

***Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*'nin SOYA BAZLI
FERMENTE GIDA ÜRETİMİNDE KULLANIMININ
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE USE OF
Saccharomyces cerevisiae var. *boulardii*
IN SOY-BASED FERMENTED FOOD PRODUCTION**

BEYZA SAYMAN

PROF. DR. REMZİYE YILMAZ
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024

ÖZET

***Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*'nin SOYA BAZLI FERMENTE GIDA ÜRETİMİNDE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Beyza SAYMAN

**Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Remziye YILMAZ**

Ocak 2024, 165 sayfa

Son yıllarda tüketicinin sağlıklı beslenme bilincinin artmasıyla birlikte, yeni ve çevreci alternatif olarak görülen bitki bazlı gıdalara yönelik talebin de arttığı görülmektedir. Bu talebi karşılamak için fermantasyon prosesinden sonra postbiyotik özellikler kazandırılmış bitki bazlı gıdaların geliştirilmesinin önü açılmıştır. Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)'nin bir varyetesi olan *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*S. boulardii*) kullanılarak soya unu bazlı fermente kraker ve kurabiye ürünleri geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmanın ilk aşamasında, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda yer alan ve soya unu bazlı hamur fermantasyonunda kullanılması planlanan mikroorganizmaların belirlenmesi için bazı biyokimyasal testler ve Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-qPCR) tekniği ile Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM/High Resolution Melting) analizi uygulanmıştır. Ardından fermantasyonda kullanılacak *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* suşları belirlenmiştir. Referans mikroorganizmaların (*S. cerevisiae* ATCC 9763, ATCC 6328 ve *S. boulardii* CNCM-I 745) yanı sıra Kültür Koleksiyonunda bulunan HUF16M3H11104 kodlu suş, *S. boulardii* olarak tanımlanmış ve bu suşları içeren soya unu bazlı hamur

örnekleri fermantasyona tabi tutulmuştur. Hem kraker ve hem de kurabiye üretimi için kullanılan hamurların 48 saatlik fermantasyonu boyunca maya sayısı ve pH değerleri takip edilmiştir. Formülasyonu yapılan son ürünler olarak kraker ve kurabiye örnekleri üretilmiştir.

Bu ürünlerin kimyasal özelliklerini belirlemek ve örnekler arasındaki değişimi araştırmak amacıyla son ürünlere nem, kuru madde, kül, protein ekstraksiyonu ve Bradford tayini analizleri ile yağ asidi kompozisyonunun ve birincil metabolitlerin belirlenmesinin ardından antioksidan aktivite ve toplam fenolik içeriğin belirlenmesi için analizler uygulanmıştır. Ayrıca elde edilen ürünlerin sahip olabileceği duyuşal özelliklerin belirlenebilmesi için renk ve tekstür analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın temel amacı, *S. boulardii*'nin soya bazlı fermente gıda üretiminde kullanılabilirliğini araştırmaktır. Çalışmanın sonuçlarına göre *S. boulardii* kullanılarak fermente edilen soya unu bazlı, protein içeriği yüksek, yağ asit profili zengin ve birincil metabolit içeriği ile antioksidan aktivite değerleri beslenme özelliklerini iyileştirme potansiyeline sahip postbiyotik, alternatif ürünler elde edilmiştir. Çalışmanın bitki bazlı gıda endüstrisinde yeni ürünlerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, postbiyotik, soya, protein, fermantasyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE USE OF *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* IN SOY-BASED FERMENTED FOOD PRODUCTION

Beyza SAYMAN

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

January 2024, 165 pages

With the increase in consumer awareness of healthy nutrition in recent years, the demand for plant-based foods, seen as new and environmentally friendly alternatives, has also increased. To meet this demand, the progress of creating plant-based meals with postbiotic characteristics using the fermentation procedure has paved the way. The objective of this study is to develop fermented cracker and cookie products utilizing soy flour and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*S. boulardii*), a specific variety of *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).

For this purpose, the initial phase of the investigation involved conducting biochemical tests and utilizing high-resolution melting (HRM) analysis with the Simultaneous Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) technique applied to identify the microorganisms in the FoodOmics Laboratory Culture Collection of Hacettepe University Department of Food Engineering and planned to be used in soy flour-based dough fermentation. Subsequently, the strains of *S. cerevisiae* and *S. boulardii* were determined to be used in the fermentation process. Aside from the reference microorganisms (*S. cerevisiae* ATCC 9763, ATCC 6328, and *S. boulardii* CNCM-I 745), the strain HUF16M3H11104 from the Culture Collection was identified as *S. boulardii* and dough samples made with soy flour and containing these strains were then subjected

to fermentation. The dough's yeast counts, and pH values were continuously monitored throughout the 48-hour fermentation process for producing crackers and cookies. Cracker and cookie samples were created as final goods according to the formulated end products.

To ascertain the chemical properties of the products and examine the differences among samples, the final products were analyzed for moisture, dry matter, ash, protein extraction, Bradford determination, determination of fatty acid composition and primary metabolites, antioxidant activity, and total phenolic content. Furthermore, the sensory characteristics of the products obtained were determined using color and texture examinations.

The main objective of this study is to investigate the feasibility of using *S. boulardii* in soy-based fermented food production. The study's findings indicate that *S. boulardii* was used to ferment postbiotic, soy flour-based alternative products with high protein content, a rich fatty acid profile, a primary metabolite content, and antioxidant activity levels that may have improved nutritional qualities. The study is expected to enhance the advancement of novel goods in the plant-based food industry.

Keywords: *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, postbiotic, soy, protein, fermentation

TEŞEKKÜR

Hem yüksek lisans hem de lisans hayatım boyunca bana karşı emeklerini esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Remziye YILMAZ'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında tecrübeleri ve manevi olarak sağladıkları destekler dolayısıyla Uz. Meltem YILDIRIM ve Uz. Yelda ZENCİR'e, Humen CEBBARI başta olmak üzere tüm BMLab çalışanlarına ve HUNİTEK çalışanlarına,

FYL_2022_20138 kodlu yüksek lisans tez projesi kapsamında çalışmalarımıza destek veren Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

FoodOmics Laboratuvarı çalışanları değerli arkadaşlarım Bilge YILMAZ, İpek Ceren YEŞİLDAĞ, Elif Bircan MUYANLI, Begüm Zeynep HANÇERLİOĞULLARI ve Muhammad Usman AKRAM'a,

Eğitim hayatım boyunca verdikleri sevgi ve gösterdikleri fedakarlıklar için sevgili aile bireylerim Şükrü ve Gülten SAYMAN, Esra YILDIRIM, Elif ve Erdem ÜNAL'a,

Manevi yönden ikinci ailem olarak gördüğüm ve her anlamda bana destek veren ŞİMŞEK ailesine,

Her zaman yanımda olan, bana inanan ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım İrem ŞİMŞEK, Beyza NURHAN, Berkay ERTEKİN ve Buğrahan ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Beyza SAYMAN

Ocak 2024, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.1.1. Metabolitleri ve Yağ Asidi Profili.....	6
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	8
2.2.1. Metabolitleri ve Yağ Asidi profili.....	13
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> Arasındaki Farklılıklar.....	15
2.4. Soya ve Soya Ürünleri.....	18
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	23
3.1. Mikroorganizmalar, Canlandırma ve Stok Eldesi	23
3.2. Mikroorganizmalara Uygulanan Biyokimyasal Testler	26
3.2.1. Belirlenen Sıcaklıklarda Gelişim	26
3.2.2. Glukoz ve Galaktoz Kullanımı.....	26
3.2.3. Farklı pH’da Gelişim.....	28
3.3. <i>AAD15</i> genine spesifik qPCR-HRM Analizi	29
3.4. Soya Unu Bazlı Hamur Fermantasyonu ve Ürünlerin Elde Edilmesi	33
3.4.1. Formülasyon ve Son Ürün Eldesi.....	34
3.4.2. Fermantasyon Süreci ve Fermantasyon Takibi	37
3.5. Kimyasal Analizler.....	38
3.5.1. Nem ve Kuru Madde Analizi	41
3.5.2. Kül Analizi	42

3.5.3. Protein Analizi	42
3.5.4. Yağ Asidi Kompozisyonu Tayini	44
3.5.5. Son Üründe Birincil Metabolitlerin Belirlenmesi.....	45
3.5.6. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi	46
3.5.7. Toplam Fenolik İçeriğin Belirlenmesi.....	47
3.6. Son Üründe Duyusal Özelliklerin Belirlenmesi	49
3.6.1. Renk Analizi	49
3.6.2. Tekstür Analizi	49
3.7. İstatistiksel Analiz	50
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	51
4.1. Mikroorganizmalar, Canlandırma ve Stok Eldesi.....	52
4.2. Biyokimyasal Testler	53
4.2.1. Belirlenen Sıcaklıklarda Gelişim	53
4.2.2. Glukoz ve Galaktoz Kullanımı	54
4.2.3. Farklı pH'da Gelişim.....	56
4.3. <i>AAD15</i> genine spesifik qPCR-HRM Analizi.....	60
4.4. Ürün Geliştirme	65
4.4.1. Fermantasyon Takibi ve Son Ürün Eldesi	65
4.5. Kimyasal Analizler	70
4.5.1. Nem Kuru Madde ve Kül.....	70
4.5.2. Protein Analizi	71
4.5.3. Yağ Asidi Kompozisyonu Tayini	73
4.5.4. Son Üründe Birincil Metabolitlerin Belirlenmesi.....	83
4.5.5. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi	98
4.5.6. Toplam Fenolik İçeriğin Belirlenmesi.....	100
4.6. Son Üründe Duyusal Özelliklerin Belirlenmesi	103
4.6.1. Renk Analizi	103
4.6.2. Tekstür Analizi	105
4.7. Isı Haritası ve Temel Bileşen Analizi	108
5. YORUM	113
6. KAYNAKLAR	116
EKLER	135

EK 1.1 – Çalışmada Kullanılan Suşların Gelişim Özellikleri ve Morfolojileri	135
EK 1.2 – Belirlenen Sıcaklıklarda Gelişim Testi Sonuçları.....	137
EK 1.3 – Glukoz ve Galaktoz Testi Sonuçları	139
EK 1.4 – pH 6,3'te Gelişim Testi Sonuçları	141
Ek 1.5 – pH 1,5'te Gelişim Testi Sonuçları	144
Ek 1.6 – pH 2,0'da Gelişim Testi Sonuçları	147
Ek 1.7 – pH 2,5'te Gelişim Testi Sonuçları	150
Ek 1.8 – pH 3,0'te Gelişim Testi Sonuçları	153
EK 1.9 – Kraker ve Kurabiye Örneklerine Ait Fermantasyon Takibi Sonuçları	156
EK 1.10 – Kraker ve Kurabiye Örneklerine Ait Renk Analizi Sonuçları	157
EK 1.11 – Kraker ve Kurabiye Örnekleri için Tekstür Analiz Grafikleri.....	159
EK 2 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	161
EK 3 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	164
ÖZGEÇMİŞ	165

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'ya ait ana hücre ve tomucuk hücresinden oluşan temsili morfoloji.....	5
Şekil 2.2. <i>S. boulardii</i> 'ye ait bazı metabolitlerin elde edilmesinde kullanılan ana yollar.....	15
Şekil 2.3. Soya içeriğinde bulunan izoflavonlar.....	19
Şekil 3.1. Glukoz ve galaktoz kullanımı testi muhtemel sonuçları.....	27
Şekil 3.2. DNA izolasyonu sırasında uygulanan lizis aşamasına ait akış şeması.....	30
Şekil 3.3. DNA izolasyonu aşamasına ait akış şeması.....	31
Şekil 3.4. <i>AAD15</i> geninin genetik içeriği.....	32
Şekil 3.5. Fermantasyon öncesi, formülasyon ve fermantasyon takibi sırasında izlenen işlem basamakları.....	36
Şekil 3.6. Soya unu bazlı ürünlere ait isimlendirme stratejisi	36
Şekil 4.1. Tek koloni düşürme tekniği ile stoklanan suşlara ait makroskobik görüntü.....	52
Şekil 4.2. Kullanılan mikroorganizmalara göre farklı pH'da gelişim sonuç grafikleri....	57
Şekil 4.3. <i>AAD15</i> Primer Çifti Kullanılarak Gerçekleştirilen HRM Analiz Sonuçları.....	63
Şekil 4.4. Kraker ve kurabiye örnekleri için pH takibi sonuçları.....	66
Şekil 4.5. Kraker ve kurabiye örnekleri için mikrobiyal sayım sonuçları.....	67
Şekil 4.6. Çalışma kapsamında elde edilen kraker ve kurabiye ürünleri.....	69
Şekil 4.7. Kraker örneklerine ait GC-FID kromatogramları.....	74
Şekil 4.8. Kurabiye örneklerine ait GC-FID kromatogramları.....	75
Şekil 4.9. Kraker örnekleri için toplam fenolik içeriklere ait sütun grafikleri.....	101
Şekil 4.10. Kraker örnekleri için toplam fenolik içeriklere ait sütun grafikleri.....	102
Şekil 4.11. Kraker ve kurabiye örnekleri için renk analizine ait sütun grafikleri	104
Şekil 4.12. Kraker örneklerine ait tekstürel analiz için sütun grafikleri	106

Şekil 4.13. Kurabiye örneklerine ait tekstürel analiz için sütun grafikleri	107
Şekil 4.14. Kraker örnekleri için elde edilen ısı haritası (A) ve temel bileşen analizi (B) sonuçları.....	109
Şekil 4.15. Kurabiye örnekleri için elde edilen ısı haritası (A) ve temel bileşen analizi (B) sonuçları.....	110



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>S. cerevisiae</i> 'nin Taksonomisi.....	3
Çizelge 2.2. <i>S. cerevisiae</i> 'nin gıda endüstrisinde kullanım alanları.....	6
Çizelge 2.3. <i>S. cerevisiae</i> tarafından üretilen bazı metabolitler ve biyoteknolojik proseslerdeki kullanım alanları.....	7
Çizelge 2.4. <i>S. boulardii</i> 'nin Taksonomisi.....	8
Çizelge 2.5. <i>S. boulardii</i> 'nin fermantasyonda kullanıldığı bazı çalışmalar.....	11
Çizelge 2.6. <i>S. boulardii</i> 'ye ait bazı metabolitler ve işlevleri.....	14
Çizelge 2.7. <i>S. boulardii</i> ve <i>S. cerevisiae</i> arasındaki bazı farklar.....	16
Çizelge 2.8. <i>S. boulardii</i> genomundaki eksik veya baskılanmış genler.....	17
Çizelge 2.9. Soya ürünlerinde fermantasyon sayesinde geliştirilen bazı etkiler.....	21
Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan HUF kodlu <i>S. cerevisiae</i> suşları.....	24
Çizelge 3.2. HRM çalışması için tasarlanan <i>AAD15</i> primerine ait özellikler.....	32
Çizelge 3.3. qPCR-HRM analizinde kullanılan parametreler.....	33
Çizelge 3.4. Kullanılan soya ununa ait enerji ve besin öğeleri.....	34
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılmak üzere optimize edilen kraker ve kurabiye formülasyonları.....	35
Çizelge 3.6. Son ürünlere ait isimlendirmeler ve ürün kodları.....	37
Çizelge 3.7. Standart eğri oluşturulması için kullanılan BSA çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri.....	43
Çizelge 3.8. GC-FID sisteminde kullanılan analiz parametreleri.....	44
Çizelge 3.9. GC-MS sisteminde kullanılan analiz parametreleri.....	46
Çizelge 4.1. Referans mikroorganizmalara ait farklı sıcaklıklarda gelişim sonuçları.....	54
Çizelge 4.2. Referans mikroorganizmalara ait glukoz ve galaktoz kullanımı deney sonuçları.....	55
Çizelge 4.3. HUF16M3H11104 ve referans suşlara ait biyokimyasal test sonuçları.....	59
Çizelge 4.4. DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri.....	61
Çizelge 4.5. qPCR-HRM analizi için erime sıcaklığı sonuçları.....	64

Çizelge 4.6. Örneklere ait nem, kuru madde ve kül analiz sonuçları.....	70
Çizelge 4.7. Kraker örnekleri için protein analizi sonuçları.....	71
Çizelge 4.8. Kurabiye örnekleri için protein analizi sonuçları.....	72
Çizelge 4.9. Kraker örnekleri için yüzde cinsinden yağ asitleri.....	77
Çizelge 4.10. Kurabiye örnekleri için yüzde cinsinden yağ asitleri.....	81
Çizelge 4.11. Kraker örneklerine ait birincil metabolit analizi sonuçları.....	84
Çizelge 4.12. Kurabiye örneklerine ait birincil metabolit analizi sonuçları.....	92
Çizelge 4.13. Kraker örnekleri için antioksidan aktivite sonuçları.....	98
Çizelge 4.14. Kurabiye örnekleri için antioksidan aktivite sonuçları.....	99
Çizelge 4.15. Kraker örnekleri için toplam fenolik içeriklere ait deney sonuçları.....	101
Çizelge 4.16. Kurabiye örnekleri için toplam fenolik içeriklere ait deney sonuçları...	102
Çizelge 4.17. Kraker ve kurabiye örnekleri için renk analizine ait sonuçlar.....	104
Çizelge 4.18. Kraker örneklerine ait tekstürel analiz sonuçları.....	106
Çizelge 4.19. Kurabiye örneklerine ait tekstürel analiz sonuçları.....	107

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

L	Litre
mL	Mililitre
g	Gram
mg	Miligram
°C	Santigrat Derece
nm	Nanometre
Å	Ångström
log	Logaritma
Cq	Döngü Sayısı
T _m	Erime sıcaklığı (°C)
R _t	Alıkonma zamanı
amu	Atomik Kütle Birimi

Kısaltmalar

kob	Koloni Oluşturan Birim
HCl	Hidroklorik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum Klorür
KOH	Potasyum Hidroksit
BSA	Sığır Serum Albümini/Bovine Serum Albumin
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
qPCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HRM	Yüksek Çözünürlükte Erime/ High Resolution Melting
F.A.M.E.	Yağ Asidi Metil Esteri
TMS	Trimetilsilil
MSTFA	N-Metil-N- (Trimetilsilil) trifloroasetamid
GC-MS	Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometresi
GC-FID	Gaz Kromatografisi - Alev İyonizasyon Dedektörü
ABTS	2,20-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
TPC	Toplam Fenolik İçerik
Gallik asit	3,4,5-Trihidroksibenzoik asit
TEAC	Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
ITS	Internal transcribed spacer
LSU	large subunit ribosomal RNA

1. GİRİŞ

Gıdalarda verimli üretim arayışı ve bilinçli tüketimin artması sonucunda protein içeriği açısından kendi kendine yeterli, mevcut protein kaynaklarının daha iyi kullanılabileceği yeni ürün arayışı ortaya çıkmıştır. Avrupa Birliği tarafından Haziran 2023'te yayınlanan AB Protein Stratejisi insan beslenmesinde bitki bazlı proteinlerin kullanımına daha fazla önem verilmesi gerektiğini vurgulamaktadır [1]. Ayrıca bitki bazlı beslenme trendi özellikle hayvansal gıdalarla karşılaştırıldıklarında sürdürülebilir ve çevreci bir alternatif olmaları sebebiyle yayılım göstermektedir. Oluşan bu talepleri eş zamanlı olarak karşılayabilmek için protein açısından zengin yeni gıda ürünlerinin yerli üretiminin teşvik edilmesinde mikroorganizmalar kullanılarak, fermente bitki bazlı gıdaların geliştirilmesi oldukça önemlidir. Postbiyotik gıdalar ise canlı mikroorganizmalardan kaynaklanan bileşenleri içeren gıdalar olarak tanımlanabilir. Bu durum, çeşitli bitki bazlı fermente gıdaların postbiyotik tanımını karşılaması bakımından bu kapsamda incelenmeye başlanmıştır [2].

Bu çalışmada probiyotik aktiviteye sahip olduğu bilinen ve dünya genelinde en sık kullanılan mikroorganizmalardan biri *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)'nın varyetesi olan *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*S. boulardii*) kullanılarak soya unu bazlı fermente gıdaların elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk aşamada, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda yer alan ve soya unu bazlı hamur fermantasyonunda kullanılması planlanan mikroorganizmaların belirlenmesi için bazı biyokimyasal testler ve qPCR-HRM analizi uygulanmıştır. DNA tabanlı denemelerin sonucunda fermantasyonda kullanılacak *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* suşları belirlenmiştir. Referans mikroorganizmaların (*S. cerevisiae* ATCC 9763, ATCC 6328 ve *S. boulardii* CNCM-I 745) yanı sıra Kültür Koleksiyonunda bulunan HUF16M3H11104 kodlu suş, *S. boulardii* olarak tanımlanmış ve bu suşları içeren soya unu bazlı hamur örnekleri fermantasyona tabi tutulmuştur. Hem kraker ve hem de kurabiye üretimi için kullanılan hamurların 48 saatlik fermantasyonu boyunca maya sayısı ve pH değerleri takip edilmiştir. Formülasyonu yapılan son ürünler olarak kraker ve kurabiye örnekleri üretilmiştir.

Son ürünlerin kimyasal özelliklerini belirlemek, fermantasyon etkisini ve kullanılan suşlardan kaynaklanabilecek değişimleri araştırmak amacıyla son ürünlere nem, kuru madde, kül, protein ekstraksiyonu ve Bradford tayini analizleri ile yağ asidi kompozisyonunun ve birincil metabolitlerin belirlenmesinin ardından antioksidan aktivite ve toplam fenolik içeriğin belirlenmesi için analizler uygulanmıştır. Ayrıca elde edilen ürünlerin sahip olabileceği duyuşal özelliklerin belirlenebilmesi için renk ve tekstür analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* ve soya unu bazlı fermente hamurlar kullanılarak postbiyotik aktiviteye sahip olma potansiyeli gösteren; protein, antioksidan aktivite ve fenolik içeriği zenginleştirilmiş kraker ve kurabiye ürünleri geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*), antik çağlardan beri bilinen tek hücreli ökaryotik bir organizmadır. Uzun süredir ekmek, bira ve şarap üretiminde kullanılmaktadır. Bu nedenle ekmek mayası veya bira mayası olarak da bilinmektedir. “*Saccharomyces*” kelimesi Yunanca “şeker mantarı” anlamına gelirken “*cerevisiae*” kelimesinin kökenleri her ikisi de “bira” anlamına gelen Galce “kerevigia” ve eski Fransızca “cervoise” kelimesinden gelmektedir [3]. *Saccharomyces cerevisiae* ilk olarak 1838 yılında adlandırılmıştır ve morfolojik özellikleri 1870 yılında Reess tarafından tanımlanmıştır [4]. *S. cerevisiae*’ya ait taksonomik sınıflandırma basamakları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. *S. cerevisiae*’nın Taksonomisi [5]

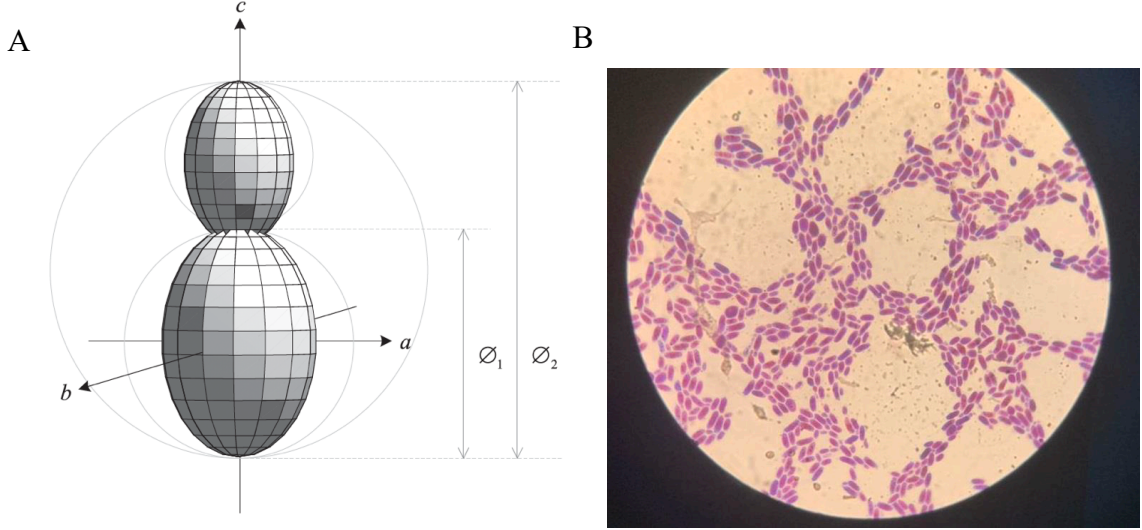
Üst Alem	Eukaryota
Alem	Fungi
Şube	Ascomycota
Alt Şube	Saccharomycotina
Sınıf	Saccharomycetes
Takım	Saccharomycetales
Aile	Saccharomycetaceae
Cins	<i>Saccharomyces</i>
Tür	<i>S. cerevisiae</i>

S. cerevisiae haploid veya diploid hücreler olarak bulunabilmektedir [6]. Ayrıca eşeyli ve eşeysiz olarak çoğalabilmektedir. Eşeysiz, yani vejetatif üreme ana hücreden yeni bir hücrenin çıkıntı şeklinde oluşması ile gerçekleşmektedir. Bu olay tomurcuklanma olarak isimlendirilir. Ana hücre genellikle 20-30 tomurcuktan fazlasını oluşturmaz. Hem diploid hem de haploid formdaki maya hücreleri tomurcuklanarak eşeysiz çoğalabilmektedir. Ancak diploid maya hücreleri karbon ve azot bakımından zayıf olan, üreme için yetersiz ortam koşullarında spor oluşturmaktadır. Diploid maya hücresi farklı gametlere sahip (α veya α) haploidlerin çiftleşmesi ile meydana gelmektedir [7]

S. cerevisiae model bir organizma olarak birçok avantaja sahiptir. Bunlardan ilki genetik yapısının iyice anlaşılmış olmasıdır. *Saccharomyces cerevisiae*, tamamen dizilenen ilk ökaryotik genomuna sahiptir. Genom dizisi 1996'da yayınlamıştır ve *Saccharomyces* Genom Veri Tabanında (*Saccharomyces* Genome Database, SGD) düzenli olarak güncellenmektedir. Kısa sayılan bir genoma sahiptir ve genetik yapısında değişiklik yapılması kolaydır. Hızlı üreyebilmesinin yanı sıra birçok maya ve yüksek ökaryotlarla arasındaki genetik benzerlik, model bir organizma olarak sahip olduğu önemli özelliklerdendir [4]

Genel olarak çoğu suşu, % 8-12 etanol (v/v) içeren ortamda gelişebilmekte ve yaklaşık %15 konsantrasyonda hayatta kalabilmektedir. Suşlarının çoğu 5 ila 40°C sıcaklık aralığında gelişebilmektedir ve maksimum büyüme oranı için optimum sıcaklık, genellikle 25-35°C arasındadır [4]

S. cerevisiae'nın YPD (Yeast Peptone Dextrose) agar besiyerindeki kolonileri tipik olarak krem-beyaz renkli, mat, yuvarlak ve pürüzsüz bir makroskobik morfoloji göstermektedir [8]. Mikroskobik olarak ise ana hücre ve tomurcuklardan oluşan *S. cerevisiae* morfolojisi, Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Morfolojik özellikler suşa ve bulunduğu büyüme evresine göre değişim göstermektedir [6].



