. A., ... & Drosinos, E. H. (2020). Microbial Ecology of Greek Wheat Sourdoughs, Identified by a Culture-Dependent and a Culture-Independent Approach. *Foods*, 9(11), 1603.
- [58] Fraberger, V., Unger, C., Kummer, C., & Domig, K. J. (2020). Insights into microbial diversity of traditional Austrian sourdough. *LWT*, 127, 109358.
- [59] Arici, M., Ozulku, G., Yildirim, R. M., Sagdic, O., & Durak, M. Z. (2018). Biodiversity and technological properties of yeasts from Turkish sourdough. *Food science and biotechnology*, 27(2), 499-508.
- [60] Petkova, M., Stefanova, P., Gotcheva, V., & Angelov, A. (2021). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria and Yeasts from Typical Bulgarian Sourdoughs. *Microorganisms*, 9(7), 1346.
- [61] De Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 43-56.
- [62] De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H. M., & Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform?. *Food microbiology*, 37, 11-29.
- [63] Small PL, Waterman SR (1998) Acid stress, anaerobiosis and gadCB: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 6:214–216
- [64] Lyu, C.J.; Zhao, W.R.; Peng, C.L.; Hu, S.; Fang, H.; Hua, Y.J.; Yao, S.J.; Huang, J.; Mei, L.H. Exploring the contributions of two glutamate decarboxylase isozymes in *Lactobacillus brevis* to acid resistance and γ -aminobutyric acid production. *Microb. Cell Fact.* 2018, 17, 1–14.
- [65] Wu, Q.; Tun, H.M.; Law, Y.S.; Khafipour, E.; Shah, N.P. Common distribution of gad operon in *Lactobacillus brevis* and its GadA contributes to efficient GABA synthesis toward cytosolic near-neutral pH. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 206.
- [66] Yunes, R.A.; Poluektova, E.U.; Dyachkova, M.S.; Klimina, K.M.; Kovtun, A.S.; Averina, O.V.; Orlova, V.S.; Danilenko, V.N. GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe* 2016, 42, 197–204.

- [67] De Vuyst L., Vancanneyt M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 24,120–127.
- [68] Robert, H., Gabriel, V., & Fontagné-Faucher, C. (2009). Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *International journal of food microbiology*, 135(1), 53-59.
- [69] Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z., & Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in microbiology*, 161(2), 168-175.
- [70] Salem, E. Z., Shahin, I. M., Yaser, F. M., Hamed, M. A., Abdel Hamid, M. F., & Emam, H. (2010). Applicability of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for rapid identification of some yeasts and dermatophytes isolated from superficial fungal infections. *J Egypt Women Dermatol Soc*, 7, 105-110.
- [71] Wang, Y., & Qian, P. Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PloS one*, 4(10), e7401.
- [72] Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., & Dott, W. (2006). FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of microbiological methods*, 64(1), 63-77.
- [73] Goktas, H., Dertli, E., & Sagdic, O. (2021). Comparison of functional characteristics of distinct *Saccharomyces boulardii* strains isolated from commercial food supplements. *LWT*, 136, 110340.
- [74] Wenning, M., Seiler, H., & Scherer, S. (2002). Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 4717-4721.
- [75] Kuhm, A. E., Suter, D., Felleisen, R., & Rau, J. (2009). Identification of *Yersinia enterocolitica* at the species and subspecies levels by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and environmental microbiology*, 75(18), 5809-5813.
- [76] Sandt, C., Sockalingum, G. D., Aubert, D., Lèpan, H., Lepouse, C., Jaussaud, M., ... & Toubas, D. (2003). Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *Journal of clinical microbiology*, 41(3), 954-959.
- [77] Lam, L. M., Dufresne, P. J., Longtin, J., Sedman, J., & Ismail, A. A. (2019). Reagent-free identification of clinical yeasts by use of attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of clinical microbiology*, 57(5), e01739-18.
- [78] Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S., & Qu, X. (2020). Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 995.
- [79] Li, H., Qiu, T., Huang, G., & Cao, Y. (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 1-7.