Şekil 2.1. *S. cerevisiae*'a ait ana hücre ve tomucuk hücrelerinden oluşan temsili morfolojisi ($\varnothing_1$: Ana hücre çapı, $\varnothing_2$: ana hücre ve tomurcuğun toplam çapı) (A) ve mikroskopik görüntüsü (B) [9,10] .

2018 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, *S. cerevisiae*'nin belirli sıcaklıklarda gelişimiyle etkilenen hücre büyüklükleri araştırılmıştır [9]. Çalışma sonucunda 10 °C'lik gelişim sıcaklığında ana hücre çapı 9.02 μm ve tomurcuk çapı dahil toplam çap 14,32 μm olarak bulunmuştur. Optimum gelişim sıcak aralığında olan 30 °C'de ise hücrelerin sırasıyla 8,17 ve 14,42 μm çapa sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca optimum sıcaklığın üzerine çıkılmasıyla birlikte sıcaklık arttıkça ana ve tomurcuk hücrelerine ait çapların küçüldüğü görülmektedir.

Hücrelerin gelişimini etkileyen bir diğer parametre ise pH seviyesidir. *S. cerevisiae* hücreleri belirli bir pH aralığında gelişebilmektedir. Ancak bu aralık ortam sıcaklığı, oksijen varlığı gibi durumlara bağlıdır. Genel olarak optimum düzeyde gelişim pH 4,5 ila 6,5 seviyesinde görülmektedir [11].

Gıda endüstrisinde *S. cerevisiae* daha önce bahsedildiği üzere ekmek ve şarapçılık endüstrilerinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ancak bu iki endüstri dışında bazı metabolik mühendislik uygulamaları sayesinde de birçok alanda kullanımı mevcuttur. Fermente içecek ve ekmeklerde kullanımının yanı sıra; gıda atıklarının prosesi ve

değerlendirilmesi, etanol üretimi, bazı katkı maddelerinin üretilmesi ve hatta gıdaların bozulması gibi birçok etkiye sahiptir [4]. *S. cerevisiae*'nın endüstriyel kullanımına dair bazı uygulamalar Çizelge 2.2.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. *S. cerevisiae*'nın gıda endüstrisinde kullanım alanları [4]

<i>S. cerevisiae</i> 'nın Rolü	Kullanım Alanı
Fermente Gıda Üretimi	Şarapçılık
	Bira
	Ekmek ve ekşi maya hamurları
	Kakao fermantasyonu
Gıda Atık ve Artıklarının İşlenmesi	Bal
	Fermente içecek üretimi
	Sebze artıklarının değerlendirilmesi
	Narenciye yan ürünleri
Bozulmalar	Pancar melası
	Peynir altı suyu
	İşlenmiş meyve suyu ve püresi
	Meyve içeren fırıncılık ürünleri
Gıda Bileşenlerinin Eldesi	Meyveli yoğurtlar ve labneler
	Bazı turşular
	Alkollü içecekler
	Tatlandırıcılar
	D-dekalaton ve feniletanol üretimi
	Maya ekstraktı üretimi
	Mannoproteinler
	Glukomannanlar
	Maya protein konsantreleri
	İnvertaz
	Fruktoz şurubu

2.1.1. Metabolitleri ve Yağ Asidi Profili

S. cerevisiae'ya ait birçok birincil ve ikincil metabolit çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu mikroorganizma fermantasyonda kullanıldığında ortaya çıkan metabolitlerinin yanı sıra, biyoteknolojik proseslerle birlikte endüstriyel ürünlerin de elde edilmesi için sıklıkla kullanılmaktadır. Çizelge 2.3.'te *S. cerevisiae*'ya ait bazı metabolitler ve uygulama alanları özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. *S. cerevisiae* tarafından üretilen bazı metabolitler ve biyoteknolojik proseslerdeki kullanım alanları [12]

Metabolit Adı	Uygulama Alanları	Referans
Proteinler	Gıda endüstrisi, ilaç sanayii	[13,14]
Karotenoidler	Gıda endüstrisi, yem üretimi, gıda takviyeleri, kozmetik ve farmasötik uygulamalar	[14,15]
Gliserol	Gıda endüstrisi, Kimyasal uygulamalar, Kozmetik ve farmasötik uygulamalar	[15]
p-Kumarik asit	Tatlandırıcılar, kimyasal uygulamalar	[16]
Enzimler	Endüstriyel prosesler	[17]
Likopen	Gıda endüstrisi	[18]
Yağ asitleri	Biyoyakıtlar ve türevleri	[19]
İzobütanol	Kimyasal uygulamalar	[20]
Etanol	Kimyasal uygulamalar, biyoyakıtlar, ilaç sanayii	[21]
Artemisin	İlaç sanayii	[22]
Terpen	Biyoyakıtlar, parfüm endüstrisi, ilaç sanayii	[23]
Dihidrokalon	Kimyasal uygulamalar, ilaç sanayii	[24]
Benzilizokinolin alkaloidleri	İlaç sanayii	[25]
Triasetik asit lakton	Kimyasal uygulamalar	[26]
Monoetilen glikol	Kimyasal uygulamalar, PET (polyester polietilen tereftalat) üretimi	[27]
Kannabidiol	Kimyasal uygulamalar, ilaç sanayii	[28]

Bu maya suşları genel olarak basit bir yağ asidi profiline sahiptir. *S. cerevisiae* suşunun bünyesinde majör olarak saptanan yağ asitleri palmitoleik asit (C16:1), oleik asit (C18:1), palmitik asit (C16:0) ve stearik asittir (C18:0). Hücrelerde bulunan minör yağ asitlerinin ise miristik asit (C14:0) ve serotik asit (C26:0) olduğu belirtilmiştir [29]

Fermantasyon teknolojilerinde sıklıkla kullanılan *S. cerevisiae*'nin, elde edilen ürünler üzerinde yarattığı etkiler de büyük önem arz etmektedir. *S. cerevisiae* yalnızca fermantasyonda alkol üretmekle kalmaz, aynı zamanda ürün içeriğinde bulunan bileşenlere de farklı şekilde etki edebilmektedir. Tez kapsamında geliştirilen ürünlerin içeriğine etkisi, sonuçlar bölümünde ayrıntılı şekilde açıklanmıştır.

2.2. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

Saccharomyces cerevisiae var. *boulardii* (*S. boulardii*) Fransız mikrobiyolog Henri Boulard tarafından 1920 yılında fermantasyon proseslerinde kullanılmak üzere yeni maya suşları araştırması sırasında keşfedilmiştir. Kolera salgını sırasında salgına yakalanmayan bazı insanların özel bir çay içtiğini fark eden Henri Boulard, tropik meyveler (liçi ve mangostan) kullanılarak yapılan bu çayın içeriğindeki liçi meyvesinden özel bir maya suşu izole ederek “*S. boulardii*” olarak isimlendirmiştir [30]. *S. boulardii*'ye ait taksonomik sınıflandırma Çizelge 2.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. *S. boulardii*'nin Taksonomisi [31]

Üst Alem	Eukaryota
Alem	Fungi
Şube	Ascomycota
Alt Şube	Saccharomycotina
Sınıf	Saccharomycetes
Takım	Saccharomycetales
Aile	Saccharomycetaceae
Cins	<i>Saccharomyces</i>
Tür	Sınıflandırılmamış <i>Saccharomyces</i>

Yapılan çalışmalar, *S. boulardii*'nin hem yetişkinlerde hem de çocuklarda çeşitli hastalıkların tedavisine dair etkinliğini göstermiştir. *S. boulardii*, gastrointestinal sisteme çeşitli şekillerde fayda sağlamaktadır. Bakteriyel toksinlerin etkisiz hale getirilmesi, bağırsak hücre reseptörlerine toksin bağlanmasının engellenmesi ve toksine bağlı iltihabın azaltılması gibi etkileri söz konusudur. Ayrıca *S. boulardii*'nin, besin sindirimini ve emilimini arttıran bağışıklık sistemlerini ve bağırsak enzimlerini uyardığı belirtilmektedir [32]. Hastalığa neden olan organizmaların sayısını azaltırken sağlıklı bifidobakteri ve laktobasillerin bağırsaktaki popülasyonlarını arttırarak gastrointestinal

sisteme yarar sağlamaktadır [33]. Ayrıca *S. boulardii*'nin Crohn hastalığı gibi inflamatuvar bağırsak hastalığı semptomlarını azaltabildiği belirtilmiştir [34]. Bu probiyotik maya bağışıklık eksikliği bulunan virüs bulaşmış hastalarda antibiyotikle ilişkili ishal, akut gastroenterit ve kronik ishal hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesi için kullanılmaktadır [35]. Birçok *in vitro* ve bazı *in vivo* çalışma, *S. boulardii*'nin *Salmonella Typhimurium*, *Clostridium difficile* ve *Escherichia coli*'nin gastrointestinal sistemin epitel tabakasına bağlanmasından veya istilasından kaynaklanan bağırsak enfeksiyonlarını önleyebildiğini belirtmektedir [36]. Buna ek olarak *S. boulardii*'nin bağırsak bağışıklık sisteminin patojenik bakteriler tarafından üretilen toksinlere karşı antikor üretmesine yardımcı olmada etkili olduğu ortaya koyulmuştur. *S. boulardii*'nin bağırsak bağışıklığında önemli rol oynayan bir antikor olan intestinal immünoglobulin A'yı (IgA) uyardığı bilinmektedir [37].

S. boulardii bazen elipsoidal, oval veya küresel bir hücre yapısına sahip olabilmektedir ve spor üretmez. Glukoz, fruktoz, mannoz, sükroz ve maltoz gibi karbonhidratları fermente edebilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar *S. boulardii*'nin ısıya ve aside karşı dirençli olduğunu ve pH 2 seviyesinde dahi gelişebildiğini göstermiştir. *S. boulardii* için termal ölüm sıcaklığının 55 ila 56 °C olduğu ve tolere edebileceği en yüksek alkol konsantrasyonunun %20 olduğu gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, bağırsaktaki probiyotik rolü için uygun sıcaklığın yaklaşık 37 °C olduğu ortaya konulmuştur [38]. *S. boulardii*'nin çevresel koşullara daha dayanıklı olması, hücre duvarlarının diğer maya türlerinden daha kalın olmasıyla ilişkilendirilmektedir [39].

S. boulardii sağlık açısından sağladığı faydalar dışında, birçok ürün geliştirme çalışmasında da kullanılmaktadır [40]. Özellikle süt ve süt ürünleri endüstrisinde *S. boulardii* uygulamalarına sıklıkla rastlanmasına karşın, tez kapsamında geliştirilen fırıncılık ürünleri gibi farklı alanlarda ürünler geliştirilmesi konusunda *S. boulardii* kullanımının daha ayrıntılı araştırılması gerekmektedir [39].

S. boulardii genellikle fonksiyonel ve probiyotik özelliğe sahip ürünlerin geliştirilmesinde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Mayalar heksoz şekerleri (glukoz, fruktoz, mannoz gibi) ve disakkaritleri (maltoz ve sükroz gibi) ana karbon kaynağı olarak

kullanıp metabolize etmektedir [41]. Gıda matrisinde bulunan birçok faktör, mayaların gıda içerisindeki gelişimini etkiler ve gerçekleşen biyokimyasal değişiklikler gıdaların reolojik, duyuşsal ve besinsel değeri etkileyebilmektedir [42,43]. Maya suşları şekerleri fermente etmeleri sonucunda karbondioksit, su ve etanol ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca peptidleri aminositler ve şekerleri organik asitler, aldehit, keton, esterler gibi bileşiklere dönüştürerek aromatik bileşenler ortaya çıkarabilirler [42]. *S. boulardii* gibi mikroorganizmaların starter kültür olarak kullanılması, ortaya çıkabilen metabolitlerin gıdalarda arzu edilen özellikler ortaya çıkarması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır [44,45].

S. boulardii probiyotik aktivitesinin korunması amacıyla bazı gıda ürünlerine enkapsülasyon tekniğı kullanılarak eklenmektedir. Bu sayede tüketicide oluşacak olumlu sağılık etkileri artırılabilirken, ürünlerin raf ömrü boyunca gerçekleşebilecek istenmeyen durumlar da en aza indirgenebilir [39]. Özellikle peynir, yoğıurt, kefir gibi süt ve süt ürünlerinde kullanılan enkapsülasyon tekniğı ile *S. boulardii* hücrelerinin gıdalarda daha uzun süre canlılığını koruduğı belirtilmektedir [46,47].

Enkapsülasyon dışında karışık kültür fermantasyonunda da kullanılabilen *S. boulardii*, laktik asit bakteriyile birlikte kullanıldığında çiğ, pastörize veya UHT sütlerde bakterilerce oluşturulan bileşenleri kullanarak gelişim gösterebilmiş ve depolama sürecinde laktik asit bakterilerinin stabilitesini arttırmıştır. Ayrıca fermente edilmiş son ürünlerde antioksidan aktivitenin arttığı da belirtilmektedir [39,48].

Tahıl ve baklagillerde ise antinütrientlerin ortadan kaldırılması ve stabilizasyonu genellikle enzim deaktivasyonu ile sağlanmaktadır. Bu amaçla ısıt işlemler kullanılmasıyla besin değeri kaybı oluşabilmesi nedeniyle fermantasyon, ısıt işleme göre avantaj sağlamaktadır. Tahıllar ve baklagillerde ana antinütrient olan fitatların azaltılması için literatürde birçok çalışma bulunmaktadır [49,50]. Bu amaçla *S. boulardii* kullanılabileceğı de belirtilmektedir [39,45].

S. boulardii'nin kullanıldığı bir diğer ürün grubu ise fonksiyonel içeceklerdir. *S. boulardii*'nin probiyotik ve prebiyotik etkileri sayesinde biyoaktif içeriğin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır [39]. Gerçekleştirilen bir çalışmada *S. boulardii* ve *S. cerevisiae* kullanımıyla turp, havuç ve pancar sularında fenolik içeriğin artırıldığı ve antioksidan aktivitenin geliştirildiği belirtilmiştir. Ancak bu tür gıdalarda 10^3 kob/g seviyesinin üzerinde hücre kullanımının tekstür ve istenmeyen tat oluşumunda etkili olabileceği not edilmiştir [51]. Çizelge 2.5.'te *S. boulardii*'nin bazı kullanım alanları ve elde edilen sonuçlar özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. *S. boulardii*'nin fermentasyonda kullanıldığı bazı çalışmalar [52]

Ürün	Kültürler	Formülasyon	Referans
Yoğurt	<i>S. boulardii</i> ve bazı Laktik asit bakterileri	Fermente	[53]
Peynir altı suyu	<i>S. boulardii</i> ve laktaz enzimi	Fermente	[54]
Dondurma	<i>S. boulardii</i> ve bazı Laktik asit bakterileri	Fermente	[55]
Bira	<i>S. boulardii</i>	Fermente	[56–58]
Meyve ve kaju suyu	<i>S. boulardii</i>	Fermente edilmemiş	[59]
Çikolata	<i>S. boulardii</i>	Fermente edilmemiş	[60]
Kahve	<i>S. boulardii</i> ve bazı Laktik asit bakterileri	Fermente	[61,62]
Çay	<i>S. boulardii</i> ,	Fermente	[63,64]

Çizelgede özetlenen çalışmalara göre, *S. boulardii* kullanımının gıdalara fonksiyonel bir özellik kazandırdığı söylenebilir. Ayrıca bu mikroorganizmanın antioksidan aktivite, fenolik içeriğin geliştirilmesi, probiyotik aktivite gibi olumlu etkilerinin yanı sıra ürünlerde pH stabilizasyonu, asitlik düzenleyici ve raf ömrünü arttırıcı etkisinin de bulunduğu belirtilmektedir [39].

Probiyotikler, ilk olarak Lily ve Stillwell tarafından tanımlanmıştır. Kelime anlamı latince “pro” ve “bios” kökenlerinden gelmektedir ve bu kelimeler “yaşam için” anlamını taşımaktadır [65]. Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization, FAO), Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) uzmanlarınca probiyotikler; 2001 yılında “Gıdanın bir parçası olarak ve yeterli sayıda tüketildiği takdirde, konakçının

sağlığı üzerinde olumlu etki yaratan canlı mikroorganizmalar’’ olarak tanımlanmıştır [66]. Probiyotik olarak kullanılıp gıdaya eklenen mikroorganizmalar genellikle laktobasiller, enterokoklar ve bifidobakterilerdir. Probiyotik özellik gösterdiği bilinen, en çok kullanılan probiyotik maya ise *S. boulardii*’dir [65,67]. Probiyotik mikroorganizmalar mide ve bağırsak ortamlarında zarar görmeden canlı kalabilmeleri açısından yüksek asitli ortamlara ve safra tuzlarına dirençlidirler. Probiyotik özelliğe sahip gıdaların düzenli tüketimiyle birlikte, insan vücudunda sağladığı bazı faydalar ortaya çıkmaktadır. Bunlar mikrobiyal dengenin iyileştirilmesi, vitamin üretimi, kolon kanserine karşı etkiler, serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi, ishale karşı etkiler, bazı patojenik bakterilerin vücutta gelişimini inhibe edici, kanser karşıtı ve anti alerjen etkilerdir [68].

Prebiyotik terimi ise ilk olarak 1995 yılında Glenn Gibson ve Marcel Roberfroid tarafından ortaya çıkarılmıştır [69]. Prebiyotikler, “kolonda bulunan mikroorganizmaların büyümesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyararak konakçıya yarar sağlayan, böylece konakçının sağlığını iyileştiren, sindirilmeyen gıda bileşenleri” olarak tanımlanmaktadır [70]. Bu bileşenlerin parçalanma ürünleri genellikle kısa zincirli yağ asitleridir ve bu yağ asitleri kan dolaşımına katılarak intestinal sağlık dışında diğer organlar üzerinde de olumlu etkiler yaratabilmektedir. Galakto- ve frukto-oligosakkaritler en önemli prebiyotik bileşenlerden birkaçıdır [70].

Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Derneği (ISAPP) 2019 yılında, probiyotik ve prebiyotik terimlerinin tanımının yanı sıra postbiyotik terimi tanımını ve kapsamını gözden geçirmiştir [1]. 'Postbiyotik' terimi, bilimsel literatürde ve ticari ürünlerde giderek daha fazla yer alması nedeni ile ISAPP, bir postbiyotiği “konakçıya sağlık yararı sağlayan cansız mikroorganizmalar ve/veya bu mikroorganizma bileşenleri ile hazırlanan ürünler” olarak tanımlanmıştır. Buna göre, postbiyotik terimi, “canlı organizmalarla ilgili veya bunlardan kaynaklanan” olarak tanımlanan “biyotik” ve “sonra” anlamına gelen bir ön ek olan “post” un bir bileşimi olarak seçilmiştir. Çeşitli bitki bazlı fermente gıda ürünleri postbiyotik tanımını karşılaması bakımından bu kapsamda incelenmeye başlanmıştır [2]. Postbiyotiklerin en önemli etkileri obezitenin engellenmesi, lipid metabolizmasının düzenlenmesi, hidrasyon, kronik hastalıklara ait

semptomların azaltılması, immün sistemin düzenlenmesi ve intestinal sağığın geliştirilmesidir [71].

S. boulardii'ye spesifik bir yağ asidi profili çalışması bulunmamakla birlikte, intestinal mikroflorada bulunan *S. boulardii* suşlarının yağ asitlerine etkisiyle ilgili çalışmalar literatürde sıklıkla yer almaktadır [72,73]. Ayrıca soya bazlı yoğurt ürünüyle gerçekleştirilen bir çalışmada, *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*) ve *S. boulardii*'nin ürün içeriğindeki oleik, linoleik, α -linolenik ve eikosenoik asit miktarlarını arttırdığı belirtilmiştir [74].

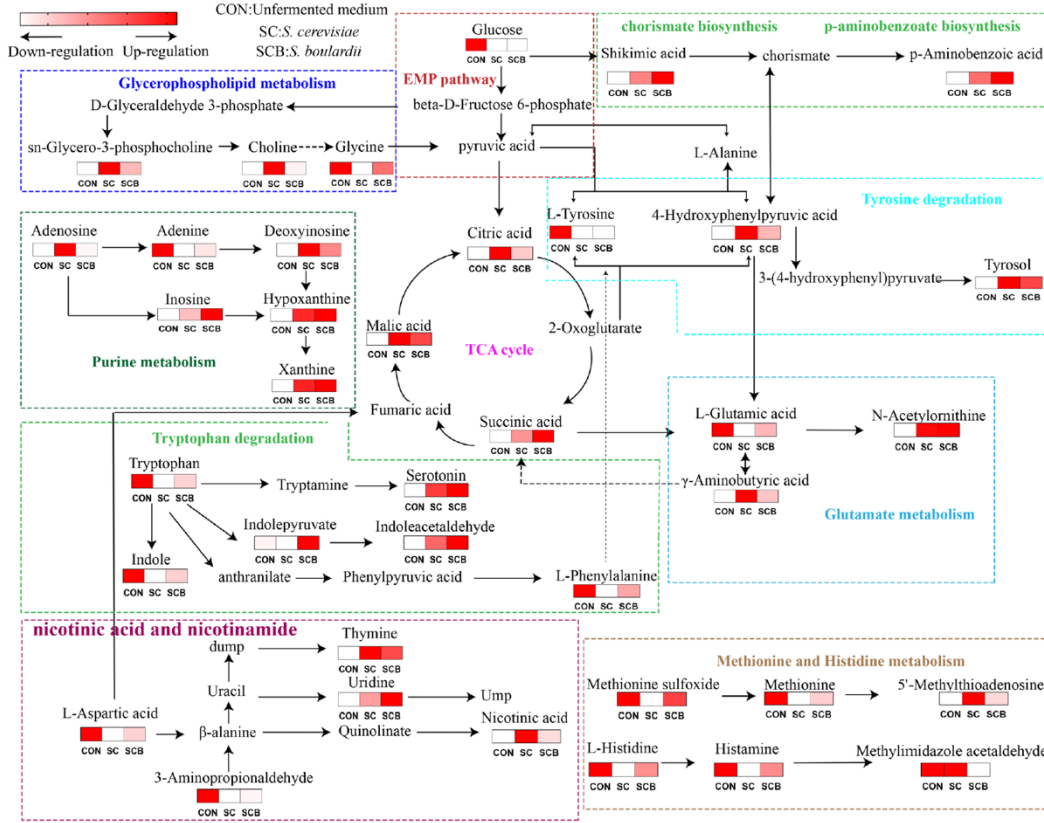
2.2.1. Metabolitleri ve Yağ Asidi profili

S. boulardii, probiyotik aktivitesi nedeniyle özellikle son yıllarda sıklıkla çalışılan bir mikroorganizma haline gelmiş ve önem kazanmıştır. Özellikle ortaya çıkardığı metabolitler sayesinde patojenik toksinlerin salınımını engellemesi, fermantasyonda kullanılmasıyla antioksidan aktivitenin, fenolik içeriğın ve mineral biyoyararlanımının artırılması gibi etkileri söz konusudur [75]. Çizelge 2.6.'da *S. boulardii*'ye ait bazı metabolitler ve bu metabolitlere ait işlevler gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. *S. boulardii*'ye ait bazı metabolitler ve işlevleri [75]

Metabolit	İşlev
N-Akriloilglisin	Gıdalarda lezzetin arttırılması
N6-Asetil-l-lisin	
N-Asetilhistidin	
N-Metilalanin	Tümör hücrelerinin gelişiminin engellenmesi ve bağışıklığın güçlendirilmesi
p-Aminobenzoik asit	Antibakteriyel ve anti-tümör etki
Tirosol	Antioksidan aktivite ve gıda patojenlerinin inhibisyonu
Gliserofosfokolin	Lipid metabolizmasının geliştirilmesi
1-Aminosiklopropanekarboksilik asit	Nöron korunumu
2-Hidroksi-4-metilpentanoik asit	Antibakteriyel etki
L-3-Fenillaktik asit	
Fenillaktik asit	
γ -Aminobütirik asit	Uykusuzluk (insomnia) ve depresyon tedavisi
Nikotinik asit	Vitamin
Harmane	Antitümör, antioksidan ve antibakteriyel aktivite

S. boulardii hücreleri tarafından üretilen birçok metabolit, *S. cerevisiae*'ya benzer ve farklı olmak üzere birçok yolak kullanılarak üretilmektedir. *S. boulardii* hücrelerince kullanılan önemli yollardan birkaçı Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. *S. boulardii*'ye ait bazı metabolitlerin elde edilmesinde kullanılan ana yollar [75]

Yukarıda verilen çalışma sonucunda, fermantasyonda kullanılan ve fermantasyona tabi tutulmamış ortamlarda, *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* hücrelerine ait metabolitlerin ortaya çıkmasında kullanılan yollar gösterilmiştir [75]. Çalışmada fermantasyonla birlikte *S. boulardii* hücrelerinde birçok metabolitin yukarı ve aşağı regüle olduğu görülmektedir.

2.3. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* Arasındaki Farklılıklar

S. boulardii'nin ilk kez izole edilmesinden bu yana taksonomik sınıflandırması hakkında birçok araştırma yapılmıştır. Genetik olarak %99 oranında *S. cerevisiae* ile yakınlığı bulunmasına rağmen aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır. *S. boulardii*'nin özellikle probiyotik özellik göstermesi bu mikroorganizmayı diğer *S. cerevisiae* suşlarından ayırmaktadır. Ayrıca optimum gelişim sıcaklıkları da farklılık göstermektedir. *S. cerevisiae*'nin optimum gelişim sıcaklığı 30°C iken *S. boulardii*'nin 37°C'dir. Yapılan

alışmalar sonucu gözlenen bir diğ er farklılık ise pH'ya gösterdikleri direnç miktarıdır. *S. boulardii*, *S. cerevisiae*'ya kıyasla düşük pH'ya karşı daha dirençlidir. Tüm bu farklılıklara ek olarak *S. boulardii*'nin etanole dayanıklılık seviyesi %20'ye kadar çıkabilirken *S. cerevisiae*'nın gelişimi etanol %14 oranındayken durmaktadır [33,76]. Ayrıca DNA - RNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda *S. cerevisiae*'nın tüm Ty elementlerini (maya transposon elementleri) bulundurduğu ancak *S. boulardii*'nin Ty 1/3/4 elementlerinin eksik olduğu belirtilmiştir [77]. *S. boulardii* ve *S. cerevisiae* arasında bulunan bazı farklılıklar izelge 2.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. *S. boulardii* ve *S. cerevisiae* arasındaki bazı farklar [76,77]

<i>S. boulardii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Optimum gelişim sıcaklığı 37°C'dir	Optimum gelişim sıcaklığı 30°C'dir
Gastrik pH'ya dirençlidir	Gastrik pH'ya daha düşük direnç gösterir
Galaktoz kullanımı sınırlıdır	Galaktozu fermente edebilir
0.1% (w/v) oranında safra asidine dayanıklıdır	0.15% (w/v) oranında safra asidine dayanıklıdır
Yalnızca diploid hücre yapısında bulunur	Hem diploid hem haploid hücre yapısında bulunabilir
Ty 1/3/4 elementleri eksiktir	Ty elementleri tamdır

2017 yılında Khatri ve arkadaşları tarafından *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada bu iki mikroorganizma arasında bulunan genetik farklılıklar incelenmiştir. Çalışma sonucunda *S. boulardii*'nin *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında bazı genlerinin eksik veya baskılanmış olabileceği ortaya koyulmuştur. Bu genler izelge 2.8.'de ayrıntılı biçimde listelenmiştir.

Çizelge 2.8. *S. boulardii* genomundaki eksik veya baskılanmış genler [78]

Sistematik Ad	Gen	Fonksiyon
YOL165C	<i>AAD15</i>	Aril-alkol dehidrogenaz
YNR074C	<i>AIF1</i>	Mitokondriyal hücre ölümü efektörü
YHL047C	<i>ARN2</i>	Taşıyıcı
YLR155C	<i>ASP3-1</i>	Asparajin yıkımı
YLR157C	<i>ASP3-2</i>	
YLR158C	<i>ASP3-3</i>	
YLR160C	<i>ASP3-4</i>	
YLL063C	<i>AYT1</i>	Asetiltransferaz
YOL164W	<i>BDS1</i>	Sülfataz
YLR465C	<i>BSC3</i>	Stop Kodon
YNR075W	<i>COS10</i>	Bilinmeyen protein işlevi
YGR295C	<i>COS6</i>	
YOL158C	<i>ENB1</i>	Endozomal ferrik enterobaktin taşıyıcısı
YOL156W	<i>HXT11</i>	Hekzos taşıyıcısı
YJL219W	<i>HXT9</i>	
YOL157C	<i>IMA2</i>	Izomaltaz
YIL172C	<i>IMA3</i>	
YJL221C	<i>IMA4</i>	
YGR289C	<i>MAL11</i>	Yüksek afiniteli maltoz taşıyıcısı
YGR288W	<i>MAL13</i>	MAL-aktivasyon proteini
YIR041W	<i>PAU15</i>	Seripauperin
YKL224C	<i>PAU16</i>	
YJL217W	<i>REE1</i>	Enolaz (ENO1) düzenlemesinde işlev gösteren sitoplazmik protein
YAL064C-A	<i>TDA8</i>	Topoizomeraz I
YOR068C	<i>VAM10</i>	Koful morfojenisi
YIL173W	<i>VTH1</i>	Membran glukoproteini
YJL222W	<i>VTH2</i>	

S. boulardii gibi farklı mikroorganizmalarla yüksek oranda benzerliğe sahip olan mikroorganizmalar, genotipleme ve çeşitli noktasal mutasyonların saptanmasında kullanılan, qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)'da yüksek çözünürlüklü erime (High-Resolution Melting, HRM) tekniğinin kullanılmasıyla ayırt edilebilmektedir [79]. Bu teknik kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, ekşi maya içeriğinde bulunan bazı *S. cerevisiae* suşlarının tür ve cins düzeyinde tanımlaması gerçekleştirilmiştir [80]. Bu çalışma kapsamında IT2 veya 26S ribozomal RNA bölgeleri üzerinde araştırma yapılarak bazı suşların ayrımı sağlanmıştır. Tez çalışmasının ilerleyen bölümlerinde qPCR-HRM tekniği kullanılarak *S. boulardii* suşlarının ayırt edilmesi ayrıntılı biçimde incelenmiştir.

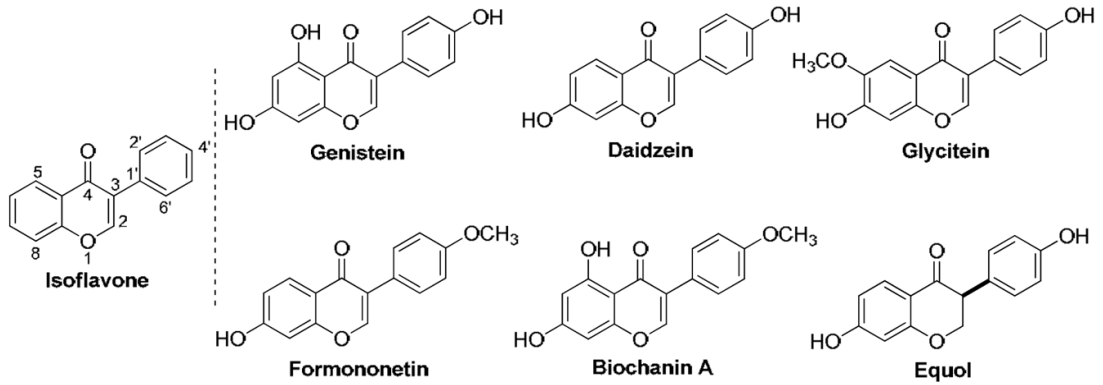
2.4. Soya ve Soya Ürünleri

Soya fasülyesi (*Glycine max L.*) baklagiller familyasına ait, besleyici değeri yüksek, hayvansal gıdalar için çoğunlukla ikame edici olarak kullanılabilen bitkisel bir gıdadır [81].

Farklı soya genotiplerinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, soya fasülyelerinin ortalama yüzde protein (39,4– 45) yağ (14,0–25), nişasta (4,3–6,7), toplam şeker (5,6–7,9), indirgen şeker (0,21–0,33) ve sükroz (5,6–11,8) içeriğine sahip olduğu belirtilmiştir [81–83]. Ayrıca karbonhidrat içeriğinin %33 seviyelerinde olduğu belirtilmektedir. Aminoasit içeriği konusunda lizin içermesi, önemli bir parametre olarak ele alınmaktadır [84]. Soya yağı ise oleik ve linoleik asit içeriği ve içerdiği E vitamini sayesinde iyi bir bitkisel yağ kaynağı olarak görülmektedir [85,86]. Soya fasulyesi ile yapılan yağ asidi profili çalışmasında majör yağ asitlerinin sırasıyla; linoleik (C18:2), oleik (C18:1), palmitik (C16:0), linolenik (C18:3) ve stearik asit (C18:0) olduğu belirtilmiştir. Soyanın içerdiği yağ asidi profili sayesinde düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve kandaki kolesterol seviyelerinin dengelenmesi konusunda iyi bir kaynak olduğu belirtilmektedir [87]. Ayrıca genel olarak bazı kanser türlerine karşı etkili, kardiyovasküler sağlığı olumlu etkileyen; kemik, cilt, böbrek, mental sağlığın geliştirilmesi gibi etkileri bulunduğu da not edilmiştir [81,88].

Soya fasülyesi, içerdiği besinsel ögeler ele alındığında besleyici bir bitkisel kaynak olarak gösterilebilir ancak aynı zamanda bazı antinütrient faktörler de içerebilmektedir. Bunlar bazı fenoller, fitik asit ve tripsin inhibitörleridir. Özellikle fitik asit, bazı minerallerin vücuttaki biyoyararlanımının azalmasına neden olur [82]. Ancak soya içeriği çevresel faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Wijewardana ve ark. gerçekleştirdiği çalışma sonucunda, soya fasulyelerinin kimyasal kompozisyonunun çevre şartları ve yetiştirilen toprağın özelliklerine göre değişebileceği belirtilmiştir [89]. İçerdiği en önemli besinsel ögelerden biri ise izoflavonlardır [90].

Izoflavonlar baklagillerin içeriğinde bulunabilen, yüksek antioksidan aktivite sağlayan ikincil metabolitlerdir [81,91]. Soya içeriğinde çoğunlukla genistein, daidzein ve glisitein bulunmaktadır [81,92]. Soyada bulunan izoflavonlar Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Soya içeriğinde bulunan izoflavonlar [81]

Daha önce soya fasulyesinin sağladığı belirtilen birçok olumlu etki, izoflavonlar sayesinde ortaya çıkmaktadır. Çoğunlukla fitoöstrojen olarak adlandırılan soya izoflavonları, özellikle vücutta östrojen benzeri rol alarak, bu hormon kaynaklı kanser çeşitlerine karşı etki göstermektedir. Ayrıca anti-fungal ve anti-mutajenik etkileri bulunduğunu da bildirilmiştir [81,93].

En bilinen fitoöstrojenik maddelerden biri olan genistein, vücutta östrojen reseptörlerine bağlanabilir. Kontrolsüz hücre bölünmesini etkileyen faktörlerle ilişkilendirilen bu izoflavon, soyaya ait anti-kanser etkinin ortaya çıkmasında rol üstlenmektedir [81].

Soya içeriğinde bulunan bir diğer madde ise daidzeindir. Genellikle soya içeriğinde genisteinden daha az bulunmaktadır. Tüketiminden sonra bağırsakta bulunan bakteriler tarafından bir başka izoflavon olan ekuole çevrilebilir [81].

Glisitein metoksi grubu içermesi nedeniyle oldukça özeldir. Bu sayede diğer izoflavonlardan daha yüksek biyoyararlılık gösterebilmektedir. Ayrıca stabilitesi daha yüksektir. Soya içeriğinde bulunan izoflavonların yaklaşık %5 ila 10'unu oluşturur [81].

Soya fasülyesi genellikle fermente edilmiş veya edilmemiş formlarda tüketiciye sunulmaktadır. Fermente edilmeyen soya ürünleri genellikle soya sütü, tofu, soya keki gibi ürünlerdir. Ancak fermantasyon prosesi kullanılarak birçok soya bazlı gıda geliştirilmiştir. Özellikle soya sosu, natto ve tempeh en bilinen fermente soya ürünleridir. Çizelge 2.9'da soya bazlı ürünlerde gerçekleştirilen fermantasyon işlemi ile ortaya çıkabilen bazı etkiler özetlenmiştir.

Çizelge 2.9. Soya ürünlerinde fermentasyon sayesinde geliştirilen bazı etkiler

Amaç	Fermentasyon ve Etkisi	Referans
	<i>Lactiplantibacillus</i>	
Protein sindirilebilirliğinin artırılması	<i>plantarum</i> * kullanılarak soya proteinlerinin sindirilebilirlik düzeyi %92 oranında arttırılmıştır	[94]
Mineral yararlanımının artırılması	Laktik asit fermentasyonu sayesinde demir ve çinko yararlanımı geliştirilmiştir	[95]
	<i>Lactocaseibacillus casei</i> *	
Fitik asit miktarının azaltılması	kullanılarak soya içeceğinde fitik asit miktarı %90 oranında azaltılmıştır	[96]
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	
Tripsin inhibitörleri	kullanılarak tripsin inhibitörleri minimize edilmiştir	[97]
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	
Lektinler, Saponinler ve taninler	kullanılarak lektin, saponin ve tanin miktarları etkili biçimde azaltılmıştır	[97–99]
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> *	
Anti-obezite	kullanılarak elde edilen soya bazlı fermente içeceğin tüketimiyle iştahın düzenlenlenebileceği gösterilmiştir	[100]
	Probiyotik karışimli soya ürünleriyle bağırsakta enzim aktiviteleri düzenlenerek kolon kanseri hücrelerinin aktivitesi azaltılmıştır	[101]

*İşaretili mikroorganizmaların orijinal kaynaktaki isimleri BacDive (<https://bacdiv.dsmz.de>) veritabanındaki güncellenmiş isimleri ile değiştirilmiştir.

Son yıllarda bitki bazlı gıda tüketiminin artması, soyanın sağladığı birçok olumlu etki de göz önünde bulundurulduğunda soya içerikli ürünler üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır [89,102].

Bu tez çalışmasında, probiyotik bir maya olan *S. boulardii*'nin varolan kültür koleksiyonunda bulunan *S. cerevisiae* suşları arasından seçimi ve belirlenen suşların soya unu bazlı hamur fermantasyonunda kullanılarak postbiyotik etki gösterebilecek potansiyele sahip fermente gıda üretimi hedeflenmiştir.



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Mikroorganizmalar, Canlandırma ve Stok Eldesi

Gerçekleştirilen tez çalışmasında FoodOmics Laboratuvarı kültür koleksiyonunda (HUF) bulunan *S. cerevisiae* suşları kullanılmıştır. Kullanılan mikroorganizmaların canlandırılması, izolasyonu ve stok kültür eldesi sırasında içerisinde %1 (w/v) maya ekstraktı, %2 (w/v) pepton ve %2 (w/v) glukoz içeren YPD (Yeast Peptone Dextrose) Broth (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri/ABD, ürün kodu: Y1375) besiyeri kullanılmıştır. Ayrıca katı besiyeri olarak içerisinde %1 (w/v) maya ekstraktı, %2 (w/v) pepton, %2 (w/v) glukoz ve %1,5 (w/v) agar içeren YPD (Yeast Peptone Dextrose) Agar (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri/ ABD, ürün kodu: Y1500) kullanılmıştır. Tüm besiyerleri kullanılmadan önce 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. İnkübasyon boyunca kültürler etüvde (Memmert GmbH, Schwabach/Almanya, ürün kodu: TypB30) tutulmuştur. Elde edilen kültürler, içerisinde YPD Agar bulunan tek kullanımlık steril petrilerde (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 081.02.161) +4 °C’de saklanmıştır. Ayrıca geliştirilen tüm suşlar içerisinde %50 oranında gliserol ve %50 oranında besiyeri bulunduran tüpler kullanılarak kriyojenik olarak stoklanmıştır. Stok mikroorganizmalar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Tez çalışması boyunca kullanılan suşlara ait kaynak, izolasyon kod ve bölgelerine ait bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan HUF kodlu *S. cerevisiae* suşları

No	Kaynak	İzolasyon Bölgesi	İzolasyon Kodu
1	Ticari	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	745
2	Ticari	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	9763
3	Ticari	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 6328	6328
4	HUF (FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu)	Ankara, Toprak	16M2K10007
5		Kırıkkale, Üzüm	16M3B11017
6		Kırıkkale, Üzüm	16M3B11021
7		Kırşehir, Üzüm	16M3C11031
8		Kırşehir, Üzüm	16M3C11032
9		Kırşehir, Üzüm	16M3C11033
10		Nevşehir, Üzüm	16M3D11047
11		Eskişehir, Üzüm	16M3G11088
12		Çankırı, Üzüm	16M3H11101
13		Çankırı, Üzüm	16M3H11104
14		Kırıkkale, Toprak	17M3B32047
15		Kırşehir, Üzüm	17M3C31063
16		Kırşehir, Üzüm	17M3C31065
17		Kırşehir, Üzüm	17M3C31066
18		Nevşehir, Üzüm	17M3D31086
19		Nevşehir, Üzüm	17M3D31088
20		Nevşehir, Üzüm	17M3D31089
21		Aksaray, Üzüm	17M3E21112
22		Aksaray, Üzüm	17M3E21113
23		Aksaray, Üzüm	17M3E21114
24		Ankara, Üzüm	17M3F21122
25		Ankara, Üzüm	17M3F21126

26		Ankara, Toprak	17M3F21134
27		Ankara, Üzüm	17M3F31136
28		Eskişehir, Toprak	17M3G32157
29		Karaman, Üzüm	17M3H21208
30		Karaman, Üzüm	17M3H21209
31		Ankara, Toprak	18M2Y10013
32		Adana, Toprak	18M2Z10001
33		Adana, Toprak	18M2Z10009
34		Adana, Toprak	18M2Z10014
35		Adana, Toprak	18M2Z10021
36		Adana, Toprak	18M2Z10026
37		Kırıkkale, Üzüm	18M3B21008
38		Kırıkkale, Toprak	18M3B21010
39		Kırşehir, Üzüm	18M3C21001
40		Kırşehir, Üzüm	18M3C21008
41		Kırşehir, Toprak	18M3C21010
42		Nevşehir, Üzüm	18M3D21001
43		Nevşehir, Üzüm	18M3D21006
44		Nevşehir, Üzüm	18M3D21008
45		Aksaray, Üzüm	18M3E21007
46		Ankara, Üzüm	18M3F21010
47		Ankara, Üzüm	18M3F21012
48		Eskişehir, Üzüm	18M3G21009
49		Sivas, Üzüm	18M3J21008
50		Konya, Üzüm	18M3K21007
51		Yozgat, Üzüm	18M3L21008
52		Yozgat, Üzüm	18M3L21010

HUF
(FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu)

Tez çalışması kapsamında kontrol olarak kullanılan *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCMI-745 suşu ticari olarak satın alınan BIOCODEX Reflor 250 mg kapsül ürününden izole edilmiş ve *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 ve ATCC 6328 suşları ticari olarak satın alınmıştır.

Kullanılan *S. cerevisiae* suşları sıvı besiyerine inoküle edildikten sonra 48 saat boyunca 30 °C’de, *S. boulardii* suşu ise 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından sıvı besiyerinden, içerisinde agarlı besiyeri bulunan petrilere tek koloni düşürme yöntemiyle ekim yapılmış ve ardından 48 saat boyunca ilgili sıcaklıklarda inkübasyon sağlanmıştır. Katı besiyerinde gözlenen makroskobik morfolojilere göre saf olduğu belirlenen kültürler +4 °C’de depolanmıştır.

3.2. Mikroorganizmalara Uygulanan Biyokimyasal Testler

3.2.1. Belirlenen Sıcaklıklarda Gelişim

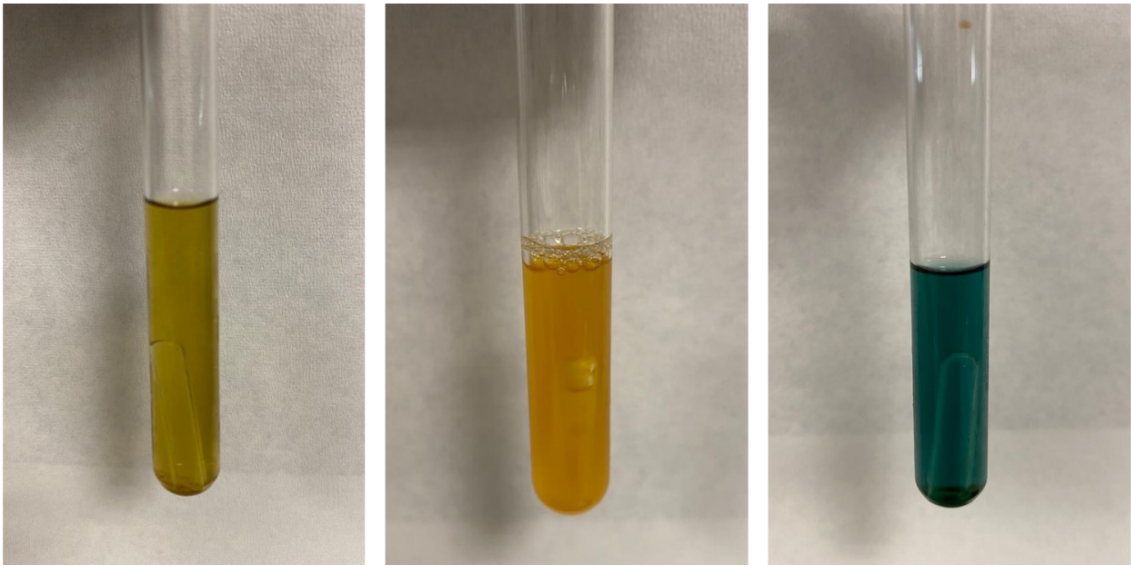
Canlandırılan ve stoklanan kültürlerin farklı sıcaklıklarda gelişiminin izlenebilmesi amacıyla YPD Broth besiyeri (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: Y1375) kullanılmıştır. Bu amaçla 30, 37 ve 45 °C’de gelişim testi gerçekleştirilmiştir [6,103,104]. Mikroorganizmalardan her biri 2 öze olacak şekilde 10 mL sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Ardından 48 saat boyunca bulanıklık gelişimi not edilmiştir. Bulanıklık oluşumuna bağlı olarak suşların belirtilen sıcaklıklardaki gelişimi pozitif veya negatif şeklinde ortaya konmuştur. Denemeler iki paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Glukoz ve Galaktoz Kullanımı

Mikroorganizmaların glukoz ve galaktoz kullanımının belirlenmesi için içerisinde tek şeker kaynağı olacak şekilde glukoz veya galaktoz barındıran bazal besiyerleri hazırlanmıştır [103,104]. Bazal besiyerinin hazırlanmasında 2,25 g/L toz maya ekstraktı (Merck KGaA, Darmstadt/Germany, ürün kodu: 103753) ve 3,75 g/L pepton (Merck KGaA, Darmstadt/Germany, ürün kodu: 107214) kullanılmıştır. Ayrıca şeker kullanımının fiziksel olarak gözlenebilmesi amacıyla, renklendirici ajan olarak 50 g/75 mL bromtimol mavisi (Merck KGaA, Darmstadt/Germany, ürün kodu: 103026)

eklenmiştir. Şeker kaynağı olarak ise 20 g/L $\pm$ -(D) glukoz (Merck KGaA, Darmstadt/Germany, ürün kodu: 108337) veya D-galaktozdan (Merck KGaA, Darmstadt/Germany, ürün kodu: 3455) yararlanılmıştır. İçinde Durham tüpleri bulunan 15 mL hacimdeki besiyerlerine stok kültürlerin tamamından, her suş için iki öze olacak şekilde inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Deney süreci 15 gün boyunca 37 °C’de inkübasyonla devam etmiştir. Bu süreçte besiyerlerinde gerçekleşen renk değişimleri ve gaz oluşumları kayıt altına alınarak suşların şeker kullanım yetenekleri ortaya konulmuştur.

Deney sonuçlarının yorumlanabilmesi için gerçekleşebilecek renk değişimi, gaz oluşumuna dair anlamlı sonuçlara örnek resimler Şekil 3.1’de yer verilmiştir. Tüm deneyler iki paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak steril besiyerleri inkübasyon boyunca izlenmiştir.



Şekil 3.1. Glukoz ve galaktoz kullanımı testi muhtemel sonuçları

(Sırasıyla kontrol (renk yeşil, gaz oluşumu yok), pozitif (renk değişimi sarı, gaz oluşumu var), negatif (renk değişimi mavi, gaz oluşumu yok))

Glukoz ve galaktoz kullanım testine dair muhtemel sonuçlar, besiyerinde ilgili şekerlerin kullanımı ile eklenen indikatör sayesinde ortaya çıkan renk değişimleri üzerinden yorumlanmıştır. Besiyerinde şeker kaynaklarının mikroorganizmalar tarafından kullanılması durumunda yeşilden sarıya doğru bir değişim kaydedilmektedir. Aynı

zamanda mikroorganizmaların gelişimi sırasında gerçekleşen gaz oluşumu Durham tüpleri sayesinde gözlenebilmektedir. Ancak ilgili şekerlerin karbon kaynağı olarak kullanılamaması durumunda besiyeri ortamında bulunan aminoasitler, inkübasyon sürecinde besiyeri rengini yeşilden maviye dönüştürmektedir. Bu durumun yanında Durham tüplerinde gaz oluşumu gözlenmesi beklenmemektedir [104].

3.2.3. Farklı pH’da Gelişim

Biyokimyasal testlerin son aşamasında, farklı pH’da gelişim analizi için kullanılan YPD broth besiyeri pH’ları 2N HCl (Hidroklorik Asit, Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 30721) kullanılarak 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 değerlerine ayarlanmıştır. Deney süresince 50 mL hacimli santrifüj tüpleri (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 078.02.001) kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler tek kullanımlık spektrofotometrik küvetlerde (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 098.02.002), Genesys 10S UV-VIS Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts/ABD, ürün kodu: 840-208100) ile gerçekleştirilmiştir.

Bu aşamada suşların 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 pH değerlerine sahip besiyerlerinde canlı kalabilme yetenekleri test edilmiştir. Bu analizde biyokimyasal testler boyunca 37 ve 45 °C’de gelişim gösteren ve 15 günlük süreçte galaktoz kullanımı gözlenmeyen suşlar kullanılmıştır. Bu amaçla stok durumundaki suşların 24 kuyulu, içerisinde 2 mL sıvı besiyeri bulunduran steril hücre kültürü petrilere (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster/Avusturya, ürün kodu: 662160) her suştan iki öze olacak şekilde inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm petriler 48 saat boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Canlandırılan suşlar, içerisinde belirtilen pH değerlerinde 25 mL sıvı besiyeri bulunduran santrifüj tüplerine (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 078.02.001) aktarılmıştır. Deneyin başlatılması amacıyla santrifüj tüplerine %1 inokulum eklenmiştir. Suşların gelişiminin gözlenebilmesi amacıyla 0, 4, 8, 12 ve 16. saatlerde 600 nm’de türbidimetrik ölçümler alınmıştır [105].