- [80] Thuy, D. T. B., Nguyen, A. T., Khoo, K. S., Chew, K. W., Cnockaert, M., Vandamme, P., ... & Show, P. L. (2021). Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production by newly identified *Pediococcus pentosaceus* MN12 isolated from 'mam nem', a fermented fish sauce. *Bioengineered*, 12(1), 54-62.
- [81] Wu, Q., Tun, H. M., Law, Y. S., Khafipour, E., & Shah, N. P. (2017). Common distribution of gad operon in *Lactobacillus brevis* and its GadA contributes to efficient GABA synthesis toward cytosolic near-neutral pH. *Frontiers in microbiology*, 8, 206
- [82] Binh, T. T. T., Ju, W. T., Jung, W. J., & Park, R. D. (2014). Optimization of γ -amino butyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology letters*, 36(1), 93-98.
- [83] Villegas, J. M., Brown, L., de Giori, G. S., & Hebert, E. M. (2016). Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 67, 22-26.
- [84] Chunlong, P. E. N. G., HUANG, J., Sheng, H. U., Weirui, Z. H. A. O., Shanjing, Y. A. O., & Lehe, M. E. I. (2013). A two-stage pH and temperature control with substrate feeding strategy for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 21(10), 1190-1194.
- [85] Liu, W.J.; Pang, H.L.; Zhang, H.P.; Cai, Y.M. Biodiversity of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria-Fundamentals and Practice*; Zhang, H.P., Cai, Y.M., Eds.; Springer Publishing: New York, NY, USA, 2014; pp. 103–203.
- [86] Iimure, T., Kihara, M., Hirota, N., Zhou, T., Hayashi, K., & Ito, K. (2009). A method for production of γ -amino butyric acid (GABA) using barley bran supplemented with glutamate. *Food Research International*, 42(3), 319-323.
- [87] Danial, A. M., Peng, K. S., & Long, K. (2015). Enrichment of mung bean with L-DOPA, GABA, essential amino acids via controlled biofermentation strategy. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 4(4), 114-122.
- [88] Arici, M., & Daglioglu, O. (2002). Boza: a lactic acid fermented cereal beverage as a traditional Turkish food. *Food Reviews International*, 18(1), 39-48.
- [89] Petrova, P., & Petrov, K. (2017). Traditional Cereal Beverage Boza Fermentation Technology, Microbial Content and Healthy Effects. In *Fermented Foods* (pp. 284-305). CRC Press.
- [90] Zorba, M., Hancioglu, O., Genc, M., Karapinar, M., & Ova, G. (2003). The use of starter cultures in the fermentation of boza, a traditional Turkish beverage. *Process Biochemistry*, 38(10), 1405-1411.
- [91] Bayat, G., & Yıldız, G. (2019). The special fermented Turkish drink: Boza. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 7(4), 2438-2446.
- [92] Levent, H., & Cavuldak, Ö. A. (2017). Geleneksel fermente bir içecek: Boza. *Akademik Gıda*, 15(3), 300-307.