Kontrol olarak her bir mikroorganizmanın, içerisinde normal pH'ya sahip besiyeri bulunduran tüplerdeki gelişimleri, deneyle eş zamanlı olarak izlenmiştir. Tüm çalışmalar iki biyolojik tekrar ve iki teknik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerleri kaydedilmiş ve suşların 600 nm'deki standart eğri denklemi kullanılarak gelişimleri log (kob/mL) cinsinden hesaplanmıştır. Kullanılan standart eğri denklemi aşağıdaki gibidir:

$$y=0,0949x-0,0068 \quad (3.1)$$

y= 600 nm'deki absorbans değeri (A°)

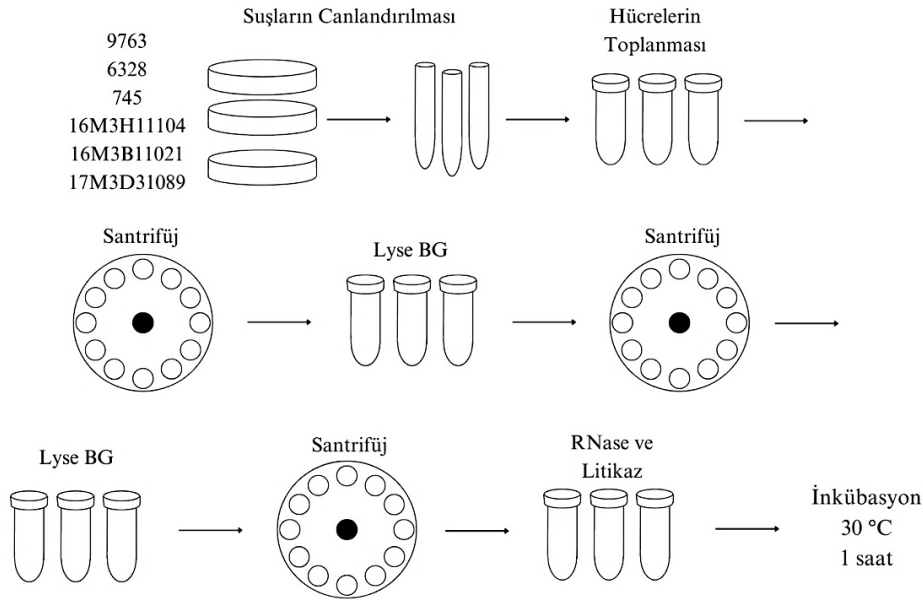
x= Logaritma cinsinden hücre konsantrasyonu (kob/mL)

3.3. *AAD15* genine spesifik qPCR-HRM Analizi

Daha önce farklı sıcaklıklarda gelişim, glukoz/galaktoz kullanımı ve farklı pH'da gelişim testlerine tabi tutulan suşlar arasından seçilen mikroorganizmalara, Aril-Alkol Dehidrogenaz (*AAD15*) genine spesifik qPCR-HRM analizi uygulanmıştır. HRM analizinin gerçekleştirilebilmesi için suşlar öncelikle YPD Broth besiyeri (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: Y1375) kullanılarak canlandırıldıktan sonra, EURX markasına ait GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURX Sp., Gdańsk/Polonya, ürün kodu: E3580) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Lizis aşamasında β -merkaptöetanol (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: M3148) kimyasalı eklenmiştir. Ayrıca hücre duvarlarının parçalanma veriminin artırılması amacıyla litikaz enzimi (≥ 500 U/mL, Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: SAE0098) ve RNA kalıntılarının önüne geçilmesi amacıyla kit içeriğindeki RNase A enzimi kullanılmıştır. Deney boyunca santirfüj (Nüve, Ankara/Türkiye, NF 800) ve mikropilaka santrifüj (Hangzhou Miu Instruments, Zhejiang/Çin, MiniP-2500) ile inkübasyon aşamalarında blok ısıtıcıdan (Major Science Co., Ltd, Taoyuan City/Tayvan, MD-01N) yararlanılmıştır. Ayrıca DNA konsantrasyon ve saflık değerlerinin belirlenmesi için NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts/ABD, ND-2000) cihazı kullanılmıştır. HRM analizinde qPCR karışımlarında PCR Grade Water (BioShop Canada Inc., Ontario/Kanada, ürün kodu:

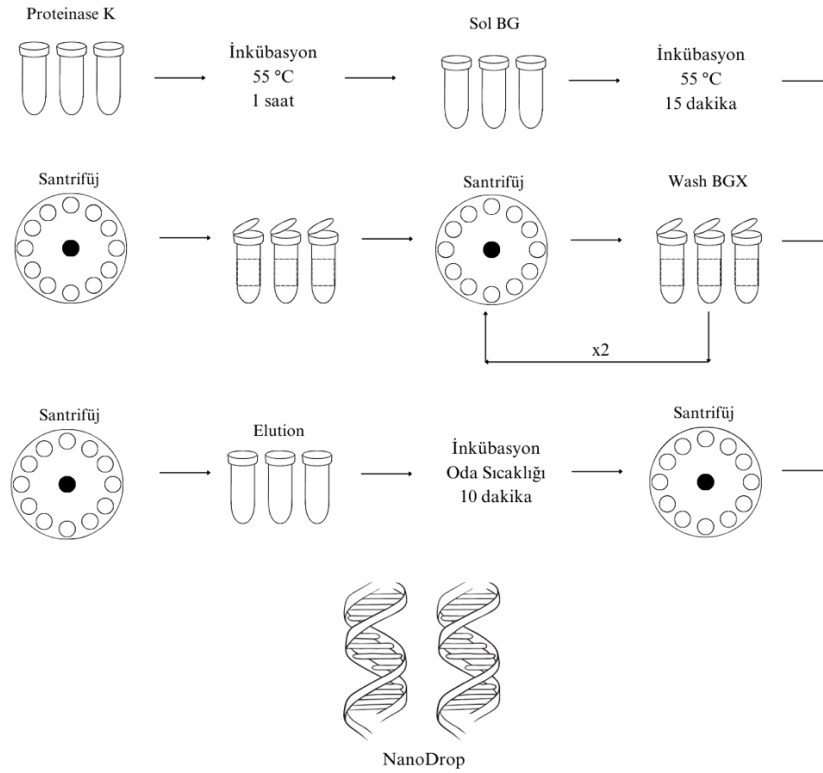
WAT333), 5x HOT FIREPol EvaGreen® HRM Mix (Solis BioDyne, Tartu/Estonya, ürün kodu: 08-31-00001) ve LightCycler 96 qPCR cihazı (Roche Diagnostics, Basel/İsviçre, ürün kodu: 5815916001) ile analizler gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon aşamaları iki basamaklı olarak gerçekleştirilmiştir. Prosedür kapsamında ilk olarak gerçekleştirilen lizis aşamasıdır. Lizis aşamasında izole edilecek DNA'ların ait olduğu mikroorganizmalar sıvı besiyerinde 1 gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından besiyerleri 2 mL hacmindeki mikrosantrifüj tüplerine alınarak 13000 g'de 5 dakikalık santrifüj uygulanmıştır. Bu basamak pellet ağırlıkları 50 mg olana dek tekrarlanmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant tamamen uzaklaştırılmış ve pellete kit içerisindeki, içinde %0,001 (v/v) β -merkaptoetanol bulunan 350 μ L Lyse BG çözeltisi eklenmiştir. 13000 g'de 1 dakikalık santrifüjün ardından tekrar Lyse BG ve β -merkaptoetanol karışımı pellete eklenerek pipetleme yoluyla karıştırma sağlanmıştır. Ardından hücre karışımına 10 μ L (20 mg/mL) litikaz ve 3 μ L (10 mg/mL) RNase A eklenmiştir. Enzim eklenmesinin ardından tüpler iki dakika boyunca vortekslenerek kuru inkübatörde 30°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2. DNA izolasyonu sırasında uygulanan lizis aşamasına ait akış şeması

İkinci aşamada ise, inkübasyon basamağının ardından elde edilen örnekler 20 µL Proteinaz K eklenmiştir. Enzim eklemesinin ardından 15 saniye vorteks işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler kuru inkübatörde 55 °C’de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon periyodu boyunca 10 dakika aralıklarla tüpler çalkalanmıştır. Ardından tüplere kit içeriğinde bulunan 350 µL Sol BG kimyasalı eklenmiş ve 3 saniye vorteks uygulanmıştır. Örnekler 55 °C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 15 saniye daha vorteks uygulanmasının ardından 13000 g’de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. İşlem sonunda elde edilen süpernatant DNA bağlama kolonuna aktarılmıştır. Kolonlar bu işlemten en az 15 dakika öncesinde kit içeriğindeki 30 µL Buffer BG kimyasalı ile ıslatılmıştır. Süpernatant içeren kolonlar 13000 g’de 1 dakikalık santrifüjün ardından 450 µL Wash BGX kimyasalı eklenmiş ve tekrar santrifüjlenmiştir. Aynı işlem iki kez tekrarlanmış ve herhangi bir kimyasal ilavesi yapılmadan boş şekilde santrifüjlenmiştir. Ardından kolonlar steril 2 mL’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Kolonlara bağlanan DNA’ların elde edilebilmesi için 50 µL Elution Buffer kullanılarak 10 dakikalık inkübasyon sonrasında aynı koşullarda santrifüj işleminin ardından DNA izolasyonu tamamlanmıştır.

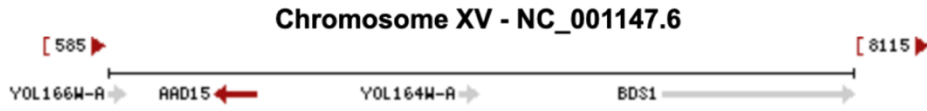


Şekil 3.3. DNA izolasyonu aşamasına ait akış şeması

Elde edilen DNA örnekleri -20 °C’de depolanmıştır. Ayrıca nükleik asit konsantrasyonu (ng/μL) ve saflık değerleri 260 ve 280 nm’de, faktör birimi 50 olacak şekilde ölçülmüştür. Deney boyunca *S. cerevisiae* kontrol olarak 9763 ve 6328 kullanılırken *S. boulardii* kontrol olarak ise 745 numaralı suş kullanılmıştır. DNA izolasyonuna ait tüm örnekler üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında seçilerek kullanılan HUF kodlu *S. cerevisiae* suşlarına uygulanacak olan HRM analizinde kullanılmak üzere önceki çalışmalarda *S. boulardii* genomunda eksik olduğu belirtilen *AAD15* genine spesifik primerler tasarlanmıştır [78].

Bu amaçla, öncelikle nükleotid sekansları NCBI [106] veritabanından elde edilmiştir. İlgili gene ait özellikler Şekil 3.4’te yer almaktadır. Primerler, Primer3web 4.1.0 kullanılarak ampikon uzunluklarının 100 ila 200 bp arasında olmasına dikkat edilerek tasarlanmıştır. Primerlere ait özelliklerin tamamı Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. *AAD15* geninin genetik içeriği [106]

Çizelge 3.2. HRM çalışması için tasarlanan *AAD15* primerine ait özellikler

Sistematik Adı	Gen	Gen ID	Fonksiyon	Primerler	Ampikon Uzunluğu (bp*)	Tm* (°C)
YOL165C	<i>AAD15</i>	853999	Aril Alkol Dehidrogenaz	F:ggatgtcatgggaggtggaa R:actcagtgccatgttcctca	150	59.08 58.94

*bp: Baz çifti, Tm: Erime sıcaklığı, F: forward (ileri) ve R: reverse (geri) primerleri temsil etmektedir.

Kullanılan HRM Mix'in içeriğinde DNA polimeraz, tampon, MgCl₂, dNTP'ler (Nükleozid Trifosfat), EvaGreen boya ve Bovine Serum Albumin bulunmaktadır. Analizler için *AAD15* ileri ve geri primer konsantrasyonları 100 nM; HRM mix hacmi 4 µL, PCR Grade Water hacmi 11,6 µL, DNA konsantrasyonları 2 ng/µL olacak şekilde ayarlanmıştır. DNA örnekleri haricindeki tüm bileşenler mikrosantrifüj tüplerine koyularak pipetleme yoluyla karıştırılmıştır. Ardından hazırlanan karışımdan örnek başına 16 µL alınarak 96 kuyulu PCR plakalarına eklenmiştir. Toplam deney hacmi 20 µL'dir. Her bir kuyuya DNA örnekleri eklendikten sonra plakalar, herhangi bir köpük oluşumuna karşı santrifüjlenmiştir. Son aşamada plakalar qPCR cihazı kullanılarak HRM analizine tabi tutulmuştur. Analiz için kullanılan parametreler Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. qPCR-HRM analizinde kullanılan parametreler

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C	15 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	
Bağlanma	60-65 °C	20 saniye	40
Uzama	72 °C	20 saniye	
HRM	65- 95 °C		1
Soğutma	4 °C	Belirsiz	1

qPCR-HRM analizi sonucunda elde edilen fark ve erime eğrilerinin yanısıra erime sıcaklıkları (T_m) ve döngü sayıları (C_q) da dikkate alınarak, *S. boulardii* suşlarının *S. cerevisiae* suşlarından ayrımı sağlanmıştır.

3.4. Soya Unu Bazlı Hamur Fermantasyonu ve Ürünlerin Elde Edilmesi

Ürün geliştirme aşamasında gıdaya inoküle edilecek seçilen suşlar YPD Broth besiyeri (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: Y1375) kullanılarak canlandırılmıştır. Hücre sayısının belirlenmesi amacıyla spektrofotometrik ölçümler için tek kullanımlık küvetler (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 098.02.002) ile Genesys 10-S UV-VIS Spektrofotometre Genesys 10S UV-VIS Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts/ABD, ürün kodu: 840-208100) cihazı kullanılmıştır. Hücrelerin hasadı ve ykanması için %0,9 (w/v) oranında saf su ile hazırlanan NaCl (Sodyum Klorür) (Merck KGaA, Darmstadt/Germany, ürün kodu:

106404) kullanılarak santrifüjlenmiştir (Nüve, Ankara/Türkiye, NF 800). Hazırlanan karışım ve ürünler fermantasyon süresince etüvde (Nüve, Ankara/Türkiye, EN400) muhafaza edilmiştir. Ürünlerin pişirilmesi için ise ev tipi fırın (Kumtel, İstanbul/Türkiye) kullanılmıştır.

Fermantasyon takibinde pH ölçümleri için el pH metresi (Adwa Instrument, Szeged/Bulgaristan, ürün kodu: AD14) ve mikroorganizma sayımı için tek kullanımlık, steril, içerisinde YPD Agar bulunacak şekilde hazırlanan petrilerde (ISOLAB GmbH, Eschau/ Almanya, ürün kodu: 081.02.161) sayım yapılmıştır. Her örnek için 10^{10} 'a kadar dilüsyon hazırlanmış ve dilüsyon için hazırlanan serum fizyolojik 121°C 'de 15 dakika sterilize edilerek kullanılmıştır.

3.4.1. Formülasyon ve Son Ürün Eldesi

Bu çalışmada fırıncılık ürünleri içinde yer alan kurabiye ve kraker formülasyonlarında kullanılmak üzere ticari soya unu temin edilmiştir. Kullanılan ticari soya ununa ait enerji ve besin öğeleri özellikleri Çizelge 3.4'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.4. Kullanılan soya ununa ait enerji ve besin öğeleri [107].

Enerji ve Besin Öğeleri (100 g için)	
Bileşen	Miktar
Enerji (kcal)	475
Yağ (g)	20,5
Karbonhidrat (g)	32
Protein (g)	36
Lif (g)	9,6
Tuz (g)	0.1

Bu çalışmada kraker ve kurabiyelerin formülasyonu Han ve arkadaşları (2010) temel alınarak modifiye edilmiştir [108]. Kullanılan formülasyonlar Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

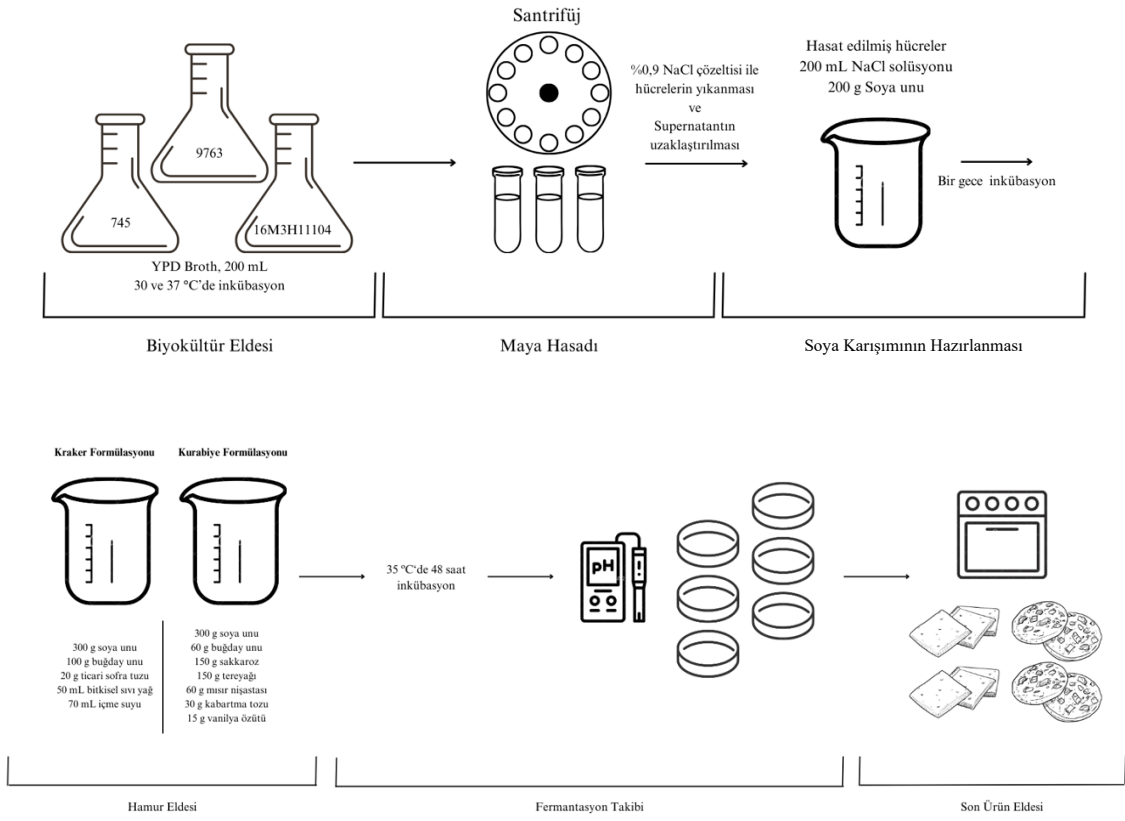
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılmak üzere optimize edilen kraker ve kurabiye formülasyonları

Kraker Formülasyonu	Kurabiye Formülasyonu
300 g soya unu	300 g soya unu
100 g buğday unu	60 g buğday unu
20 g ticari sofr tuzu	150 g sakkaroz
50 mL bitkisel sıvı yağ	150 g tereyağı
70 mL içme suyu	60 g mısır nişastası
	30 g kabartma tozu
	15 g vanilya özütü

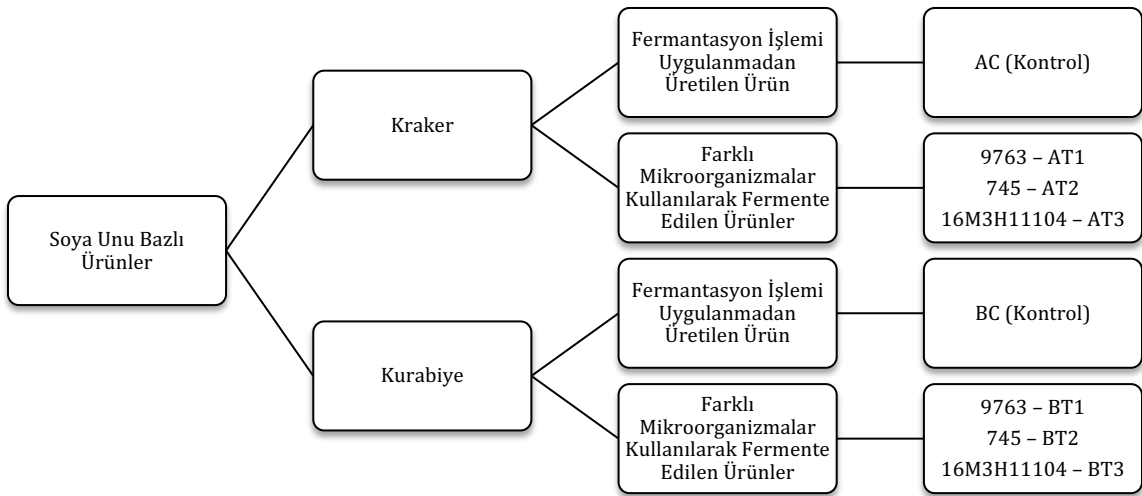
Formülasyonlara kültür inokülasyonu gerçekleştirilebilmesi amacıyla 9763, 745 ve HUF16M3H11104 numaralı suşlar, stok petrilere 250 mL sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. 745 ve HUF16M3H11104 kodlu suşlar 37 °C’de, 9763 kodlu suş ise 30 °C’de 600 nm’deki absorbans değerleri $1.0 \pm 0.005 A^{90}$ ’a ulaşana dek inkübe edilmiştir [109]. İnkübasyonun ardından hücre hasadı amacıyla tüplere 9000 g’de 10 dakika santrifüj uygulanmıştır. Besiyeri uzaklaştırılarak pellet elde edilmiştir. Ardından pelletler NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır [110]. Hücre çözeltileri 1:1 oranında ticari soya unu ile karıştırılarak soya karışımı elde edilmiştir. Elde edilen karışımlar, ürün formülasyonunda kullanılacak toplam ürünlerin %5’ini oluşturmuştur. Hazırlanan hamurlar için fermantasyon normu 35 °C’de 48 saat olarak uygulanmıştır. Ardından elde edilen hamurlar parçalara ayrılarak 180 °C fırında 8 dakika boyunca ısı işleme tabi tutulmuştur.

Hem kullanılan farklı mikroorganizmaların hem de fermantasyon prosesinin son ürünler üzerindeki etkilerini anlayabilmek amacıyla, fermantasyon işlemine tabi tutulmayan kontrol grubu ve farklı mikroorganizmalar kullanılarak fermantasyona tabi tutulan örnekler olmak üzere iki farklı gruba çalışılmıştır.

Fermantasyon öncesi, formülasyon ve fermantasyon takibi sırasında izlenen işlem basamakları Şekil 3.5’te ve çalışmanın gerçekleştirilmesi sırasında kullanılan isimlendirme stratejisi Şekil 3.6’da gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Fermantasyon öncesi, formülasyon ve fermantasyon takibi sırasında izlenen işlem basamakları



Şekil 3.6. Soya unu bazlı ürünlere ait isimlendirme stratejisi

Tüm işlemler sonucunda elde edilen son ürünlere verilen kodlar Çizelge 3.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Son ürünlere ait isimlendirme ve ürün kodları

Ürünler ve Kodları			
9763 kullanılarak üretilen soya krakeri	AT1a*	9763 kullanılarak üretilen soya kurabiyesi	BT1a
	AT1b		BT1b
	AT1c		BT1c
745 kullanılarak üretilen soya krakeri	AT2a	745 kullanılarak üretilen soya kurabiyesi	BT2a
	AT2b		BT2b
	AT2c		BT2c
HUF16M3H11104 kullanılarak üretilen soya krakeri	AT3a	HUF16M3H11104 kullanılarak üretilen soya kurabiyesi	BT3a
	AT3b		BT3b
	AT3c		BT3c
Mikroorganizma kullanılmadan üretilen kontrol soya krakeri	ACa	Mikroorganizma kullanılmadan üretilen kontrol soya kurabiyesi	BCa
	ACb		BCb
	ACc		BCc

*Ürün kodunda yer alan küçük harfler teknik tekrarları temsil etmektedir.

Son ürün eldesinin ardından kraker ve kurabiye ürünlerine kimyasal analizlerin yanısıra protein analizleri, yağ asidi kompozisyonu tayini, birincil metabolitlerin belirlenmesi, antioksidan aktivite ve toplam fenolik içeriğin belirlenmesinin ardından renk ve tekstür analizleri uygulanmıştır. Analizlerin gerçekleştirilmesi süresince, kraker ve kurabiye örnekleri vakumlu poşetlerde -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.4.2. Fermantasyon Süreci ve Fermantasyon Takibi

Ürün formülasyonu ve hamurların hazırlanmasının ardından 35 °C’de 48 saatlik fermantasyona bırakılmıştır. Süreç boyunca 0, 24 ve 48. saatlerde kraker ve kurabiye hamurlarının tamamından örnekler alınmıştır. Alınan örneklerde pH analizi ve yüzeye yayma yöntemi ile mikroorganizma sayımları gerçekleştirilmiştir [109,111].

3.5. Kimyasal Analizler

Kimyasal analizlerin tüm aşamalarında kullanılmak üzere son ürünler ticari öğütücü kullanılarak (Waring Commercial, Stamford/ABD, ürün kodu: B011BG) homojenize edilmiştir.

Nem ve kuru madde belirlenmesi için kurutma süresince etüv (Binder GmbH, Tuttlingen/Almanya, ED115), hassas tartı (Radwag, Radom/Polonya, WTB 200) ve desikatör kullanılmıştır. Kül analizi için ise yakma fırını (Protherm, Ankara/Türkiye, PLF 110/8) ve porselen krozeler (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 038.14.H30) kullanılmıştır.

Protein izolasyonunda %3,5 NaCl (Sodyum Klorür, Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: S3014) içerisinde 0,1 M NaOH (Sodyum Hidroksit, Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 106498) bulunduran solvent hazırlanmıştır. Bu aşamada 15 mL hacimli santrifüj tüpleri (StarLab GmbH, Hamburg/Almanya, ürün kodu: E1415-0200), inkübasyon süresince ise etüv (Nüve, Ankara/Türkiye, EN400) ve santrifüj (Nüve, Ankara/Türkiye, NF 800) kullanılmıştır.

Protein miktarı tayininde Bradford yönteminin uygulanması sırasında, standart eğri oluşturulması için 3 mg/100 mL konsantrasyonunda stok BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: A2153) hazırlanmıştır. Bradford ajanı (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: B6916) Whatman 1 filtreden (Whatman International Ltd., Buckinghamshire/Birleşik Krallık, ürün kodu: 1001 125) geçirilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler 96 kuyulu steril hücre kültürü petripleri (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster/Avusturya, ürün kodu: 650160) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi için örneklerin hazırlanma aşamasında hassas tartı (Radwag, Radom/Polonya, WTB 200), 15 mL hacimli santrifüj tüpleri (StarLab GmbH, Hamburg/Almanya, ürün kodu: E1415-0200), çalkalayıcı (N-BIOTEK, Gyeonggi-do, Güney Kore, ürün kodu: NB-101MC), ultrasonik banyo (ISOLAB GmbH,

Eschau/Almanya, ürün kodu: 621.05.001) ve santrifüj (Nüve, Ankara/Türkiye, NF 800) kullanılmıştır. Bu süreçte kullanılan kimyasallar ise n-hekzan (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 930027250), KOH (Potasyum Hidroksit, Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: P1767) ve metanol (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 676780)'dür. Ayrıca standart olarak cis/trans F.A.M.E Column Performance Mix (Supelco Inc., Darmstadt/Almanya, ürün kodu: 40495) ürününden yararlanılmıştır. Ayrıca amber renkli N8-1,5 mL hacimli vialler ve vial kapağı (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 095.00.002) kullanılmıştır. GC-FID sisteminde (Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts/ABD, TR-WAX 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) kolonu kullanılmıştır.

Birincil metabolit analizi için ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 676780) kullanılmıştır. Bunun dışında kromatografi analizine uygun sudan (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 983.017.2501) yararlanılmıştır. Ayrıca santrifüj (SciQuip Ltd., Shropshire/Birleşik Krallık, ürün kodu: Sigma 3-18k), ekstraksiyon veriminin artırılması amacıyla ultrasonik banyo (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 621.05.001) ve çalkalayıcı (N-BIOTEK, Gyeonggi-do/Güney Kore, ürün kodu: NB-101MC) kullanılmıştır. İşlemler 2 mL hacimli santrifüj tüplerinde (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 078.03.021) gerçekleştirilmiştir. Ürünler ileri aşamalarda piridin (Sigma Aldrich, Darmstadt/Almanya, ürün kodu: 33553) ve metoksiamin hidroklorür (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 226904) eklenmiştir. Derivatizasyon işlemi için MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) (Supelco Inc.; Darmstadt/Almanya, ürün kodu: 69479) kullanılmıştır. Örneklerin analizi için ise 1,5 mL hacimli amber renkli GC viallerinden (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 095.00.002) yararlanılmıştır.

GC-MS analizleri Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK)'nde bulunan Agilent 7890B GC/ 5977A Series MSD Systems cihazında gerçekleştirilmiştir. Metabolitlerin ayrımı için Agilent 19091S-433: 1077.39745 HP-5 ms kolonu, 30 m x 250 µm x 0.25 µm kolonu kullanılmıştır.

Ürünlerin antioksidan aktivitesinin belirlenebilmesi için ABTS (2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonic Acid, Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: ES004), potasyum persülfat (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 216224), trolox (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 238813), metanol (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 676780), etanol (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 920.026.2500) kimyasallarının yanı sıra 2 mL hacimli santrifüj tüpleri (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 078.03.021) ve 15 mL hacimli santrifüj tüpleri (StarLab GmbH, Hamburg/Almanya, ürün kodu: E1415-0200) kullanılmıştır.

Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi sırasında, örneklerin tartımı sırasında hassas tartı (Radwag, Radom/Polonya, WTB 200) kullanılmıştır. Ayrıca analizler boyunca örnekler 15 mL hacimli santrifüj tüpleri (StarLab GmbH, Hamburg/Almanya, ürün kodu: E1415-0200) ve 2 mL hacimli santrifüj tüplerinde (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 078.03.021) tutulmuştur. Deney süresince kullanılan kimyasallar NaOH (Sodyum Hidroksit, Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 106498), HCl (Hidroklorik Asit, Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 30721), metanol (Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri/ABD, ürün kodu: 676780), Etil eter (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany, ürün kodu: 268925-50G) ve etil asetat (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany, ürün kodu: 319902-1L) kullanılmıştır. Standart eğri oluşturulmasında ve örneklerin toplam fenolik içeriğinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi için ise Folin-Ciocalteu ajanı (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, ürün kodu: F9252-100ML), Na₂CO₃ (Sodyum Karbonat, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, ürün kodu: 223530-500G) ve gallik asit (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 925.021.0100) kullanılmıştır. Bu süreçte ölçümler tek kullanımlık spektrofotometrik küvetlerde (ISOLAB GmbH, Eschau/Almanya, ürün kodu: 098.02.002), Genesys 10S UV-VIS Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Waltham santrifüj (Nüve, Ankara/Türkiye, NF 800) yapılmış ve pH ölçümleri için el pHmetresi (Adwa Instrument, Szeged/Bulgaristan, ürün kodu: AD14) kullanılmıştır. İnkübasyonlar ise çalkalamalı inkübatörde (Bioevopeak, Shandong/Çin, ürün kodu: ICB-S100B) gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Nem ve Kuru Madde Analizi

Nem ve toplam kuru madde miktarlarının belirlenmesi amacıyla tek adımlı, Uluslararası Amerikan Hububat Kimyacıları Derneği'ne ait 44-15A sayılı metot kullanılmıştır. Hazırlık aşamasında deneyde kullanılacak kurutma kapları ve kapakları bir gece önce 130 °C'ye ayarlanmış etüvde, kapakları kapalı olacak şekilde kurutulmuştur. Ardından kaplar desikatöre alınarak oda sıcaklığına getirilip tartılmıştır (m_{dara}). Daha önce homojenize edilerek toz haline getirilmiş gıda örnekleri 3 g olacak şekilde kurutma kaplarına alınmıştır. Örneklerin ilk ağırlığını not etmek üzere, ürün içeren kaplar kapakları kapalı olarak tartılmıştır (m_1). Kurutma işlemine başlamak için, kaplar kapakları açık olacak şekilde etüve yerleştirilmiştir. Kurutma işlemine iki saat boyunca devam edilmiş ve ardından kapların kapakları kapatılmıştır. Kapalı şekilde olan kapların tamamı desikatöre koyularak oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Oda sıcaklığındaki örneklerin tamamı tartılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir. Sabit tartım alınıncaya kadar tartıma devam edilmiştir (m_2). Nem ve kuru madde yüzdelerinin hesaplanması amacıyla gerçekleştirilen deneylerde her örnek için üçer paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Gerçekleştirilen tüm işlemler sonucunda %nem ve kuru madde oranları aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%Nem = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_{\text{dara}}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\%Toplam Kuru Madde = 100 - \%Nem \quad (3.3)$$

m_{dara} : Kurutulmuş, boş kurutma kabı ve kapağın toplam ağırlığı (g),

m_1 : Analiz edilen örnek, kurutma kabı ve kapağının kurutma işlemi öncesindeki toplam ağırlığı (g),

m_2 : Analiz edilen örnek, kurutma kabı ve kapağının kurutma işlemi sonrasındaki toplam ağırlığı (g).

3.5.2. Kül Analizi

Son ürünlerdeki toplam kül miktarının belirlenebilmesi için Harris ve arkadaşlarına (2017) ait kül analizi protokolü kullanılmıştır. Bu amaçla daha önce kurutma işlemleri uygulanan gıda örnekleri analiz edilmiştir. Kurutulan ürünlerin içeriğinde bulunan %kül oranlarının hesaplanabilmesi için öncelikle 2N HCl kullanılarak bir gece önceden yıkanan ve kurutulan krozeler 24 saat boyunca kurutulmuştur. Kullanım için bir gece boyunca desikatöre kaldırılmıştır. Kuruyan krozeler tartılmıştır (m_{dara}). Kroze içerisine 2 g kurutulmuş örnek koyularak tartım yapıldıktan sonra (m_1) örnekler beyaz renkli kül durumuna gelinceye kadar 2 saat boyunca yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda içerisinde yakılmış örneklerin bulunduğu krozeler desikatöre kaldırılıp soğutulmuştur. Soğutulan örnekler tartılarak (m_2) sonuçlar kaydedilmiştir. Bu analizde tüm örnekler iki paralel olacak şekilde işlemler gerçekleştirilmiştir. Yüzde kül oranının hesaplanması işleminde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\%K\ddot{u}l = \frac{m_2 - m_{\text{dara}}}{m_1 - m_{\text{dara}}} \times 100 \quad (3.4)$$

m_{dara} : Kurutulmuş krozelerin ağırlığı (g),

m_1 : Analiz edilen örnek ve krozelerin yakma işlemi öncesindeki toplam ağırlığı (g),

m_2 : Analiz edilen örnek ve krozelerin yakma işlemi sonrasındaki toplam ağırlığı (g).

3.5.3. Protein Analizi

3.5.3.1. Protein Ekstraksiyonu

Örnek içeriğinde bulunan protein miktarının belirlenebilmesi amacıyla öncelikle tuz alkali metodu kullanılarak protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir [112]. Bu doğrultuda öğütülmüş kraker ve kurabiye örneklerinin her birinden 0,2 g tartılarak 12 mL saf su ile karıştırılmış ve homojenize edilmiştir. Ardından 24 saat boyunca 60° C’de inkübe edilen örneklere 4000 g’de 15 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pellete 12 mL solvent eklenerek çözündürülmüştür. Tekrar 24 saat boyunca 60° C’de inkübe edilen örneklere 4000 g’de 15 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. Son olarak elde edilen süpernatant Bradford tayini uygulanmak üzere ayrılmıştır.

3.5.3.2. Bradford Tayini

Spesifik formülasyonlarla geliştirilen gıda örneklerinde son ürün eldesinin ardından, protein miktarında meydana gelen farklılıkların araştırılabilmesi amacıyla ürünlere temelinde Bradford Tayini [113] yatan ve mikropalakalar kullanılarak daha az hacimde ölçüm gerçekleştirilebilen bir protein tayini uygulanmıştır [114]. Bu amaçla öncelikle bilinmeyen örneklerin protein miktarının tespit edilebilmesi için standart eğri oluşturulmuştur. Standart eğri oluşturulurken 0 ila 3,0 mg/mL konsantrasyonlarında BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 5 µL alınarak 96 kuyulu steril hücre kültürü petrilere eklenmiştir. Kuyuların her birine 250 µL Bradford ajanı eklenerek renk değişimi görülmesi için 5 dakika boyunca inkübasyon sağlanmıştır. Tüm örnekler 595 nm’de okutularak standart eğri oluşturulmuştur. Blank olarak içerisinde 5 µL saf su ve 250 µL Bradford ajanı bulunan çözelti kullanılmıştır. Tüm denemeler üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. BSA çözeltisi konsantrasyonları ve hacimlerine Çizelge 3.7’de yer verilmiştir.

Çizelge 3.7. Standart eğri oluşturulması için kullanılan BSA çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri

Son BSA Konsantrasyonu (mg/mL)	BSA Reaksiyon Hacmi (µL)	Saf Su Reaksiyon Hacmi (µL)
0,0	0	20
0,3	2	18
0,6	4	16
0,9	6	14
1,2	8	12
1,5	10	10
1,8	12	8
2,1	14	6
2,4	16	4
2,7	18	2
3,0	20	0

Standart eğri eldesinin ardından örnekler 96 kuyulu steril hücre kültürü petrilere kullanılarak, her örnek üç paralel olacak şekilde daha önce protein ekstraksiyonu ile elde edilen 5’er µL örneğe 250 µL Bradford ajanı eklendikten sonra 595 nm’de okutulmuştur. Blank olarak içerisinde 5 µL solvent ve 250 µL Bradford ajanı bulunan çözelti kullanılmıştır. Absorbans sonuçları standart eğri denklemine yerleştirilerek örneklerin içerdiği toplam protein yüzdeleri elde edilmiştir.

3.5.4. Yağ Asidi Kompozisyonu Tayini

Fermantasyon süresince, yağ asidi kompozisyonunda meydana gelen değişimlerin araştırılması amacıyla Gaz Kromatografisi ve Alev İyonizasyon Dedektörü (GC-FID) kullanılmıştır. Bu amaçla ekstraksiyon işlemini takiben GC-FID cihazında TR – WAX – 0.25 µm, 30m x 0.25mm ID kolonu kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon aşaması için örnekler öncelikle öğütülerek homojenize edilmiştir. 15 mL hacimli deney tüplerine 0,5 g örnek alınarak 2,5 mL n-hekzan ile vortekslenmiştir. Çözdürülen örnekler 3 saat boyunca 250 rpm’de oda sıcaklığındaki çalkalayıcıya bırakılmıştır. Ardından vortekslenip 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda muamele edilmiştir. Tekrar vortekslenen örnekler oda sıcaklığında 10000g’de 15 dk santrifüjlenmiştir. Yaklaşık 2 mL supernatant yeni birer tüpe alındıktan sonra yağ asidi metil esterlerinin (FAME) elde edilmesi amacıyla örnekler metanol içerisinde hazırlanmış 2N KOH’tan 200 uL eklenmiştir. Tekrar 2 dakikalık çalkalama ve vorteksin ardından sabunlaşan kısmın çöktürülmesi için tüpler oda sıcaklığında 8000 rpm’de 15 dk santrifüjlenmiştir [115]. Elde edilen süpernatanttan 1 mL alınarak 1.5 mL amber renkli GC viallerine aktarılmıştır. Analiz süresince standart olarak Supelco markasına ait F.A.M.E. Column Performance Mix kullanılmıştır. Süreç boyunca tüm örnekler üç paralel olacak şekilde analiz edilmiştir. Kullanılan analiz parametreleri Çizelge 3.8’de ayrıntılı şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. GC-FID sisteminde kullanılan analiz parametreleri

Bölüm ve Gradient	Sıcaklık (°C)	Süre/Gradient
Giriş	250	-
Dedektör	280	-
İlk Sıcaklık	50	1 dakika
İkinci Sıcaklık	200	6 dakika (25 °C/dakika)
Üçüncü Sıcaklık	230	10 dakika (3 °C/dakika)
Sabit Sıcaklık	230	18 dakika

Vialler GC-FID cihazında otomatik numuneleme cihazı yardımıyla okutulmuştur. Kullanılan taşıyıcı gaz hidrojendir (40 mL/dk). Diğer dedektör gazları ise kuru hava (450 mL/dk) ve helyumdur (30 mL/dk).

3.5.5. Son Üründe Birincil Metabolitlerin Belirlenmesi

Belirlenen formülasyonlarla geliştirilen gıda örneklerinde gerçekleştirilen fermantasyon süresince, ortaya çıkabilecek farklı birincil metabolitlerin araştırılması amacıyla Gaz Kromatografisi ve Kütle Spektrofotometresi (GC-MS) kullanılmıştır. Birincil metabolitlerin ekstraksiyonu ve derivatizasyonu için Zhang ve ark. (2020) ile Hançerlioğulları ve ark. (2023) ait protokoller izlenmiştir [116,117].

Bu amaçla 100 mg önceden öğütülmüş örnekler santrifüj tüplerine alındıktan sonra ekstraksiyon çözücüsü olan %100 metanolden 800 µl ilave edilmiştir. Ardından kromatografi analizine uygun 100 µL su eklenmiştir. Ekstraksiyon veriminin artırılması amacıyla ultrasonik banyoda 60 dakika boyunca 35 °C’de işlem gören örnekler, her 10 dakikada bir vorteks ile çalkalanmıştır. Elde edilen karışım 10000g ‘de 15 dakika 4 °C’lik santrifüjün ardından supernatantın tamamı yeni bir tüpe aktarılmıştır. Kalan pellet üzerine 800 µL %100 metanol ve 200 µL su eklendikten sonra tüpler 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. Daha önce gerçekleştirilen ultrasonifikasyon işlemi aynı şartlarda tekrar edilmiştir. Daha sonra 10000g ‘de 15 dakika 4 °C’lik santrifüjün ardından elde edilen 1 mL sıvı supernatant, GC vialine aktarılarak nitrojen gazı altında kurutulmuştur. Kalan kuru ekstrakta derivatizasyon uygulanması amacıyla örnekler, 200 µL piridin içerisinde çözünen metoksiamin hidroklorür (20 mg/mL) ile çözündürülmüş ve 37 °C’de 90 dakika boyunca 400 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan hemen sonra 200 µL N-metil-N-(trimetilsilil) trifloroasetamid (MSTFA) ilave edilmiş, 37 °C’de 90 dakika boyunca 400 rpm’de çalkalanarak reaksiyona sokulmuştur. Türevlendirme sonrasında elde edilen örnekler GC-MS analizleri yapılmadan önce -20 °C’de saklanmıştır.

GC-MS analizleri Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK)’nde bulunan Agilent 7890B GC/ 5977A Series MSD Systems cihazında gerçekleştirilmiştir. Metabolitlerin ayrımı için Agilent 19091S-433: 1077.39745 HP-5 ms, 30 m x 250 µm x 0.25 µm kolonu kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 0.5 µl ve split oranı 50:1 olarak ayarlanmıştır. Taşıyıcı gaz olan helyum ile 1 mL/dk akış hızında örnekler sisteme enjekte edilmiştir. Çözücü gecikmesi (solvent delay) 2 dk olup; fırın sıcaklığı başlangıçta 80 °C’de 1 dk ayarlanmış ve 5°C/dk sıcaklık artış hızıyla 290 °C’ye çıktıktan sonra 7 dk 290 °C’de kalacak şekilde programlanmıştır. Kütle aralığı

0-600 (amu) değerleri arasında ayarlanmıştır. Süreç boyunca tüm örnekler üç paralel olacak şekilde analiz edilmiştir. Kullanılan analiz parametreleri izelge 3.9’da ayrıntılı şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. GC-MS sisteminde kullanılan analiz parametreleri

Bölüm ve Gradient	Sıcaklık (°C)	Süre/Gradient
Enjeksiyon ncesi Sistem	80	6 dakika
Enjeksiyon	280	-
Ara Yüzey	250	-
İyon Kaynağı	230	-
İlk Sıcaklık	80	2 dakika
İkinci Sıcaklık	320	24 dakika (10 °C/dakika)
Sabit Sıcaklık	320	6 dakika

Elde edilen kromatogramlar ve spektrumlar, Agilent Enhanced Data Analysis programında RTE Integrator aracı seçilerek değerlendirilmiştir. Metabolitlerin tanımlanmasında Wiley W10N14 (John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, ABD) kütüphanesi kullanılmıştır.

3.5.6. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

rnlerin antioksidan aktivitesinin belirlenebilmesi amacıyla ABTS (2,2’-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) metodu kullanılmıştır [118]. Bu amaçla öncelikle 7 mmol/L ABTS ve 2,45 mmol/L potasyum persülfat içeren ve 1 gece boyunca karanlıkta bekletilmiş, ardından 1:1 etanol su (v/v) eklenmiş ABTS solüsyonu hazırlanmıştır. Otuz dakikalık İnkübasyonun ardından çözelti, 734 nm’de absorbans değeri $0,7 \pm 0,02 A^\circ$ olacak şekilde ayarlanmıştır.

Ölçümlerin Trolox cinsinden verilebilmesi için 0 ila 600 ppm olacak şekilde metanol içerisinde trolox zelteleri hazırlanmıştır. Her zeltiden 100 μ L alınarak 10 mL ABTS zeltisiyle karıştırılmıştır. alkalama işlemi 350 rpm’de 28 dakika olarak ayarlanmış ve tüm trolox zeltelerinin 2 dakika içerisinde 734 nm’de spektrofotometrik ölçümleri

alınarak kaydedilmiştir. Verilere göre elde edilen trolox standart çözeltisi (3.5) numaralı denklemde verilmiştir:

$$y = -0.0005x + 0.7094 \quad (3.5)$$

(y= 734 nm’de ölçülen absorbans değeri, x= µM Troloks)

Son aşamada örneklerin antioksidan aktivitelerinin belirlenebilmesi adına 50 mL hacimli mikrosantrifüj tüplerine alınan 10 mg homojenize örneğin üzerine 20 mL ABTS çözeltisi eklenerek 350 rpm’de 25 dakika boyunca çalkalamaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığında, 6080 g’de 2 dakikalık santrifüjün ardından örnekler 734 nm’de okutularak örneklerin antioksidan aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Deney boyunca iki biyolojik ve iki teknik tekrar şeklinde çalışılmıştır.

3.5.7. Toplam Fenolik İçeriğin Belirlenmesi

Son üründe toplam fenolik içeriğin belirlenebilmesi için denemeler üç aşamada gerçekleştirilmiştir [118,119].

İlk aşama olan ekstraksiyon aşamasında 0,5 g örnek tartılarak üzerine 2 mL ultra saf su eklenerek vortekslenmiştir. Örnek-su karışımı üzerine 2 mL 4N NaOH eklenerek karanlıkta ve oda sıcaklığında, 300 rpm’de en az 3 saat çalkalamaya bırakılmıştır. Çalkalama boyunca örnekler her 30 dakikada bir vortekslenmiştir. Önceden hazırlanan 6N HCl kullanılarak örneklerin pH’ları 2.0 ± 0.25 olacak şekilde ayarlanmıştır. pH’sı ayarlanan örnekler, üzerine 2’şer mL etil eter:etil asetat (1:1) karışımı eklendikten sonra 300 rpm’de 10 dakika çalkalanmıştır. Ardından 8000 rpm’de 4 dakika santrifüj uygulanmıştır. Etil eter:etil asetat karışımı eklenmesinden santrifüj işlemine kadar gerçekleştirilen adımlar toplam dört kez tekrarlanmış, bu sayede toplanan supernatantlar ayrı bir tüpte toplanarak vortekslenmiştir. Ayrı bir tüpe yaklaşık 6 mL supernatant alınarak azot gazı altında 35 °C’de kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurutulan örneklerin üzerine 1 mL su içinde çözünen %30’luk metanol çözeltisi eklenip

vortekslendikten sonra ileriki aşamalarda kullanılmak üzere hazırlanan ekstraktlar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Ürünlerin içeriğinde bulunan fenolik bileşenler gallik asit cinsinden hesaplanmıştır. Bu amaçla gerekli okumalardan önce gallik asit cinsinden standart eğri oluşturulmuştur. Standart eğri için, toz halde bulunan gallik asidin su içinde çözünen %30’luk metanol ile 1000 ppm’lik stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözelti kullanılarak 0-60 ppm arasında çözeltiler elde edilmiştir. Hazırlanan çözeltilerden 200 µl alınıp üzerine 800 µl 0.2N Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Beş dakika oda sıcaklığında inkübe edilen örneklerle 800 µl doymuş Na₂CO₃ karıştırıldıktan sonra, mavi renk oluşuncaya dek yaklaşık 60 dakika 300 rpm’de çalkalama yapılmıştır. Altı dakikalık 6100 g’de santrifüjden sonra toplanan supernatantlar, 760 nm’de ölçülerek değerleri kaydedilmiştir. Konsantrasyon-Absorbans grafiği çizdirilerek standart eğri elde edilmiş ve bu sayede örneklerin gallik asit cinsinden toplam fenolik içerikleri belirlenebilmiştir. Elde edilen eğri denklemi aşağıdaki gibidir:

$$y = 0,011x + 0,144 \quad (3.6)$$

y= 760 nm’de ölçülen absorbans değeri, x= µM Gallik asit

Fenolik içeriğin belirlenmesinin son aşaması, daha önce ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş örneklerin ve gallik asit kullanılarak elde edilen eğri denkleminin yardımıyla, Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak analiz edilmesidir. Bir gece önce -20 °C’de saklanan örneklerden santrifüj tüplerinin içerisine 30 µl alındıktan sonra üzeri su içinde çözünen %30’luk metanol çözeltisi ile 200 µl’ye tamamlanmıştır. Örneklerin üzerine 800 µL, 0.2 N Folin-Ciocalteu reaktifi eklendikten sonra 800 µL doymuş Na₂CO₃ ilave edilmiştir. Altmış dakika 300 rpm’de çalkalamayı takiben 6100 g’de 6 dakika santrifüj uygulanmıştır. Örneklerin absorbansı 760 nm’de ölçülerek değerleri kaydedilmiştir. Sonuçlar gallik asit cinsinden (GAE), g ürün başına verilmiştir. Analiz boyunca iki biyolojik, iki teknik tekrar olacak şekilde çalışılmıştır.

3.6. Son Üründe Duyusal Özelliklerin Belirlenmesi

Son ürünlerde gerçekleştirilen renk analizi için (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japonya, CM-3600d) ve tekstür analizi için (Texture Technologies, Massachusetts/ABD, TA.XT Plus) kullanılmıştır. Tekstür analizinde yine aynı markaya ait ayarlanabilir köprü (adjustable bridge, TA-92) ve yuvarlak uçlu bıçak probundan (rounded-end knife probe, TA-42) yararlanılmıştır.

3.6.1. Renk Analizi

Son ürünlerde olası renk farklılıklarının ortaya koyulabilmesi amacıyla örneklerin taamamı üzerinde renk analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Hunter L* a* b* sistemine uygun olarak spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Örnekler üç paralel olarak okutulmuştur. L* değeri rengin parlaklığını (100: beyaz, 0: siyah), a* değeri kırmızılık-yeşilliği (+60: kırmızı, -60: yeşil) ve b* değeri sarılık-maviliği (+60: sarı, -60: mavi) ifade etmektedir. Bu üç boyutlu renk farklılıklarını tek bir değerle ifade etmek için ise ΔE değeri kullanılmaktadır. Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak ΔE değerinin hesaplanabilmesi için aşağıdaki formül kullanılmıştır [120].

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (3.7)$$

ΔL : İki örneğin L* değerleri arasındaki fark,

Δa : İki örneğin a* değerleri arasındaki fark,

Δb : İki örneğin b* değerleri arasındaki fark.

3.6.2. Tekstür Analizi

Elde edilen son ürünlerin sahip olduğu potansiyel tekstür farklılıklarının ortaya koyulabilmesi için +4 °C'de 24 saat boyunca depolananan son ürünlerde tekstür analizi yapılmıştır [121]. Hazırlanan kraker ve kurabiye örneklerine üç noktalı bükülme testi uygulanmadan hemen önce 5 kg ağırlığındaki yük hücresi kullanılarak kalibrasyon sağlanmıştır. Bu sayede kuvvet hassasiyeti 1 g olacak şekilde ayarlanmıştır. Kurabiye örnekleri için köprü boşluğu 30 mm ve krakerler için ise 23 mm olacak şekilde

ayarlanmıştır. Yuvarlak uçlu bıçak probunun hızı 2 mm/s ve çıkış hızı 10 mm/s olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerin sertlik değerleri tüm örnekler için üç paralel olacak şekilde ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen analiz verilerine, IBM SPSS programı kullanılarak Tukey'in Dürüstçe Anlamlı Fark çoklu karşılaştırma testleri (Tukey HSD) ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) %95 güven aralığında uygulanmıştır. Anlamlı fark olarak $p \leq 0.05$ kabul edilmiştir.

Fermantasyon prosesinin ve farklı suş kullanımının ürünler üzerindeki etkilerinin daha iyi şekilde araştırılabilmesi için, son ürünlere uygulanan tüm analizleri kapsayacak biçimde GraphPad Prism uygulamasında ısı haritası grafikleri oluşturulmuştur. Bu amaçla tüm sonuçlar normalize edilerek kullanılmıştır.

Son olarak normalizasyon sonucu elde edilen verilere OriginPro 2024 programı kullanılarak temel bileşen analizleri (Principal component analysis, PCA) uygulanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Gerçekleştirilen çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*'nin soya unu bazlı fermente gıda üretiminde kullanımının araştırılması amaçlanmıştır.