- [93] von Mollendorff, J. W., Vaz-Velho, M., & Todorov, S. D. (2016). Boza, a traditional cereal-based fermented beverage: a rich source of probiotics and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. In *Functional properties of traditional foods* (pp. 157-188). Springer, Boston, MA.
- [94] Kohajdová, Z. (2017). Fermented cereal products. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 91-117). Elsevier.
- [95] Aila, R., Alim, A., Mahemuti, A., & Kelimu, A. (2020). Separation, Purification and Identification of Excellent Yeasts from the Natural Fermented Beverage of Boza. *Journal of Food and Nutrition Research*, 8(9), 450-458.
- [96] Caputo, L., Quintieri, L., Baruzzi, F., Borcakli, M., & Morea, M. (2012). Molecular and phenotypic characterization of *Pichia fermentans* strains found among Boza yeasts. *Food Research International*, 48(2), 755-762.
- [97] Anand, R.G., Alkadri, M., Lavie, C.J. and Milani, R.V. (2008). The role of fish oil in arrhythmia prevention. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention* 28: 92–98.
- [98] Berktaş, İ., 2012. Bozanın Farklı Hammaddeler Kullanılarak Üretilmesinin Fenolik İçeriğine ve Kalitesine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- [99] Arslan, S., Durak, A. N., Erbas, M., Tanriverdi, E., & Gulcan, U. (2015). Determination of microbiological and chemical properties of probiotic boza and its consumer acceptability. *Journal of the American College of Nutrition*, 34(1), 56-64.
- [100] Arici, M., Ersöz, N. B., Toker, Ö. S., Yilmaz, M. T., Cankurt, H., Durak, M. Z., & Sağdıç, O. (2014). Microbiological, steady, and dynamic rheological characterization of boza samples: temperature sweep tests and applicability of the Cox-Merz rule. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(3), 377-387.
- [101] Öztürk, İ., Karaman, S., Törnük, F., & Sağdıç, O. (2013). Physicochemical and rheological characteristics of alcohol free probiotic boza produced using *Lactobacillus casei* Shirota: estimation of apparent viscosity of boza using non-linear modeling techniques. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(4), 475-487.
- [102] Tornuk, F., Ozturk, I., Karaman, S., Sagdic, O., & Yetim, H. (2014). Rheological and some physicochemical properties of probiotic boza beverage fermented with *Lactobacillus casei* Shirota: Application of principal component analysis for the characterisation. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 6(2), 237-247.
- [103] Borcakli, M., Öztürk, T., & Yeşilada, E. (2018). Cereal source and microbial consortia of the starter culture influence the chemical composition and physicochemical characteristics of boza. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42(6), 412-422.
- [104] Hancıoğlu, Ö., & Karapinar, M. (1997). Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 35(3), 271-274.

- [105] Akpinar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L. and Ozcan, T., 2010. Determination of boza's organic acid composition as it is affected by raw material and fermentation. *International Journal of Food Properties* 13: 648-656.
- [106] Göktepe, Ç. K., & Elgün, A. (2020). The Effect of Exopolysaccharide Producer *Pediococcus Damnosus* 2.6 and Yoghurt Starter Cultures on Ethanol Content, Some Physicochemical and Sensory Properties of Oat Boza. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 34(2), 124-131.
- [107] Rathore S, Salmerón I, Pandiella SS (2012). Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiology*, 30(1): 239-244.
- [107] Arslan-Tontul, S., & Erbas, M. (2020). Co-Culture probiotic fermentation of protein-enriched cereal medium (Boza). *Journal of the American College of Nutrition*, 39(1), 72-81.
- [108] Kook, M.-C., Cho, S.-C. 2013. Production of GABA (gamma amino butyric acid) by lactic acid bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 33(3), 377-389.
- [109] Kittibunchakul, S., Yuthaworawit, N., Whanmek, K., Suttisansanee, U., & Santivarangkna, C. (2021). Health beneficial properties of a novel plant-based probiotic drink produced by fermentation of brown rice milk with GABA-producing *Lactobacillus pentosus* isolated from Thai pickled weed. *Journal of Functional Foods*, 86, 104710.
- [110] Moore, J. F. (2021). Generation of Bioactive Peptides and γ -aminobutyric acid (GABA) During Natural Lactic Acid Fermentation of Cucumber.
- [111] Khanlari, Z., Moayedi, A., Ebrahimi, P., Khomeiri, M., & Sadeghi, A. (2021). Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) content in fermented milk by using *Enterococcus faecium* and *Weissella confusa* isolated from sourdough. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(10), e15869
- [112] Shan, Y., Man, C. X., Han, X., Li, L., Guo, Y., Deng, Y., ... & Jiang, Y. J. (2015). Evaluation of improved γ -aminobutyric acid production in yogurt using *Lactobacillus plantarum* NDC75017. *Journal of dairy science*, 98(4), 2138-2149.
- [113] Jin, Y. H., Hong, J. H., Lee, J. H., Yoon, H., Pawluk, A. M., Yun, S. J., & Mah, J. H. (2021). Lactic Acid Fermented Green Tea with *Levilactobacillus brevis* Capable of Producing γ -Aminobutyric Acid. *Fermentation*, 7(3), 110.
- [114] Wu, Q.; Shah, N.P. High γ -aminobutyric acid production from lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactobacillus brevis* as a functional dairy starter. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017, 57, 3661–3672.
- [115] Genç, M., Zorba, M., & Ova, G. (2002). Determination of rheological properties of boza by using physical and sensory analysis. *Journal of Food Engineering*, 52(1), 95-98.
- [116] Gahruie, H. H., Eskandari, M. H., Mesbahi, G., & Hanifpour, M. A. (2015). Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. *Food Science and Human Wellness*, 4(1), 1-8.