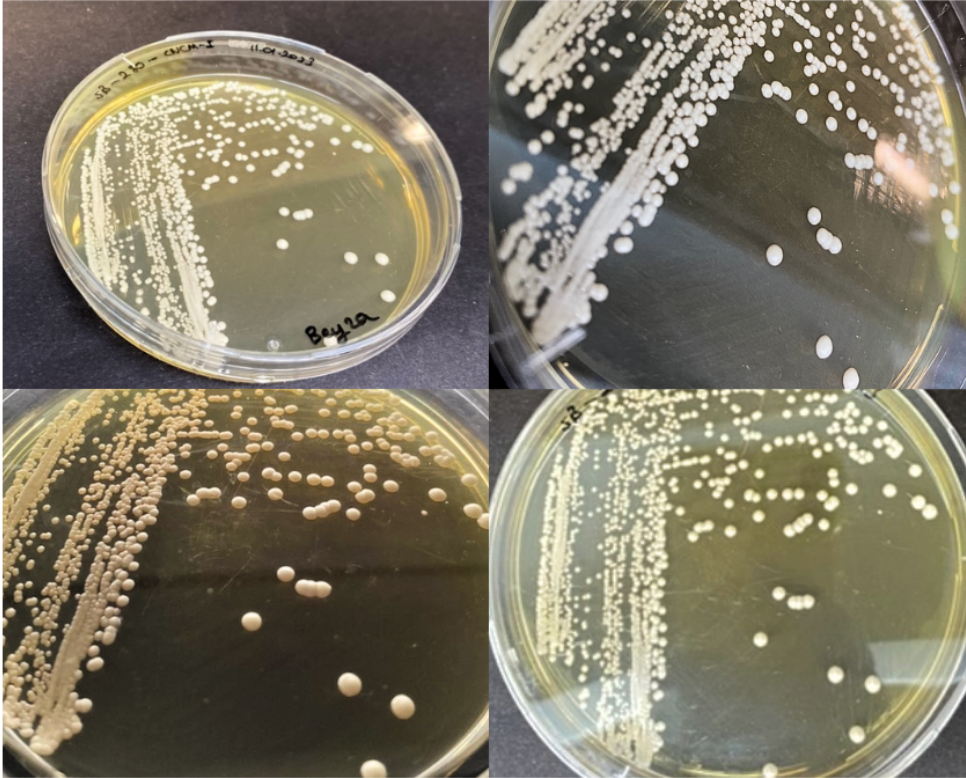
Bu amaç doğrultusunda öncelikle FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda (HUF) bulunan *S. boulardii* suşlarının belirlenmesi ve tanımlanması amacıyla daha önce ITS, LSU ve MALDI-TOF analizleri ile tanımlanmış *S. cerevisiae* suşları stok kültürden canlandırılmıştır. Ardından *S. cerevisiae* ve *S. boulardii*'nin sahip olduğu farklılıklardan yola çıkılarak tüm suşlar belirli sıcaklıklarda gelişim, glukoz/galaktoz kullanımı ve düşük pH duyarlılıklarının belirlenebilmesi için bazı biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Test sonuçları göz önünde bulundurularak seçilen suşlara DNA izolasyonunu takiben *AAD15* genine spesifik tasarlanan primer çifti kullanılarak qPCR-HRM analizi uygulanmıştır. Bu sayede biyokimyasal test sonuçları ile genetik tabanlı bir analiz olan qPCR-HRM verileri karşılaştırılarak koleksiyonda bulunan HUF16M3H11104 suşunun *S. boulardii* CNCM-I 745 olarak ayrımı gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın sonraki kısmında ürün geliştirme bölümünde kraker ve kurabiye örneklerine dair formülasyonlar oluşturulmuştur. Geliştirilen formülasyonlarla elde edilen hamurlara fermantasyon işlemi uygulanmıştır. Süreç boyunca hamurların tamamında pH ölçümü ve toplam maya sayımı yoluyla fermantasyon takibi gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının son kısmında, elde edilen soya unu bazlı kraker ve kurabiye ürünlerine uygulanan kimyasal analizler sonucunda ürünlerin nem, kurumadde ve kül içerikleri belirlenmiştir. Ardından katı örneklerle uygulanan protein ekstraksiyonu uygulamasını takiben Bradford analizini temel alan protein analizleri sayesinde ürünlerin içeriğinde bulunan yüzde protein içeriği belirlenmiştir. Son ürünlere ait yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi için GC-FID sistemi kullanılırken, GC-MS sistemi kullanılarak ise birincil metabolit profilleri çıkarılmıştır. Kimyasal analizlerin son aşamasında, ürünlerin antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik içerikleri araştırılmıştır. Ayrıca ürünler arasında fermantasyon ve farklı suş kullanımının etkilerini araştırabilmek adına duyusal özelliklerin belirlenmesi için renk ve tekstür analizleri uygulanmıştır.

4.1. Mikroorganizmalar, Canlandırma ve Stok Eldesi

Bu çalışmada, materyal olarak FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda (HUF) bulunan *S. cerevisiae* suşları kullanılmıştır. Suşların canlandırılması için YPD Broth besiyerine inoküle edilen suşların 30 °C’de 48 saat inkübasyon süresince takip edilmiş ve kültürlerde gelişen bulanıklık mikroorganizmaların canlılığını koruması olarak değerlendirilmiştir. Canlandırılan HUF kodlu suşlar ve pozitif kontroller agarlı besiyerlerine tek koloni düşürme tekniği uygulanarak aktarılmıştır. Böylece makroskobik gelişimleri gözlenen suşların saflık kontrolleri yapılmıştır. Suşlara ait makroskobik hücre görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Canlandırılarak saf kültürleri elde edilen tüm suşlara ait gelişim özellikleri ve morfolojileri ise Ek 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Tek koloni düşürme tekniği ile stoklanan suşlara ait makroskobik görüntü

Saflık kontrollerinin ardından tüm suşlar içerisinde 1:1 oranında gliserol ve sıvı besiyeri bulunduran kriyojenik tüplere aktararak stoklanmış ve -20 °C’de saklanmıştır. Canlandırılan suşların tamamının 30 °C’de gelişim gösterebilmesine karşın, bazı suşların makroskobik morfolojilerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Suşların büyük bir kısmına ait

morfolojik özellikler hücrelerin krem-beyaz renkli, mat, yuvarlak ve pürüzsüz olduğu yönüyle; 17M3D31089, 17M3E21112, 17M3G32157, 18M2Z10001, 18M3B21008, 18M3C21001 ve 18M3C21010 numaralı HUF suşlarının morfolojilerinin şeffaf, yuvarlak ve pürüzsüz olduğu gözlemlenmiştir. *S. cerevisiae*'nin YPD agar besiyerinde makroskopik morfolojisinin krem-beyaz renkli, mat, yuvarlak ve pürüzsüz olması gerekmektedir [8]. Bu nedenle 17M3D31089, 17M3E21112, 17M3G32157, 18M2Z10001, 18M3B21008, 18M3C21001 ve 18M3C21010 numaralı HUF suşları dışında bulunan suşların tamamında *S. cerevisiae* tipik morfolojisine uygun sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca potansiyel *S. boulardii* olarak seçilen HUF16M3H11104 numaralı suşun makroskopik morfolojisinin *S. cerevisiae* suşlarından farklı olmadığı gözlenmiştir.

4.2. Biyokimyasal Testler

4.2.1. Belirlenen Sıcaklıklarda Gelişim

Canlandırma aşamasında saflık kontrolleri yapılan ve stoklanan suşların tamamına belirli sıcaklıklarda gelişim özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla 30, 37 ve 45 °C olmak üzere gelişim testi uygulanmıştır. İnkübasyon süreci 48 saat boyunca devam ettirilmiş ve besiyerinde gelişen bulanıklık not edilmiştir. Seçilen sıcaklıklardan 30 °C *S. cerevisiae*'ya ait optimum gelişim sıcaklığı iken, 37 °C *S. boulardii* 'ye ait optimum gelişim sıcaklığıdır. Gelişim sıcaklıklarına 45 °C'nin de dahil edilmesinin nedeni *S. boulardii* suşlarının bu sıcaklıkta da gelişim göstermesinin ayırıcı bir özellik olmasıdır [76,77]. Bu sayede kültür koleksiyonunda bulunan ve daha önce tanımlanan suşların arasında *S. boulardii* olma potansiyeli bulunan suşların seçimi için ilk aşama gerçekleştirilmiştir.

Belirlenen sıcaklıklarda gelişim testi için kullanılan tüm suşların kaynak, izolasyon kodu, deneylerin gerçekleştirildiği sıcaklıklar ve suşlara ait gelişimler Ek 1.2'de gösterilmiştir. Referans mikroorganizmalara ait gelişim sonuçları ise Çizelge 4.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Referans mikroorganizmalara ait farklı sıcaklıklarda gelişim sonuçları

Kaynak	İzolasyon Kodu	Belirlenen Sıcaklıklarda Gelişim		
		30 °C	37 °C	45 °C
Ticari	745	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
Ticari	9763	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
Ticari	6328	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok

Farklı sıcaklıklarda gelişim testi sonucunda elde edilen verilere göre, ticari 9763 ve 6328 kodlu *S. cerevisiae* suşlarının 45 °C’de gelişim göstermediği gözlenmiştir. Referans mikroorganizmalardan 745 kodlu *S. boulardii* suşunun ise tüm test sıcaklıklarında gelişebilme yeteneği ortaya koyulmuştur.

HUF kodlu 16M3C11032, 16M3G11088, 16M3H11101, 17M3B32047, 17M3C31066, 17M3F21122, 17M3F31136, 17M3G32157, 17M3H21208, 18M2Z10001, 18M2Z10014, 18M3B21008, 18M3B21010, 18M3C21010, 18M3D21006, 18M3E21007, 18M3F21010, 18M3G21009, 18M3J21008, 18M3K21007 ve 18M3L21010 numaralı suşların 30 ve 37 °C’de gelişim gösterdiği ancak 45 °C’de gelişmediği görülmüştür. HUF16M3H1104 kodlu önceden *S. cerevisiae* olarak tanımlanan ve bu çalışmada potansiyel *S. boulardii* olabileceği öngörülen suş ile diğer HUF kodlu test suşlarının tamamının 30, 37 ve 45 °C’lik sıcaklık değerinde de gelişim gösterdiği gözlemlenmiştir.

4.2.2. Glukoz ve Galaktoz Kullanımı

S. cerevisiae ve *S. boulardii*’nin şeker kullanım yeteneklerinin karşılaştırılması ve kültür koleksiyonunda bulunan suşların biyokimyasal özelliklerinin gözlenmesi amacıyla glukoz ve galaktoz kullanım testleri gerçekleştirilmiştir. İçerisinde tek şeker kaynağı olarak glukoz veya galaktoz bulunduran bazal besiyerlerine inokülasyon sağlanmasının ardından 15 gün boyunca, *S. boulardii*’nin optimum gelişim sıcaklığı olan 37 °C’de inkübasyon sağlanmıştır.

On beş gün içerisinde gaz oluşumu gözlenen ve renk değişimi sarı olan tüpler için “pozitif”, 15. Günü sonunda gaz oluşumu gözlenmeyen ve renk değişimi mavi olan tüpler için ise “negatif” olmak üzere deneye ait sonuçlar Ek 1.3.’te gösterilmiştir [104]. Ayrıca kontrol mikroorganizmalara ait deney sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Referans mikroorganizmalara ait glukoz ve galaktoz kullanımı deney sonuçları

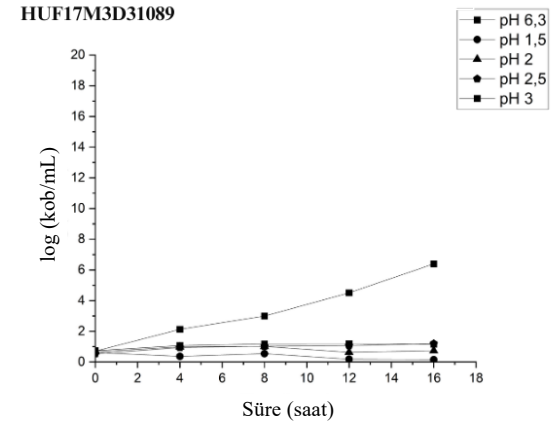
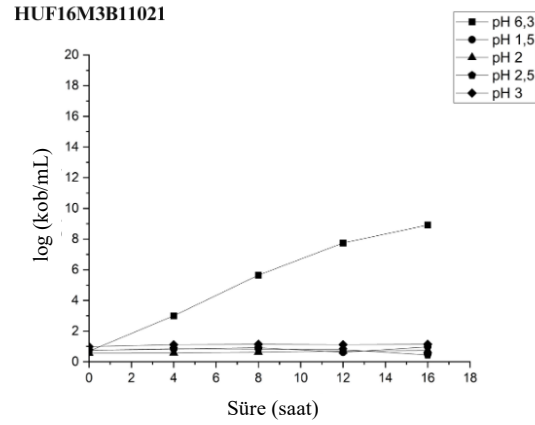
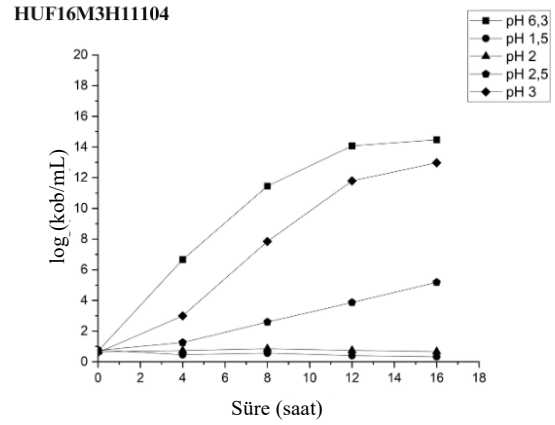
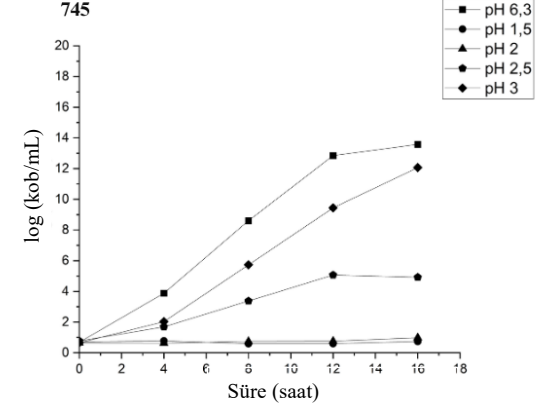
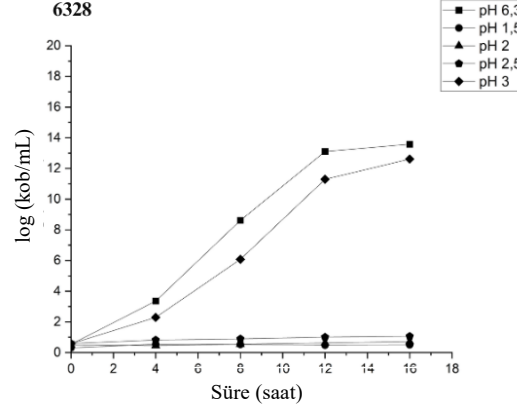
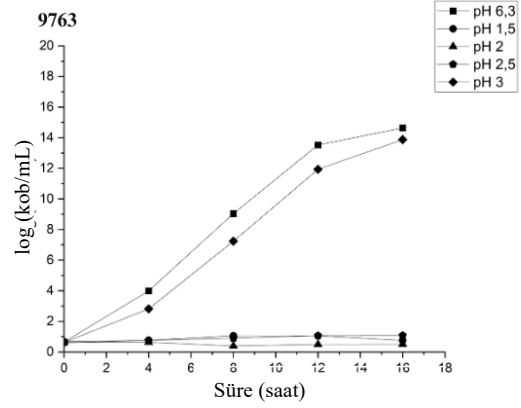
Kaynak	İzolasyon Kodu	Glukoz ve Galaktoz Kullanımı			
		Glukoz		Galaktoz	
		Renk Değişimi	Gaz Oluşumu	Renk Değişimi	Gaz Oluşumu
Ticari	745	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
Ticari	9763	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
Ticari	6328	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif

Glukoz ve galaktoz kullanımı testine dair elde edilen verilere göre, ticari 9763 ve 6328 kodlu *S. cerevisiae* suşlarının hem glukoz hem de galaktoz içeren besiyerlerinde renk değişimi ve gaz oluşumu için pozitif sonuç verdiği; 745 kodlu *S. boulardii* suşunun ise glukoz içeren besiyerinde renk değişimi ve gaz oluşumu için pozitif sonuç elde edilirken, galaktoz içeren besiyerinde her iki kriter için de negatif sonuç verdiği sonucuna ulaşılmıştır. *S. boulardii*’nin glukozu fermente edebilirken, galaktozu fermente etme yeteneği bulunmadığı bilinmektedir [103].

Referans suşları dışında HUF kodlu 16M3B11021, 17M3D31089, 17M3E21112, 17M3G32157, 18M2Z10001, 18M3B21008, 18M3C21001, 18M3C21010, 18M3D21006, 16M3D11047 ve 16M3H11104 numaralı suşlarının glukozu fermente ederek gaz oluşturduğu ve besiyeri rengini sarıya çevirdiği gözlenirken, galaktozu kullanamayıp gaz oluşturmadığı ve besiyeri rengini maviye dönüştürdüğü gözlemlenmiştir. Bu durumda bahsi geçen HUF kodlu suşların galaktoz kullanım yetenekleri bulunmaması dolayısıyla 745 kodlu referans olan *S. boulardii* suşu ile aynı şeker kullanımı karakteristiğine sahip olduğu gözlenmiştir. Diğer HUF kodlu suşlar ise 9763 kodlu *S. cerevisiae* suşu ile benzer olarak hem glukoz ve galaktoz kullanım yeteneğine sahiptir.

4.2.3. Farklı pH'da Gelişim

Biyokimyasal testlerin son aşaması olarak, ilk iki aşama olan farklı sıcaklıklarda gelişim ve glukoz/galaktoz kullanımı testlerinin sonucunda belirlenen, *S. bouldardii* ile aynı sıcaklıklarda gelişim gösteren ve galaktozu fermente edemeyen HUF kodlu 16M3B11021, 16M3D11047, 16M3H11104 ve 17M3D31089 kodlu suşlara farklı pH'da gelişim testi uygulanmıştır. Referans olarak ise 745 kodlu *S. bouldardii*, 9763 ve 6328 kodlu *S. cerevisiae* suşları kullanılmıştır. Ayrıca pH'sı 6,3 olan sıvı besiyerinde de gelişim kontrolleri sağlanarak suşların normal şartlardaki gelişim eğrileri çizilmiştir. Bu analizde seçilen suşların 1,5; 2,0; 2,5 ve 3,0 pH değerlerine sahip besiyerlerinde 37 °C'de canlı kalabilme yetenekleri test edilmiştir. Bu amaçla 0, 4, 8, 12 ve 16. saatlerde 600 nm'de türbidimetrik ölçümler alınmış ve absorbans değerleri (3.1) numaralı gelişim eğrisi denklemi kullanılarak log (kob/mL) cinsinden hesaplanmıştır. İlgili suşlara ait özetlenmiş verilere Şekil 4.2'de, ham verilere Ek 1.4 ve Ek 1.8 arasında yer verilmiştir.



Şekil 4.2. Kullanılan mikroorganizmalara göre farklı pH'da gelişim sonuç grafikleri

Literatürde belirtildiği üzere, gastrointestinal sağlığın korunabilmesi ve probiyotik etkinin sağlanabilmesi için *S. boulardii* suşları pH 3,0 seviyesinde de canlılığını koruyabilmelidir [122]. Bu nedenle gastrik pH seviyelerine uygun olarak hazırlanan ve deneyler sonucunda elde edilen verilere dayanarak karşılaştırma yapıldığında, 745 numaralı *S. boulardii* kontrol suşunun pH 6,3; 3,0 ve 2,5 düzeyinde de canlılığını yitirmediği ve gelişim gösterdiği görülmüştür. Daha düşük pH seviyesinde görülen gelişime rağmen, pH 3,0 değerinin *S. boulardii* için bir eşik değer teşkil ettiği ve bu pH değerinden itibaren daha düşük seviyelere inildikçe mikroorganizma sayısının azalması nedeni ile gelişiminin azalması beklenebilir. *S. cerevisiae* kontrol suşları olan 9763 ve 6328 suşları ise pH 6,3 dışında yalnızca pH 3,0 seviyesinde geliştiği gözlenmiştir.

Ayrıca farklı pH'da gelişim testi uygulanan HUF kodlu mikroorganizmalardan 6328'in *S. boulardii* kontrole benzer şekilde pH 3,0 ve 2,5'te canlılığını yitirmediği ve gelişebildiği saptanmıştır. Ancak 16M3B11021, 16M3D11047 ve 17M3D31089 kodlu suşların yalnızca pH 6,3'te gelişebildiği görülmüştür. HUF16M3H11104 suşu ve referans olarak kullanılan suşlara ait biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.3'te yer almaktadır.

Çizelge 4.3. HUF16M3H11104 ve referans suşlara ait biyokimyasal test sonuçları

Suş Kodu	Belirlenen Sıcaklıklarda Gelişim			Glukoz ve Galaktoz Kullanımı		Farklı pH'da Gelişim				
	30 °C	37 °C	45 °C	Glukoz	Galaktoz	pH 6,3	pH 1,5	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme yok	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme yok	Gelişme yok	Gelişme yok	Gelişme var
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 6328	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme yok	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme yok	Gelişme yok	Gelişme yok	Gelişme var
<i>S. boulardii</i> CNCM-I 745	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme yok	Gelişme var	Gelişme yok	Gelişme yok	Gelişme var	Gelişme var
HUF 16M3H11104	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme yok	Gelişme var	Gelişme yok	Gelişme yok	Gelişme var	Gelişme var

Çizelge 4.3 incelendiğinde potansiyel *S. boulardii* olduğu düşünülen HUF16M3H11104 kodlu suşun çalışmada kullanılan referans 745 kodlu *S. boulardii* ile gösterdiği biyokimyasal benzerlikler saptanmıştır. Biyokimyasal test sonuçları bir arada değerlendirildiğinde, HUF16M3H11104 kodlu suşun, *S. boulardii* kontrole benzer şekilde; hem 45 °C’de gelişebildiği hem galaktozu fermente edemediği hem de pH 2,5’te dahi canlılığını yitirmediği gözlenmiştir. Bu nedenle HUF16M3H11104 kodlu suş potansiyel bir *S. boulardii* suşu olarak değerlendirilebilir. Ancak bu sonuçların DNA’ya dayalı moleküler yöntemlerle desteklenmesi için *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* suşlarının ayrımının sağlanması ve potansiyel *S. boulardii* olarak adlandırılan HUF16M3H11104 suşu için qPCR-HRM analizi uygulanmasına karar verilmiştir.

4.3. AAD15 genine spesifik qPCR-HRM Analizi

S. boulardii referans suşu ile aynı biyokimyasal özellikleri göstermesi nedeniyle bir sonraki aşama için seçilen HUF16M3H11104 suşu ve 45 °C ’de canlılığını koruyan (EK1.2) ancak galaktozu fermente edemediği saptanan (EK1.3) iki adet *S. cerevisiae* suşu (HUF16M3B11021 ve HUF17M3D31089) ile 745 kodlu *S. boulardii*, 9763 ve 6328 kodlu *S. cerevisiae* suşları kullanılarak öncelikle DNA izolasyonu yapılmıştır. Üç paralel olarak gerçekleştirilen izolasyon sonucu elde edilen DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri Çizelge 4.4’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri

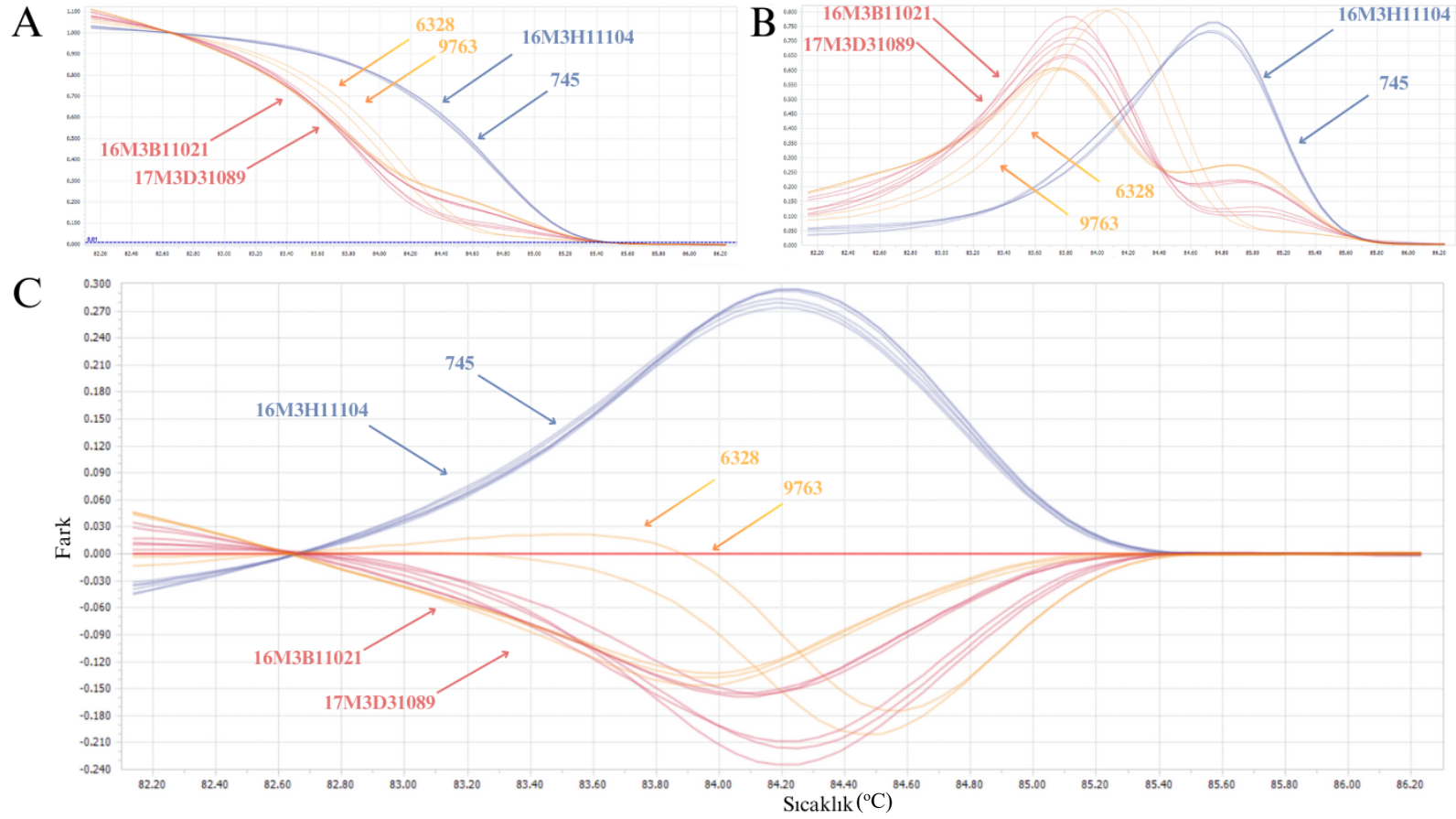
Suş Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng/μL)	Saflık (A _{260/280})
9763	145,8	1,77
	157,2	1,85
	187,2	1,49
6328	186,9	1,84
	174,6	1,80
	197,3	1,77
745	146,0	1,68
	179,7	1,73
	182,4	1,95
HUF16M3H11104	129,6	1,85
	137,8	1,71
	148,1	1,85
HUF16M3B11021	184,2	1,89
	181,7	1,92
	188,1	1,91
HUF17M3D31089	188,2	1,89
	191,7	1,89
	201,8	1,77

DNA izolatlarının ortalama saflıklarını yansıtan A_{260/280} değerlerinin 1,7 ila 2,0 arasında olması, uygulamalar için uygun kabul edilmektedir [123]. Varyasyon katsayısının ise 10'dan küçük olması “çok iyi” bir değer olarak kabul edilirken, 30'dan büyük değerler kabul edilmemektedir. Toplam ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı dahil olmak üzere verim değerleri sırasıyla 172.68 μg, 22.25 μg ve %12,89'dur. Sonuç olarak 745, 9763, 6328, HUF16M3H11104, HUF16M3B11021 ve HUF17M3D31089 suşları için nükleik asit konsantrasyonları, saflıklar ve varyasyon katsayısı değerleri qPCR-HRM analizi için uygun bulunmuştur.

Ayrımı sağlanmak üzere seçilen ve *S. boulardii* olma potansiyeli gösteren mikroorganizmalara *AAD15* genine spesifik qPCR-HRM analizi uygulanmıştır. Gerçekleştirilen denemeler sonucunda tasarlanan primer çiftinin başarılı şekilde çalıştığı ve ayırım sağlayabildiği görülmüştür. Her bir amplikonun erime öncesi/sonrası bölgeleri ve ayrıca erime eğrilerinin kesişme noktaları değerlendirilmiştir.

Şekil 4.3'te yapılan qPCR-HRM analizine dair suşların normalleştirilmiş erime eğrileri, normalleştirilmiş erime pikleri ve fark eğrisi sonuçları gösterilmiştir. Normalleştirilmiş erime eğrisi, erime eğrisi verilerini sıcaklık ve floresans değerleri için normalleştirilmiş bağıl değerleri açıklayan bir grafikdir. Fark eğrisi ise, erime eğrisi verilerini, referansla normalleştirilmiş floresans değerleri ile sıcaklığı karşılaştıran ve eğriler arasında daha net şekilde gözlem yapılabilmesini sağlaması açısından oldukça önemlidir [124].





Şekil 4.3. *AAD15* primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen hrm analiz sonuçları
(A: Normalleştirilmiş Erime Eğrileri, B: Normalleştirilmiş Erime Pikleri, C: Fark Eğrileri)

Kullanılan primer çiftiyle 745 kodlu *S. boulardii* ve potansiyel *S. boulardii* olarak seçilen HUF16M3H11104 numaralı suşun erime eğrileri, pikleri ve fark eğrilerinde açıkça ayrı bir grup oluşturduğu görülmektedir. Ayrıca daha önce gerçekleştirilen biyokimyasal testlerle *S. boulardii* olmadığı görülen 17M3D31089 ve 16M3B11021 suşlarının *S. boulardii* grubundan ayrı bir grup oluşturduğu ve bu grubun 9763 ve 6328 *S. cerevisiae* ile aynı grupta yer aldığı gözlenmiştir. Sonuç olarak HRM analizi sonucunda *AAD15* primeri kullanılarak 745 kodlu *S. boulardii* ve HUF16M3H11104 ile 9763 ve 6328 kodlu *S. cerevisiae* suşları arasındaki ayrımının sağladığı görülmüştür. Elde edilen normalleştirilmiş erime eğrileri, normalleştirilmiş erime pikleri ve fark eğrileri sonucunda elde edilen veriler dışında, örneklerle ait Tm (erime sıcaklığı) değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. qPCR-HRM analizi için erime sıcaklığı sonuçları

Suş Kodu	Ortalama Tm (°C)
9763	84,19 ± 0,31 ^a
745	83,85 ± 0,02 ^b
6328	84,14 ± 0,04 ^a
HUF16M3H11104	83,84 ± 0,02 ^b
HUF16M3B11021	84,13 ± 0,08 ^a
HUF17M3D31089	84,04 ± 0,1 ^a

Ortalama erime sıcaklıklarına göre bir grup içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=6) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

Gerçekleştirilen analiz doğrultusunda *S. cerevisiae* kontrolleri olan 9763 numaralı suş için erime sıcaklığı ortalama 84,19 ve 6328 numaralı suş için 84,14 °C düzeyindedir. *S. boulardii* kontrolü olarak kullanılan 745 numaralı suşun erime sıcaklığı ise ortalama 83,85 olarak bulunmuştur. Deneyde kullanılan HUF kodlu 16M3H11104, 16M3B11021 ve 17M3D31089 suşlarında ise bu değerler sırasıyla 83,84; 84,13 ve 84,04 °C'dir. İstatistiksel karşılaştırmalar doğrultusunda 9763, 6328, HUF16M3B11021 ve HUF17M3D31089 suşları arasında fark görülmemiştir. Ancak 745 ve HUF16M3H11104 suşları ile *S. cerevisiae* grubu arasında istatistiksel bir fark olduğu saptanmıştır [125]. Elde edilen istatistiksel veriler, Şekil 4.3'te elde edilen analiz sonuçlarına paraleldir. Böylelikle qPCR-HRM analiziyle ATCC 9763 ile 6328

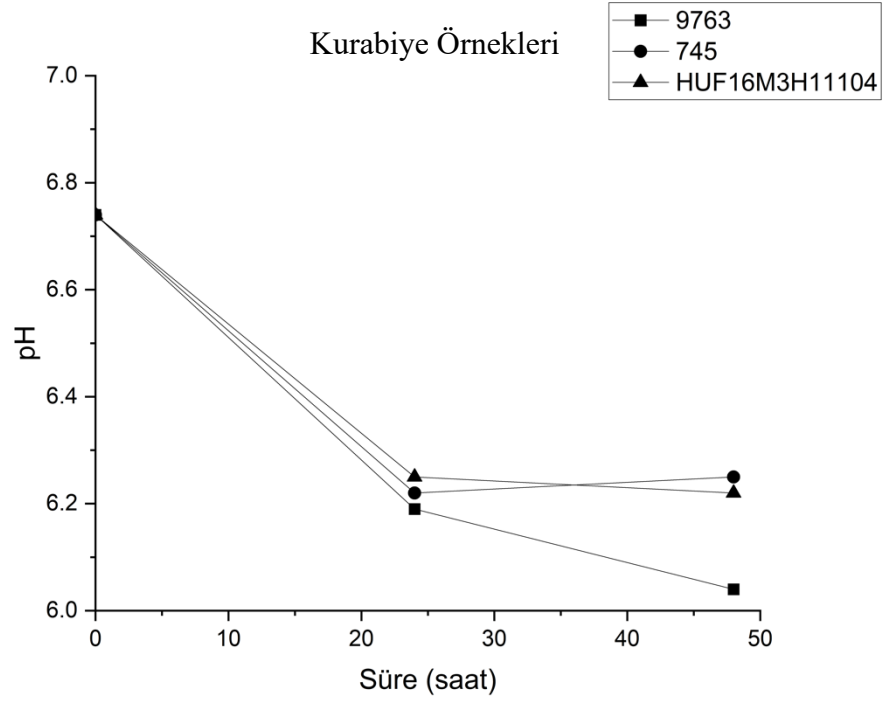
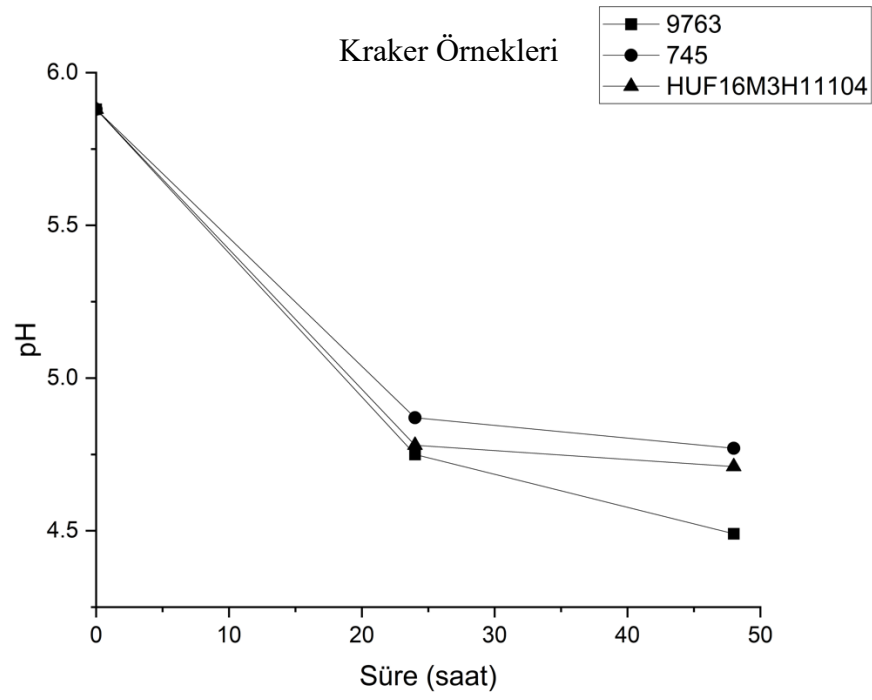
S. cerevisiae suşları ile CNCM-I 745 *S. boulardii* suşlarının *AAD15* primeri kullanılarak ayırımının gerçekleştirilebileceği anlaşılmıştır.

4.4. Ürün Geliştirme

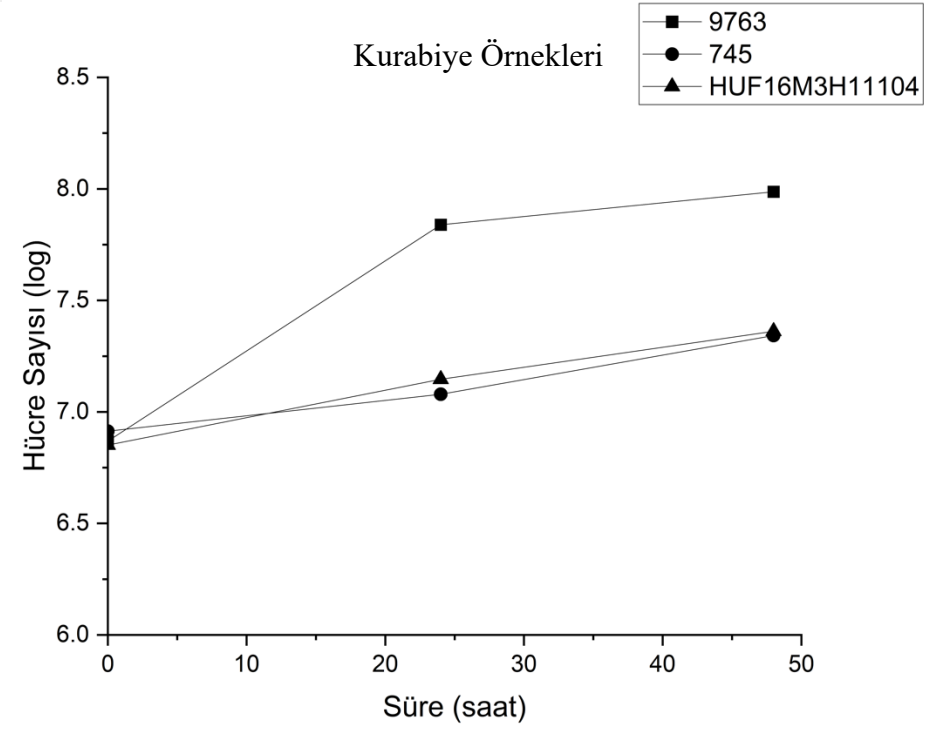
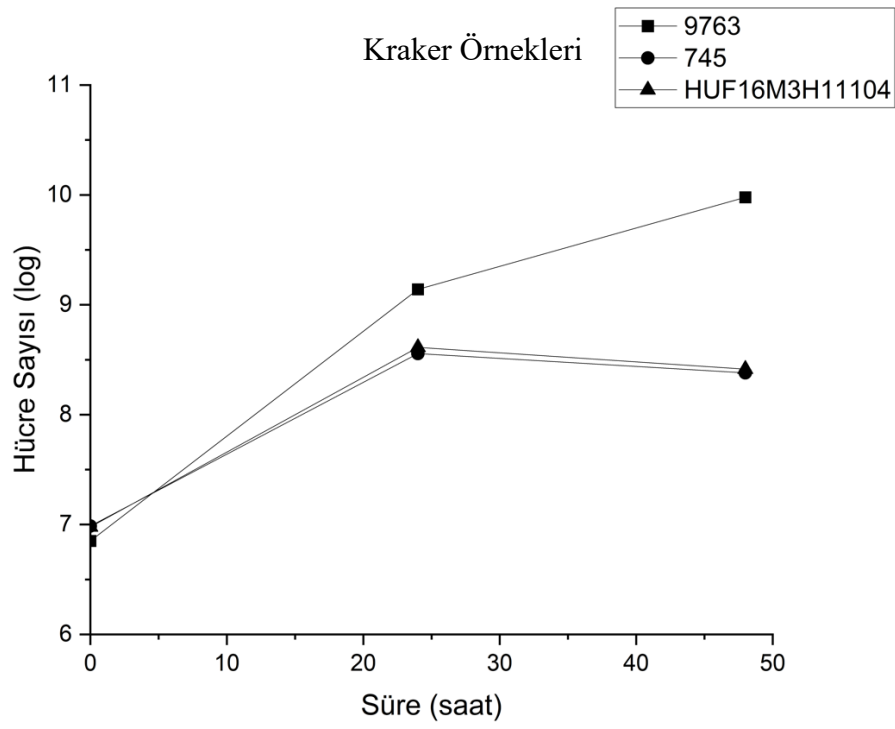
4.4.1. Fermantasyon Takibi ve Son Ürün Eldesi

Biyokimyasal testler ve qPCR-HRM analizi sonucunda ürün geliştirme amacıyla kullanılmasına karar verilen HUF16M3H11104 kodlu suşun yanı sıra, 9763 ve 745 kodlu kültürler ile belirlenen formülasyonlarla hazırlanan kraker ve kurabiye örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen ürünlere ait isimlendirme stratejisi ve kodlama Şekil 3.6 ve Çizelge 3.6'da yer almaktadır.

Ürün formülasyonu ve hamurların hazırlanmasının ardından 35 °C'de 48 saatlik fermantasyon süreci boyunca 0, 24 ve 48. saatlerde kraker ve kurabiye hamurlarından ayrı ayrı alınan örneklerde pH ölçümü ve maya hücrelerinin sayımı gerçekleştirilmiştir [109,110]. Şekil 4.4'te tüm örneklere dair fermantasyon boyunca gözlenen pH değişimleri ve Şekil 4.5'te ise mikrobiyal sayım sonuçları verilmiştir. Grafiklerin oluşturulduğu ham veriler EK 1.9'da yer almaktadır.



Şekil 4.4. Kraker ve kurabiye örnekleri için pH takibi sonuçları



Şekil 4.5. Kraker ve kurabiye örnekleri için mikrobiyal sayım sonuçları

Gerçekleştirilen suş seçimleri, formülasyon çalışmaları ve fermantasyon takibi sırasında örneklerin tamamının başlangıç pH değerlerinin krakerler için 5,88 düzeyinde tutulmasına ve kurabiye örnekleri için ise 6,74 düzeyinde olmasına dikkat edilmiştir. Böylece gözlenen pH değişimleri arasında oluşacak farklılıklar karşılaştırılabilmektedir. Aynı şekilde kültür inokülasyonu sırasında ürünlerdeki başlangıç yükünün 10^6 kob/g olarak belirlenmiştir.

Literatürde *S. boulardii* ve *S. cerevisiae* suşlarının kültür olarak kullanıldığı farklı çalışmalarda, çeşitli ürünlerde pH değerleri değişebilmekle birlikte, fermantasyonun ilk 24 saatinde 0,5 seviyesinde bir pH değişimi yeterli görülmektedir. Sürecin devamında ise pH düzeyinde düşüş gözlenmediği bildirilmiştir [63,126].

Gerçekleştirilen çalışmada AT1 ürünü için pH değeri 0. Günde 5,88 iken 1. gün sonunda 4,75 değerine düşmüştür. pH değerindeki bu düşüş fermantasyonun devam ettiğinin bir göstergesidir. AT1 kodlu kraker örneklerindeki pH değişimi 24 ve 48.saatlerin sonunda, AT2 ve AT3 kodlu ürünlerden istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir.

AT2 ve AT3 kodlu ürünler birbirleri ile karşılaştırıldığında ise benzer pH değişimi seviyeleri gözlenmiştir. Kraker örnekleri için her iki grupta da 0. Günde 5,88 değerindeki pH seviyeleri 1. gün sonunda sırasıyla 4,87 ve 4,78 seviyelerine inmiştir. Fermantasyonun son saati olan 48. saatte ise bu değerler 4,77 ve 4,71 olarak kaydedilmiştir.

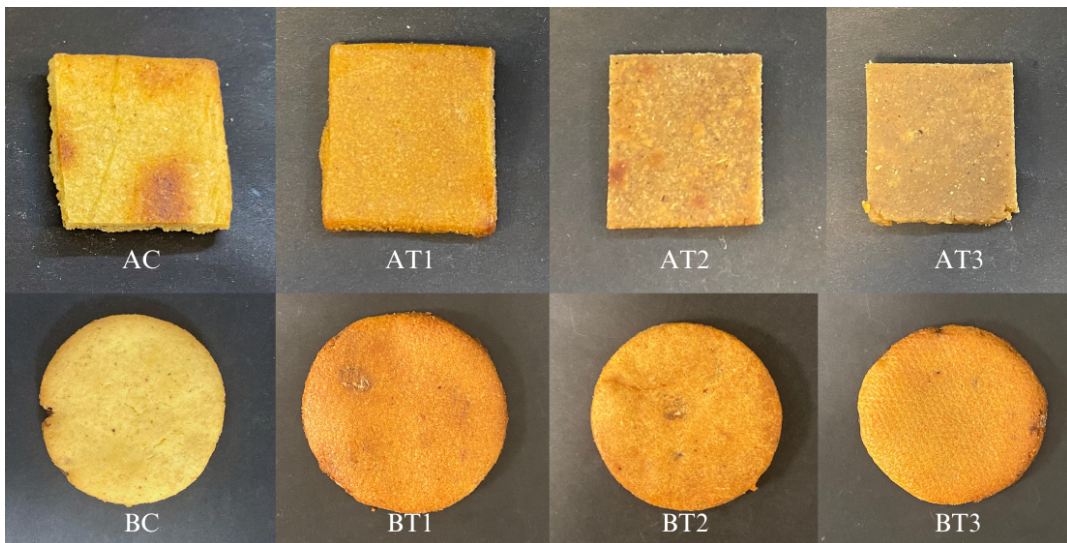
Kurabiye ürünlerinde ise başlangıç için pH 6,74 seviyesindedir. BT1 ürünü için pH değeri 0. Günde 6,74 iken 1. Günün sonunda yaklaşık 6,1 seviyelerine kadar düşmüştür. BT1 kodlu kraker örneklerindeki pH değişimi 24 ve 48.saatlerin sonunda, BT2 ve BT3 kodlu ürünlerden istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir.

BT2 ve BT3 örnekleri için ise 0. Günde 6,74 olan pH seviyesi, 1. Günün sonunda sırasıyla 6,22 ve 6,25 olarak kaydedilmiştir. İkinci günün sonunda ise bu değerler 6,25 ve 6,22 ölçülerek pH seviyesinde herhangi bir değişim gözlenmediği anlaşılmıştır.

Mikrobiyal sayım verileri literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında, ilk günde farklı ürünlerde 10^1 kob/g seviyesinde artış görülmesi ve daha sonraki günlerde mikrobiyal sayım sonuçlarında büyük bir değişim gözlenmemesi yeterli bulunmuştur [63,126]. Gerçekleştirilen çalışmada kraker örnekleri için 1. Gün sonunda 10^3 , kurabiye örnekleri için ise 10^1 kob/g seviyesinde artış fermentasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Bu süreçte 24 ila 48. saatler arasında istatistiksel bir artış kaydedilmemiştir.

AT2 ve AT3 ürünlerinde ise benzer sonuçlar elde edilerek kraker ürünü için 1. Gün sonunda 10^2 kob/g artış gözlenmiştir. Bu artış BT2 ve BT3 ürünleri için 1. Günü sonunda 10^1 kob/g olarak ölçülmüştür. Fermentasyonun devamında yani 48. Saat sonunda ise, herhangi bir canlı hücre artışı gözlenmemiştir. Mikrobiyal sayım sonuçları incelendiğinde, AT1 grubu 24 ve 48. Saatlerde AT2 ve AT3 gruplarından daha yüksek mikroorganizma sayısına ulaşmıştır. BT2 ve BT3 gruplarının istatistiksel olarak da BT1 grubundan düşük seviyede mikroorganizma içerdiği saptanmıştır.

Çalışma kapsamında elde edilen soya unu bazlı hamurlara şekil verilmesinden ve $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ısıtma işlemi uygulanmasının ardından kraker ve kurabiye ürünleri elde edilmiştir. Son ürünlere ait görüntüler Şekil 4.6'da verilmiştir. Elde edilen son ürünlere kimyasal ve duyu analizleri uygulanmıştır.



Şekil 4.6. Çalışma kapsamında elde edilen kraker ve kurabiye ürünleri

4.5. Kimyasal Analizler

4.5.1. Nem Kuru Madde ve Kül

Soya unu bazlı kraker ve kurabiye örneklerinde gerçekleştirilen nem, kurumadde ve kül analizlerinin ait veriler Çizelge 4.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Örneklere ait nem, kuru madde ve kül analiz sonuçları

Kraker Örnekleri			
Örnek Kodu	%Nem	%Kuru Madde	%Kül
AC	4,645 ± 0,28 ^c	95,355 ± 0,28 ^c	2,61 ± 0,13 ^a
AT1	5,248 ± 0,03 ^b	94,752 ± 0,03 ^b	2,65 ± 0,15 ^a
AT2	5,799 ± 0,19 ^a	94,201 ± 0,19 ^a	2,64 ± 0,23 ^a
AT3	5,844 ± 0,21 ^a	94,156 ± 0,21 ^a	2,64 ± 0,11 ^a

Kurabiye Örnekleri			
Örnek Kodu	%Nem	%Kuru Madde	%Kül
BC	5,731 ± 0,14 ^b	94,269 ± 0,14 ^b	2,55 ± 0,11 ^a
BT1	6,445 ± 0,09 ^a	93,555 ± 0,09 ^a	2,60 ± 0,26 ^a
BT2	6,498 ± 0,31 ^a	93,502 ± 0,31 ^a	2,59 ± 0,09 ^a
BT3	6,525 ± 0,07 ^a	93,475 ± 0,07 ^a	2,60 ± 0,13 ^a

Her bir örnek ve analiz veri grubunda farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3)

Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

Soya unu bazlı ve farklı maya suşları ile üretilen kraker örnekleri arasında AT2 ve AT3 kodlu krakerlerin nem değerlerinin %5,8 olduğu, AT1 kodlu örneklerin ise ortalama %nem değerlerinin 5,2 seviyesinde olduğu görülmüştür. AC kodlu fermente edilmeyen kraker örneğine ait nem değerleri ise diğer tüm örneklerden düşük ve %4,6 seviyesindedir. Yüzde kül oranlarında kontrol grubu da dahil olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Soya unu bazlı ve farklı maya suşları ile üretilen kurabiye örnekleri için %nem değerleri kendi içinde karşılaştırıldığında yalnızca BC kodlu fermente edilmeyen kurabiye örneklerinin fermente edilen örneklerden düşük olduğu saptanmıştır. BC örneği dışındaki fermente kurabiye örneklerinin ortalama % 6,45 seviyesinde nem oranına sahip olduğu görülmüştür. Yüzde kül oranlarında kurabiye örneklerinde de istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir.

Yapılan bir çalışmada tekstürize soya proteini örneklerinde nem değerleri ortalama %4,5 ve kül değerlerinin ise ortalama %3,7 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadaki veriler literatürdeki örneklere ait verilerle uyumludur. Ancak bu oranların, kullanılan hammaddeye göre değişiklik gösterebileceği vurgulanmıştır [127,128].

4.5.2. Protein Analizi

Soya unu bazlı kraker ve kurabiye örneklerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonu ve Bradford analizinin ardından toplam protein içerikleri yüzde cinsinden olmak üzere Çizelge 4.7 ve 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Kraker örnekleri için protein analizi sonuçları

Ürün Kodu	Toplam Protein (%)	Ortalama % Protein
AC	5,38	6,07 ± 0,77 ^b
	5,92	
	6,89	
	11,25	
AT1	10,94	11,25 ± 0,31 ^a
	11,57	
	11,55	
	10,76	
AT2	10,94	11,09 ± 0,42 ^a
	10,78	
	11,55	
	10,96	
AT3	11,55	11,10 ± 0,40 ^a
	10,96	

Her bir analiz veri grubunda farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

Bu çalışmada elde edilen veriler sonucunda (Çizelge 4.7) AC grubunun içeriğinde bulunan toplam protein %6,07 olarak bulunmuştur. Ayrıca AT1, AT2 ve AT3 kodlu kraker örneklerinin toplam yüzde protein içerikleri %11,25, %11,09 ve %11,10 olarak kaydedilmiştir. Fermantasyon sonucunda AC kontrol grubu ile AT1 grubu arasında yaklaşık %5’lik fark oluşmuştur. Bu fark AT2 ve AT3 grupları için de geçerlidir. Elde edilen veriler sonucunda AC grubundaki protein içeriğinin diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ve farklı olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Bu durumda,

soya unu bazlı kraker örneklerinde *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* suşları kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyonun protein içeriğine doğrudan etkisi olduğu ve ürünlerin protein içeriğinin artmasını sağladığı görülmüştür.