- [117] Aryana, K. J., & Olson, D. W. (2017). A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987-10013.
- [118] Fisberg, M., & Machado, R. (2015). History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition reviews*, 73(suppl_1), 4-7.
- [119] Danone Nutricia Research. Global Yoghurt Consumption Per Capita and Per Year. The NutriJournal Web site. December 30, 2013. <http://nutrijournal.danone.com/en/articles/stories/global-yoghurt-consumption-per-capita-and-per-year>. Accessed October 5, 2014
- [120] Linares, D. M., O'Callaghan, T. F., O'Connor, P. M., Ross, R. P., & Stanton, C. (2016). *Streptococcus thermophilus* APC151 strain is suitable for the manufacture of naturally GABA-enriched bioactive yogurt. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1876.
- [121] Zourari, A. A. J. P., Accolas, J. P., & Desmazeaud, M. J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Le lait*, 72(1), 1-34.
- [122] Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of *lactobacilli* and *bifidobacteria*. Current Issues in Intestinal Microbiology, 8(2), 44.
- [123] Radke-Mitchell, L. Y. N., & Sandine, W. E. (1984). Associative Growth and Differential Enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: A Review. *Journal of food protection*, 47(3), 245-248.
- [124] Mchiouer, K., Bennani, S., & Meziane, M. (2017). Microbial interactions between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in milk. *J. Mater. Environ. Sci*, 8, 1460-1468.
- [125] Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), 1127-1136.
- [126] P. Walstra, P. Walstra, J.T. Wouters, T.J. Geurts, Dairy Science and Technology, CRC Press, 2010
- [127] Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2012). Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 433-440.
- [128] Falah, F., Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaee Yazdi, F., & Mortazavi, S. A. (2021). Optimization of gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology. *Food Science & Nutrition*, 9(6), 3317-3326.
- [129] Isa, J. K., & Razavi, S. H. (2017). Characterization of *Lactobacillus plantarum* as a potential probiotic in vitro and use of a dairy product (yogurt) as food carrier. *Applied Food Biotechnology*, 4(1), 11-18.
- [130] Zhang, S. S., Xu, Z. S., Qin, L. H., & Kong, J. (2020). Low-sugar yogurt making by the co-cultivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 with yogurt starter cultures. *Journal of dairy science*, 103(4), 3045-3054.
- [131] Soni, R., Jain, N. K., Shah, V., Soni, J., Suthar, D., & Gohel, P. (2020). Development of probiotic yogurt: effect of strain combination on nutritional, rheological, organoleptic and probiotic properties. *Journal of Food Science and Technology*, 1-13.

- [132] Esfandiari, H., & Moslehishad, M. (2019). Evaluation of physicochemical, sensory and rheological properties of stirred yogurt fortified with rice bran and lettuce extract during shelf-life. *Food Science and Technology*, 16(90), 245-258
- [133] Mirlohi, M., Soleimanian-Zad, S., Dokhani, S., & Sheikh-Zeinodin, M. (2014). Microbial and physiochemical changes in yoghurts containing different *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in association with *Lactobacillus plantarum* as an adjunct culture. *International Journal of Dairy Technology*, 67(2), 246-254.
- [134] Maleki, M., Ariaii, P., & Sharifi Soltani, M. (2021). Fortifying of probiotic yogurt with free and microencapsulated extract of *Tragopogon Collinus* and its effect on the viability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Science & Nutrition*.
- [135] Dan, T., Chen, H., Li, T., Tian, J., Ren, W., Zhang, H., & Sun, T. (2019). Influence of *Lactobacillus plantarum* P-8 on fermented milk flavor and storage stability. *Frontiers in microbiology*, 9, 3133.
- [136] Chen, Y., Feng, R., Yang, X., Dai, J., Huang, M., Ji, X., ... & Sun, C. (2019). Yogurt improves insulin resistance and liver fat in obese women with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*, 109(6), 1611-1619.
- [137] Troller, J. A. (1986). Water relations of foodborne bacterial pathogens-an updated review. *Journal of Food Protection*, 49(8), 656-670.
- [138] Genigeorgis, C. A. (1981). Factors affecting the probability of growth of pathogenic microorganisms in foods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 179, 1410-1417.
- [139] Keskin, M., Setlek, P., & Demir, S. (2017, November). Use of color measurement systems in food science and agriculture. In *International Advanced Researches & Engineering Congress* (pp. 16-18).
- [140] Ozcan, T. (2013). Determination of yogurt quality by using rheological and textural parameters. In *2013 2nd international conference on nutrition and food Sciences-ICNFS* (pp. 27-28).
- [141] Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), 1127-1136.
- [142] Song, M. W., Park, J. Y., Lee, H. S., Kim, K. T., & Paik, H. D. (2021). Co-Fermentation by *Lactobacillus brevis* B7 Improves the Antioxidant and Immunomodulatory Activities of Hydroponic Ginseng-Fortified Yogurt. *Antioxidants*, 10(9), 1447.
- [143] Agarbati, A., Canonico, L., Marini, E., Zannini, E., Ciani, M., & Comitini, F. (2020). Potential probiotic yeasts sourced from natural environmental and spontaneous processed foods. *Foods*, 9(3), 287.
- [144] de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*, 36(8), 2060-2076.

- [145] Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- [146] Giraffa, G. (2012). Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 391-398.
- [147] Sarkar, S. (2019). Potentiality of probiotic yoghurt as a functional food—a review. *Nutrition & Food Science*.
- [148] Moslehi-Jenabian, S., Lindegaard, L., & Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2(4), 449-473.
- [149] Lara-Hidalgo, C. E., Hernández-Sánchez, H., Hernández-Rodríguez, C., & Dorantes-Álvarez, L. (2017). Yeasts in fermented foods and their probiotic potential. *Austin J. Nutr. Metab*, 4(1), 1045.
- [150] Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 26-35.
- [151] Foligné B, Dewulf J, Breton J, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Pot B. 2010. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: immunomodulation by *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* 140: 136–145
- [152] Chen, L. S., Ma, Y., Maubois, J. L., He, S. H., Chen, L. J., & Li, H. M. (2010). Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy science & technology*, 90(5), 537-548.
- [153] Fernández-Pacheco, P., Ramos Monge, I. M., Fernández-González, M., Poveda Colado, J. M., & Arévalo-Villena, M. (2021). Safety Evaluation of Yeasts With Probiotic Potential. *Frontiers in Nutrition*, 8, 239.
- [154] Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions—a review. *International journal of medical microbiology*, 300(1), 57-62.
- [155] Rima, H., Steve, L., & Ismail, F. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*, 3, 421.
- [156] Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z., & Yari Khosroushahi, A. (2017). Cellular and molecular effects of yeast probiotics on cancer. *Critical reviews in microbiology*, 43(1), 96-115.
- [157] Gut, A.M., Vasiljevic, T., Yeager, T., and Donkor, O.N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58: 56–66.
- [158] İspirli, H., Demirbaş, F., & Dertli, E. (2015). Characterization of functional properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from human gut. *Canadian journal of microbiology*, 61(11), 861-870.
- [159] Kathade, S., Aswani, M., & Nirichan, B. (2020). Probiotic characterization and cholesterol assimilation ability of *Pichia kudriavzevii* isolated from the gut of

the edible freshwater snail “Pila globosa”. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(7-Special issue), 23-39.

- [160] Adesokan, I. A., Sanni, A. I., & Kanwar, S. S. (2021). In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Indigenous Yeasts Isolated from Nigerian Fermented Food Products. *Asian Food Science Journal*, 75-85.
- [161] Hsu, S. A., & Chou, J. Y. (2021). Yeasts In Fermented Food And Kefir: In Vitro Characterization Of Probiotic Traits. *Journal Of Animal And Plant Sciences-Japs*, 31(2), 567-582.
- [162] Zahoor, F., Sooklim, C., Songdech, P., Duangpakdee, O., & Soontorngun, N. (2021). Selection of Potential Yeast Probiotics and a Cell Factory for Xylitol or Acid Production from Honeybee Samples. *Metabolites*, 11(5), 312.
- [163] Guluarte, C., Reyes-Becerril, M., Gonzalez-Silvera, D., Cuesta, A., Angulo, C., & Esteban, M. Á. (2019). Probiotic properties and fatty acid composition of the yeast *Kluyveromyces lactis* M3. In vivo immunomodulatory activities in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & shellfish immunology*, 94, 389-397.
- [164] Simões, L. A., Cristina de Souza, A., Ferreira, I., Melo, D. S., Lopes, L. A. A., Magnani, M., ... & Dias, D. R. (2021). Probiotic properties of yeasts isolated from Brazilian fermented table olives. *Journal of Applied Microbiology*.
- [165] Speranza, B., Campaniello, D., Altieri, C., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., & Corbo, M. R. (2020). Ultrasonic Modulation of the Technological and Functional Properties of Yeast Strains. *Microorganisms*, 8(9), 1399.
- [166] Fekri, A., Torbati, M., Khosrowshahi, A. Y., Shamloo, H. B., & Azadmard-Damirchi, S. (2020). Functional effects of phytate-degrading, probiotic lactic acid bacteria and yeast strains isolated from Iranian traditional sourdough on the technological and nutritional properties of whole wheat bread. *Food chemistry*, 306, 125620.
- [167] Merchan, A.V., Benito, M.J., Galvan, A.I. and de Herrera, ´ S.R.M.S. (2020) Identification and selection of yeast with functional properties for future application in soft paste cheese. *LWT-Food Sci Technol* 124, 109–173. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109173>
- [168] Adesokan, I. A., Sanni, A. I., & Kanwar, S. S. (2021). In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Indigenous Yeasts Isolated from Nigerian Fermented Food Products. *Asian Food Science Journal*, 75-85.
- [169] Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 26-35.
- [170] Hsu, S. A., & Chou, J. Y. (2021). Yeasts In Fermented Food And Kefir: In Vitro Characterization Of Probiotic Traits. *JOURNAL OF ANIMAL AND PLANT SCIENCES-JAPS*, 31(2), 567-582.
- [171] Amorim, J. C., Piccoli, R. H., & Duarte, W. F. (2018). Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Research International*, 107, 518-527.

- [172] Goktas, H., Dikmen, H., Demirbas, F., Sagdic, O., & Dertli, E. (2021). Characterisation of probiotic properties of yeast strains isolated from kefir samples. *International Journal of Dairy Technology*
- [173] Merchán, A. V., Benito, M. J., Galván, A. I., & de Herrera, S. R. M. S. (2020). Identification and selection of yeast with functional properties for future application in soft paste cheese. *LWT*, 124, 109173.
- [174] Younis, G., Awad, A., Dawod, R. E., & Yousef, N. E. (2017). Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. *Veterinary world*, 10(8), 979.
- [175] Acuña-Fontecilla, A., Silva-Moreno, E., Ganga, M. A., & Godoy, L. (2017). Evaluation of antimicrobial activity from native wine yeast against food industry pathogenic microorganisms. *CyTA-Journal of Food*, 15(3), 457-465.
- [176] Offei, B., Vandecruys, P., De Graeve, S., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2019). Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Genome research*, 29(9), 1478-1494.
- [177] Ogunremi, O.; Sanni, A.; Agrawal, R.J.J.O.A.M. Probiotic Potentials Of Yeasts Isolated From Some Cereal-Based Nigerian Traditional Fermented Food Products. *J. Appl. Microbiol.* 2015, 119, 797–808.
- [178] Tadesse, T., Yimer, D., Tibebu, T., Workie, M., Kebede, B., Abera, S., ... & Abena, T. (2021). Evaluating the probiotic potential of Yeasts isolated from Ethiopian traditionally fermented foods and dairy products.
- [179] Damayanti, E., Shabrina, N., Prihantoro, F. A., & Shovitri, M. (2021). Antifungal activities of lactic acid bacteria and yeast isolated from various types of Tempe. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1011, No. 1, p. 012021). IOP Publishing.
- [180] Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., ... & Dolci, P. (2019). Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*, 115, 519-525
- [181] Pan, L. H., Liu, F., Luo, S. Z., & Luo, J. P. (2019). Pomegranate juice powder as sugar replacer enhanced quality and function of set yogurts: Structure, rheological property, antioxidant activity and in vitro bioaccessibility. *LWT*, 115, 108479.

SEKANSLANAN LAB'LERİN 16S rDNA GEN DİZİLİMLERİ

06B-2 *Companilactobacillus paralimentarius* strain DSM 13238

CTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGATCGCAAGATTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA
AGCAACCCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGGCATAACCATGAAAAGCTTATAGATACTCTT
TCCGTTCTGGGGACATTGATTTCAGGTGCGCTATGTCTAGTGAGTTTGGGCTCTAATAAAA
GAACGTGTGCCCCGCAATCAACCAAACCTGCAGGCCGTTCTGACTGAGATATATGAAGG
GAACCC

06B-18 *Staphylococcus caprae* DSM 20608

GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCG
GGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTC
TAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
CCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAA

16B0-14 *Staphylococcus epidermidis*

TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAA
GGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTC
GGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACT
CTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCGAAACC
GCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGA
CTATATGAAGCTGGAATCGC

45MK-30 *Lactiplantibacillus plantarum* strain JCM 1149

TGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAA
GGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCG
GGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCT
GGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGC
GAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCT
ACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG

45MK-32 *Lactiplantibacillus plantarum* strain JCM 1149

TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTAC
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCT
TCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACT
CTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTC
GCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGC
CTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT

45MK-46 *Pediococcus acidilactici* DSM 20284

GCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA
AAAGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACG
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCCTT
CGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACT
CTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAAACC
GCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTCCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGC
CTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC

KCO-35 *Bacillus haynesii* NRRL B-41327

GCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTT
CGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACT
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAG

KCO-48 *Levilactobacillus brevis* ATCC 14869

GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACG
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTT
CGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACT
CTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTTGCGAAGTC
GTGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGC
CTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACA

SEKANSLANAN MAYALARIN 26S rDNA GEN DİZİMLERİ

06B-35 *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632

GCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTCCCTTGG
AACAGGACGTCATAAAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAA
GTGCCTTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTTAGTGGGTGGTAAATTCCAT
CTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGA
AAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATT
TGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTT
ACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAAT

06B-39 *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632

TGGTACCTTCGGTGCCCCAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGT
CTATGTTCCCTTGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGC
GGTTCTTTGTAAAGTGCCCTTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTTAGTGGG
TGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGT
GATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGA
AAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGG
GAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATC

16BO-44 *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632

GTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCT
ATGTTCCCTTGAACAGGACGTCATAAAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGG
TTCTTTGTAAAGTGCCCTTCCAAAAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTTAGTGGGTG
GTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGA
TGGAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAA
GGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGG

16BO-47 *Pichia membranifaciens* NRRL Y-2026

AGTGTAGGCGGGAGTCTTTGTGGAGCACGGTGTCCAAGTCCCTTGAACAGGGCGCCTG
AAAGGGTGAGAGCCCCGTGGGGTGCCGTGCGAAGCTCTGAGGCCCTGCTGACGAGTCGA

GTTGTTTGGGAATGCAGCTCCCAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGC
GAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAG
AGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCCCCGACATGGGGAGT
GCGCACCGCTGTCTCTTGTAGGCGGCGCTCTGGGCGCTCTCTGGGCCAGCATCGGTTCT
TGCTGCGGGAGAATGGGTGCCGGAAGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCGG

KCO-60 *Kazachstania humilis* NRRL Y-17074

TCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGGCGACTTTGGGGCGGCTCCTT
GTCTATGTTTCCTTGGAACAGGACGTCATAAAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGT
GCGGTTCCGTGTAAAGCGCTCTCGAAAAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTTAGTG
GGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACA
GTGATGGAAAGATGAAAAGAAGTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTG
AAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCCGCTCCTTGTGGGTGGG
GGAATCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGCCGGACAAAAGTGCAGG

KCO-62 *Kazachstania humilis* NRRL Y-17074

CCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGGCGACTTTGGGGCGGCTCCTTGTCTATG
TTCCTTGGAACAGGACGTCATAAAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCC
GTGTAAAGCGCTCTCGAAAAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTTAGTGGGTGGTA
AATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG
AAAGATGAAAAGAAGTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGG
AAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCCGCTCCTTGTGGGTGGGGGACTC
TCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGCCGGACAAAAGTGCAGGAACGTAGC
TTGCT

KCO-64 *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632

CGGTGCCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCC
TTGGAACAGGACGTCATAAAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTG
TAAAGTGCCTTCCAAGAGTCCAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTTAGTGGGTGGTAAAT
TCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAA
GATGAAAAGAAGTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG
GGCATTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCG
CATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAAT

11G-4 *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632

TTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATA
AAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCCAAGAG
TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTTAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATA
TTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAA
AAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGG
TGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCAT
CAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAA

11G-11 *Pichia membranifaciens* NRRL Y-2026

TGTAGGCGGGAGTCTTTGTGGAGCACGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCTGAA
AGGGTGAGAGCCCCGTGGGGTGCCGTGCGAAGCTCTGAGGCCCTGCTGACGAGTCGAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCCCAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGA
GAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAG
TGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCCCCGACATGGGGAGTGC
GCACCGCTGTCTCTTGTAGGCGGCGCTCTGGGCGCTCTCTGGGCCAGCATCGGTTCTTG
CTGCGGGAGAATGGGTGCCGGAAGTGGCTCTTCGGAGTGTTATA

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. **Alkay, Z.**, Dertli, E., & Durak, M.Z. A bioactive compound: relationship between gamma aminobutyric acid (gaba) and monosodium glutamate. III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 1-3 September 2021.

Makale

1. **Alkay, Z.**, Dertli, E., & Durak, M. Z. (2021). Investigation of probiotic potential of yeasts isolated from sourdoughs from different regions of Turkey. *Acta Alimentaria*, 50(4), 610-619.