Çizelge 4.8. Kurabiye örnekleri için protein analizi sonuçları

Ürün Kodu	Toplam Protein (%)	Ortalama % Protein
BC	4,84	4,96 ± 0,11 ^b
	5,06	
	4,99	
BT1	7,38	7,11 ± 0,24 ^a
	6,93	
	7,02	
BT2	7,61	7,11 ± 0,69 ^a
	7,40	
	6,32	
BT3	6,41	7,13 ± 0,95 ^a
	6,77	
	8,21	

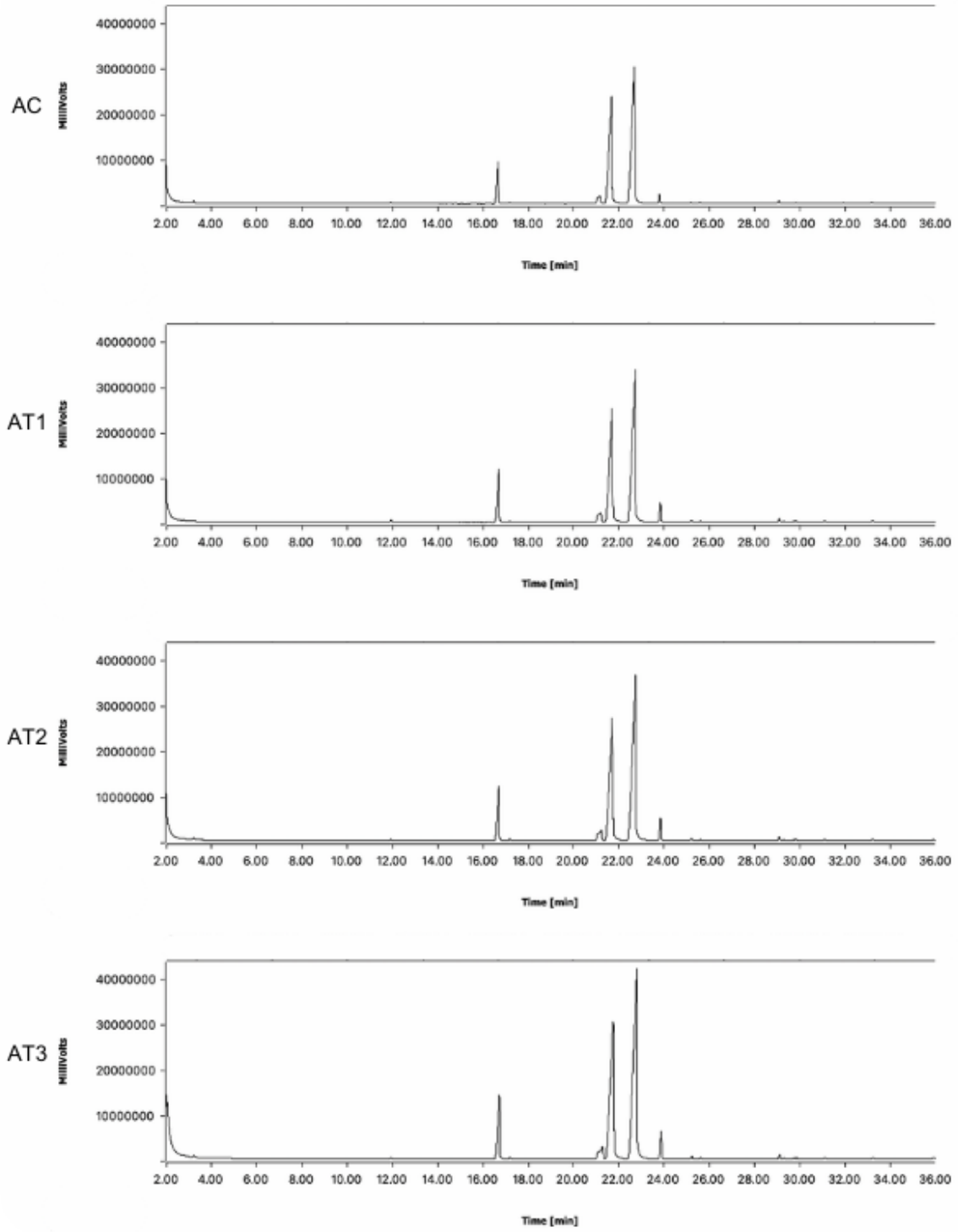
Her bir örnek ve analiz veri grubunda farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

Çalışmada elde edilen son ürünlerde toplam protein yüzdelerinin BC, BT1, BT2 ve BT3 kodlu kurabiye örneklerinde sırasıyla %4.96, %7.11, %7.11 ve %7.13 olduğu görülmüştür. Fermantasyon sonucunda BC kontrol grubu ile BT1 grubu arasında yaklaşık %2'lik fark oluşmuştur. Bu farklılık BT2 ve BT3 grupları için de geçerlidir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak ele alındığında ise BC grubuna ait protein içeriğinin diğer gruplardan anlamlı şekilde daha düşük ve farklı olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Bu durumda, soya unu bazlı kurabiye örneklerinde *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* suşları kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyonun protein oranı üzerinde doğrudan etkisi olduğu ve ürünlerin protein oranının artmasını sağladığı saptanmıştır.

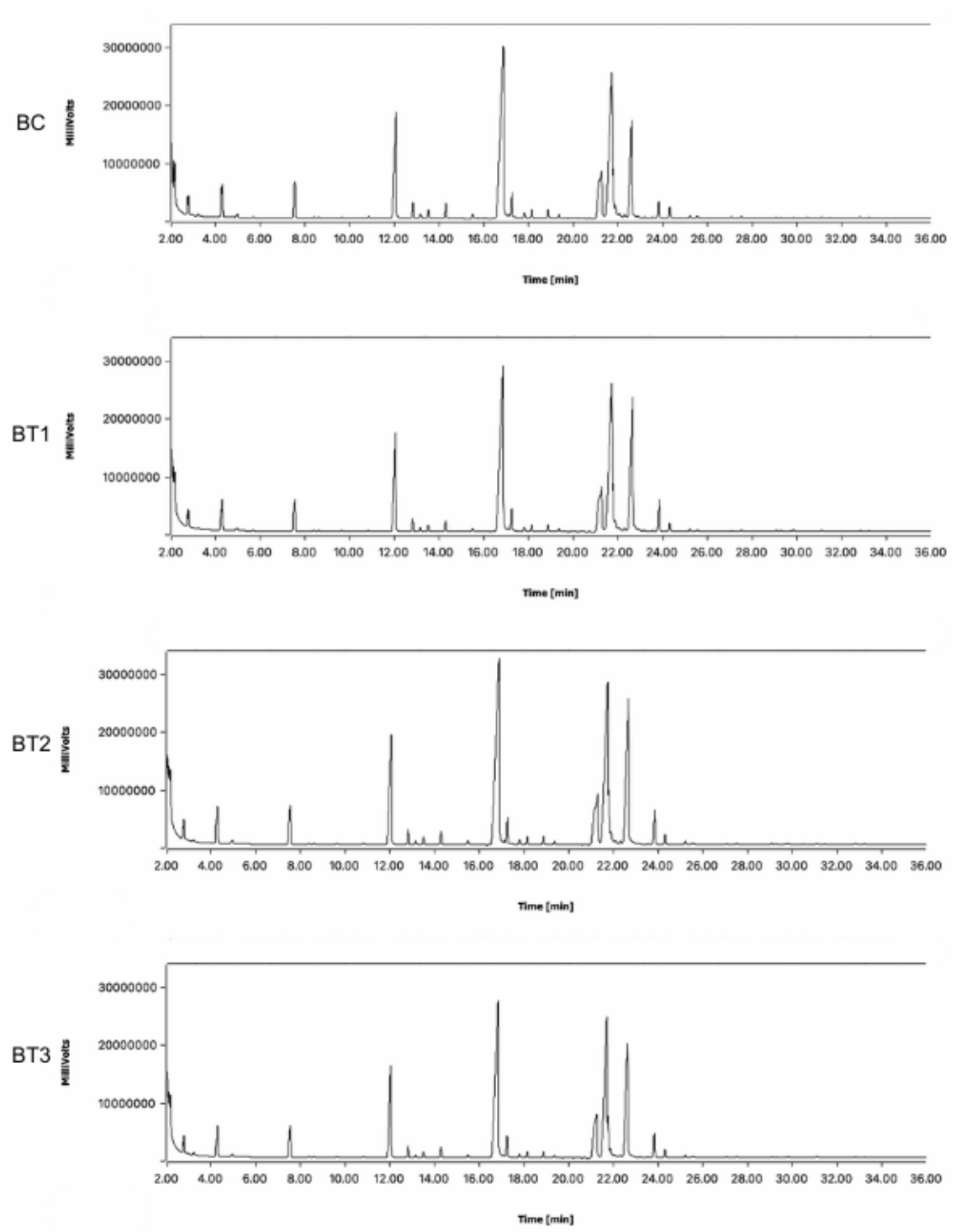
Hindistan cevizi katkılı tempeh unuyla elde edilen kurabiyelerle yapılan çalışmada protein oranının yaklaşık %6 seviyelerinde olduğu gözlenmiştir [129]. Bu durumda elde edilen kurabiye ve kraker örneklerinin yüzde protein içeriklerinin yüksek olduğu; gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında ise formülasyonda kullanılan *S. boulardii* suşları ile elde edilen ürünlerin yüksek protein içeriğine *S. cerevisiae* kadar katkı sağladığı görülmüştür.

4.5.3. Yağ Asidi Kompozisyonu Tayini

Soya unu bazlı kraker ve kurabiye örneklerinin yağ asidi kompozisyonları GC-FID sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler için elde edilen kromotogramlar OpenChrom Lablicate Edition 1.5.0 kullanılarak görselleştirilmiştir. İlgili kromotogramlara Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de yer verilmiştir.



Şekil 4.7. Kraker örneklerine ait GC-FID kromotogramları



Şekil 4.8. Kurabiye örneklerine ait GC-FID kromotogramları

Daha önce gerçekleştirilen soya fasulyesi ile yapılan yağ asidi profili çalışmasında majör yağ asitlerinin sırasıyla; linoleik (C18:2), oleik (C18:1), palmitik (C16:0), linolenik (C18:3) ve stearik asit (C18:0) olduğu belirtilmiştir [130]. Başka bir çalışmada tereyağı için yağ asidi profili: bütirik (C4:0), kaproik (C6:0), kaprik (C10:0), laurik (C12:0), miristik (C14:0), palmitik (C16:0), margarik (C17:0), stearik (C18:0), oleik (C18:1), linoleik (C18:2) ve linolenik asit (C18:3) olarak verilirken [131,132], ayçiçek yağı için linoleik (C18:2) ve oleik asit (C18:1) olarak verilmektedir [132]. Ayrıca buğday unu için palmitik (C16:0), stearik (C18:0), behenik (C22:0), oleik (C18:1) ve linoleik asit (C18:2) olarak verilmiştir [133]. Nişasta için profil kaproik (C6:0), laurik (C12:0), miristik (C14:0), palmitik (C16:0), palmitoleik (C16:1), stearik (C18:0), oleik (C18:1), linoleik (C18:2), linolenik asit (C18:3), araşidik (C20:0), gadoleik (C20:1), eikosatrienoik asit (C20:3) şeklindedir [134].

Soya fasulyesinin yağ asidi profilinin yanı sıra maya suşları genel olarak basit bir yağ asidi profiline sahiptir. *S. cerevisiae* suşunun bünyesinde majör olarak saptanan yağ asitleri palmitoleik asit (C16:1), oleik asit (C18:1), palmitik asit (C16:0) ve stearik asittir (C18:0). Hücrelerde bulunan minör yağ asitlerinin ise miristik asit (C14:0) ve serotik asit (C26:0) olduğu belirtilmiştir [29].

Bu çalışmada, GC-FID analizi doğrultusunda elde edilen kraker ve kurabiye örneklerine ait yağ asitlerinin alıkonma zamanları ve yüzde kompozisyonları Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Kraker örnekleri için yüzde cinsinden yağ asitleri

Alıkonma Zamanı (dk)	Yağ Asidi	AC	AT1	AT2	AT3
12,81	C14:0 (<i>Myristic acid</i>)	0,136 ± 0,004 ^a	0,229 ± 0,004 ^b	0,099 ± 0,001 ^c	0,109 ± 0,002 ^c
17,19	C16:0 (<i>Palmitic acid</i>)	7,799 ± 0,089 ^b	9,318 ± 0,042 ^a	8,883 ± 0,032 ^a	8,993 ± 0,379 ^a
18,87	C16:1 (<i>Palmitoleic acid</i>)	Tespit Edilmedi	0,176 ± 0,002 ^a	0,224 ± 0,002 ^b	0,225 ± 0,007 ^b
19,43	C17:0 (<i>Heptadecanoic acid</i>)	0,230 ± 0,016 ^b	0,060 ± 0,000 ^a	0,059 ± 0,001 ^a	0,060 ± 0,001 ^a
21,51	C18:0 (<i>Stearic acid</i>)	3,003 ± 0,033 ^b	3,347 ± 0,013 ^a	3,397 ± 0,005 ^a	3,504 ± 0,137 ^a
22,45	C18:1 n9c+t (<i>Oleic acid</i>)	37,229 ± 0,003 ^a	35,598 ± 0,020 ^b	34,808 ± 0,016 ^c	34,432 ± 0,407 ^c
22,55	C18:2 n6c+t (<i>Linoleic acid</i>)	49,232 ± 0,155 ^b	47,684 ± 0,046 ^a	48,877 ± 0,020 ^b	48,895 ± 0,235 ^b
23,79	C18:3 n3 (<i>Linolenic acid</i>)	1,312 ± 0,000 ^a	2,387 ± 0,002 ^c	2,463 ± 0,010 ^{bc}	2,573 ± 0,096 ^b
25,26	C20:0 (<i>Arachidic acid</i>)	0,218 ± 0,002 ^a	0,231 ± 0,001 ^{ac}	0,260 ± 0,000 ^{bc}	0,265 ± 0,011 ^b
25,63	C20:1 n9 (<i>9-Eicosenoic acid</i>)	0,172 ± 0,002 ^a	0,174 ± 0,000 ^a	0,170 ± 0,001 ^a	0,176 ± 0,008 ^a
29,15	C22:0 (<i>Behenic acid</i>)	0,411 ± 0,003 ^a	0,399 ± 0,001 ^a	0,420 ± 0,002 ^a	0,429 ± 0,030 ^a
29,52	C22:1 n9 (<i>Erucic acid</i>)	0,055 ± 0,000 ^c	0,154 ± 0,000 ^b	0,096 ± 0,000 ^a	0,093 ± 0,005 ^a
31,03	C23:0 (<i>Tricosanoic Acid</i>)	0,065 ± 0,012 ^a	0,111 ± 0,000 ^b	0,106 ± 0,001 ^b	0,104 ± 0,004 ^b
33,34	C24:0 (<i>Lignoceric acid</i>)	0,137 ± 0,003 ^a	0,131 ± 0,002 ^a	0,138 ± 0,002 ^a	0,142 ± 0,013 ^a
UFA/SFA Oranı		7,334	6,233	6,484	6,350

* c: yağ asitlerinin cis izomerini ve t: yağ asitlerinin trans izomerini temsil etmektedir. UFA: doymamış yağ asidi, SFA: doymuş yağ asidi.

Bir satır içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

Kraker örneklerinde genel olarak sırasıyla linoleik ve oleik asitlerin majör yağ asitleri olduğu görülmüştür. Özellikle linoleik asit içeriğinin yüksek olmasının nedenlerinden biri ürünlerin soya unu bazlı olması ve ürün içeriğinde bulunan ayçiçek yağıdır. Daha sonra palmitik, stearik ve linolenik asit gelmektedir. Palmitik ve stearik asit içeriği soya ve buğday unundan kaynaklanmaktadır [132].

Miristik asit vücutta birikebilen, orta uzunlukta bir yağ asididir. Ayrıca insan vücudunda önemli metabolik olaylarda rol oynamaktadır [135]. Yağ asitleri, kontrol ve farklı mikroorganizmalarla fermente edilmiş örnekler üzerinden ayrı ayrı incelendiğinde C14:0 (Miristik asit) içeriğinin AC örneklerinde %0,136 iken, AT1 örneklerinde %0,229 değerinde olduğu, AT2 ve AT3 örneklerinde ise yaklaşık %0,1 olduğu görülmektedir.

Palmitik asit (C16:0) diyetle alınabilen ve vücutta sentezlenebilen bir yağ asididir [136]. Ürünlerde fermantasyona tabi tutulmamış AC grubunda yaklaşık %7,8 oranında bulunmaktadır. İlgili yağ asidinin AT1, AT2 ve AT3 gruplarında %9,3, 8,8 ve 8,9 oranlarında olduğu görülmektedir. AT1, AT2 ve AT3 ürünlerinde palmitik asit içeriği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p<0.05$).

Palmitoleik asit (C16:1), karaciğerde de sentezlenebilen bir yağ asididir [137]. Bu yağ asidi AC grubunda tespit edilmezken, AT1 ürününde %0,17 oranında bulunmaktadır. AT2 ve AT3 ürünlerinde ise yaklaşık %0,22 oranında bulunduğu saptanmıştır. *S. cerevisiae* suşlarının palmitoleik asit üretebildiği bilinmektedir [138]. *S. boulardii* kullanılarak elde edilen ürünlerindeki palmitoleik asit içeriği, *S. cerevisiae* ile üretilen ürünlerden istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Heptadekanoik asit açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülen AC grubunda %0,23 oranında bulunurken, mikroorganizma içeren ürün gruplarında ise fermantasyonla birlikte bu yağ asidinin %0,06 seviyesine düştüğü saptanmıştır ($p<0.05$).

Stearik asit (C18:0) ise insanda LDL (low density cholesterol, düşük yoğunluklu kolesterol) üzerine etki edebilen bir yağ asididir [139]. Ürün içeriğinde en fazla bulunan yağ asitlerinden biri olan stearik asit, AC grubunda %3 seviyelerinde gözlenirken, fermantasyonla birlikte yaklaşık %3,4 seviyelerinde bulunmuştur. AT1, AT2 ve AT3 grupları arasında stearik asit cinsinden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p<0.05$). Bu nedenle fermantasyonun suş farklılıklarından bağımsız şekilde ürünlerdeki stearik asit yüzdesini arttırdığı söylenebilir.

Oleik asit (C18:1), on sekiz karbonlu, doymamış bir yağ asididir. Literatürde insan sağlığı açısından olumlu faydaları olduğu belirtilmiştir [140]. Ürünlerde bulunan ve yüzde olarak ikinci en yüksek orana sahip yağ asidi olan oleik asit, AC grubunda %37,2 oranında bulunmaktadır. AT1 ürünlerinde *S. cerevisiae* fermantasyonuyla bu yüzde yaklaşık 35,5 olarak bulunmuştur. AT2 ve AT3 gruplarında ise oleik asit yüzdesi yaklaşık %34,6 olarak saptanmıştır. Fermantasyon sonucu örneklerde AT1 grubundaki istatistiksel olarak anlamlı azalış, AT2 ve AT3 grubundan farklıdır ($p<0.05$).

Linoleik asit (C18:2) genel diyetle en yüksek oranda alınan çoklu doymamış yağ asitlerinden biri olması nedeni ile önemli bir yağ asidi olup, elde edilen soya unu bazlı fermente gıdaların tamamında da en yüksek oranda bulunan yağ asididir [141]. Fermente edilmeyen AC kontrol grubunda %49,3 oranında bulunmaktadır. AT1 ürünlerinde fermantasyon sonucu bu oran yaklaşık %47,7'dir. Ancak *S. boulardii* ile fermente edilen AT2 ve AT3 gruplarında, AT1 örneğinden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$).

Ürünlerde saptanan diğer bir yağ asidi de linolenik asittir. Bu yağ asidi (C18:3 n3) omega 3 yağ asidi olması nedeniyle oldukça önemlidir [142]. Ürünlerde AC grubunda %1,3 olarak bulunurken, fermente edilmiş AT1, AT2 ve AT3 kodlu örneklerde yaklaşık %2,387, 2,463 ve 2,573 olarak saptanmıştır. AT2 ürünleri AT1 ve AT3 ürünleriyle istatistiksel olarak anlamlı farka sahip değildir ($p<0.05$).

Arakidik asit (C20:0)'in tüm ürünlerde yaklaşık %0,2 ve üzeri seviyelerde olduğu kaydedilmiştir. Erusik asit (C22:1) ise, günlük alım dozu kontrol edilmesi gereken bir yağ asididir [143]. Erusik asit AC ürünlerinde yaklaşık %0,055 olarak bulunmuştur. AT1 ürünlerinde bu oran %0,154'tür. AT2 ve AT3 örneklerinde ise sırasıyla %0,096 ve 0,093'tür ve ürünler arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur ($p<0.05$).

Trikosilik asit (C23:0) AC ürünlerinde yaklaşık %0,065 düzeyinde saptanmıştır. AT1 ürünlerinde bu oran %0,111'dir. AT2 ve AT3 örneklerinde ise sırasıyla %0,106 ve 0,104'tür. Fermantasyon ile hem *S. cerevisiae* hem de *S. boulardii* suşlarının etkisiyle bu yağ asidinin içeriği aynı oranda ve anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0.05$).

C20:1, C22:0 ve C24:0 yağ asitleri bakımından kraker örneklerinin yüzde içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı biçimde değişiklik görülmemiştir. *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* suşlarının kullanımına bağlı olarak bu yağ asitleri üzerindeki değişim, istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p<0.05$).

Çizelge 4.10. Kurabiye örnekleri için yüzde cinsinden yağ asitleri

Alıkonma Zamanı (dk)	Yağ Asidi	BC	BT1	BT2	BT3
2,17	C4:0 (<i>Butyric acid</i>)	2,003 ± 0,002 ^a	0,673 ± 0,067 ^b	2,104 ± 0,012 ^c	2,084 ± 0,019 ^{ac}
2,78	C6:0 (<i>Caproic acid</i>)	1,478 ± 0,033 ^a	0,445 ± 0,041 ^b	1,422 ± 0,091 ^{ac}	1,317 ± 0,011 ^c
4,28	C10:0 (<i>Decanoic acid</i>)	3,170 ± 0,072 ^a	2,926 ± 0,026 ^a	3,101 ± 0,055 ^a	3,019 ± 0,040 ^a
7,53	C12:0 (<i>Lauric acid</i>)	3,365 ± 0,040 ^a	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi
11,96	C14:0 (<i>Myristic acid</i>)	11,281 ± 0,049 ^c	9,705 ± 0,043 ^b	10,061 ± 0,007 ^a	10,045 ± 0,080 ^a
14,28	C15:0 (<i>Pentadecanoic acid</i>)	1,024 ± 0,004 ^a	0,847 ± 0,002 ^b	0,864 ± 0,001 ^c	0,890 ± 0,012 ^d
15,15	C15:1 (<i>Pentadecenoic acid</i>)	1,039 ± 0,001 ^c	0,276 ± 0,003 ^a	0,277 ± 0,003 ^a	0,286 ± 0,005 ^b
17,19	C16:0 (<i>Palmitic acid</i>)	30,556 ± 0,010 ^b	28,550 ± 0,003 ^a	28,691 ± 0,261 ^a	28,791 ± 0,111 ^a
18,87	C16:1 (<i>Palmitoleic acid</i>)	1,449 ± 0,001 ^a	1,207 ± 0,008 ^b	0,107 ± 0,004 ^c	0,482 ± 0,004 ^d
19,43	C17:0 (<i>Heptadecanoic acid</i>)	Tespit Edilmedi	0,232 ± 0,001 ^a	0,473 ± 0,001 ^b	0,392 ± 0,011 ^c
21,51	C18:0 (<i>Stearic acid</i>)	9,259 ± 0,049 ^c	8,613 ± 0,006 ^b	8,876 ± 0,051 ^a	8,779 ± 0,037 ^a
22,45	C18:1 n9c+t (<i>Oleic acid</i>)	23,707 ± 0,086 ^{ab}	23,950 ± 0,023 ^{bd}	22,939 ± 0,037 ^c	23,854 ± 0,203 ^{ad}
22,55	C18:2 n6c+t (<i>Linoleic acid</i>)	10,234 ± 0,044 ^a	17,015 ± 0,078 ^a	15,643 ± 0,101 ^a	14,996 ± 0,085 ^a
23,79	C18:3 n3 (<i>Linolenic acid</i>)	1,038 ± 0,007 ^a	2,174 ± 0,015 ^b	1,960 ± 0,017 ^c	1,831 ± 0,011 ^d
25,26	C20:0 (<i>Arachidic acid</i>)	0,179 ± 0,002 ^a	0,193 ± 0,004 ^b	0,205 ± 0,002 ^c	0,183 ± 0,002 ^a
27,54	C20:3 n3 (<i>cis-11,14,17-eicosatrienoic acid</i>)	0,138 ± 0,001 ^a	0,115 ± 0,002 ^b	0,116 ± 0,001 ^b	0,120 ± 0,001 ^c
29,15	C22:0 (<i>Docosanoic acid</i>)	0,080 ± 0,001 ^a	0,111 ± 0,003 ^a	0,112 ± 0,003 ^b	0,098 ± 0,005 ^c
33,34	C24:0 (<i>Lignoceric acid</i>)	Tespit Edilmedi	0,087 ± 0,001 ^b	0,063 ± 0,000 ^a	0,062 ± 0,001 ^a
UFA/SFA Oranı		0,603	0,854	0,733	0,747

* c: yağ asitlerinin cis izomerini ve t: yağ asitlerinin trans izomerini temsil etmektedir. UFA: doymamış yağ asidi, SFA: doymuş yağ asidi.

Bir satır içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

Kurabiye örneklerinde genel olarak palmitik, oleik, linoleik, stearik ve miristik asitlerin yoğun olduğu saptanmıştır. Oleik, linoleik ve stearik asit içeriği soya unu kaynaklıdır. Ancak kurabiye örneklerindeki majör yağ asidinin palmitik asit olduğu görülmüştür. palmitik Formülasyonda kullanılan tereyağının asit içeriği, bütirik ve miristik asit içeriğini de etkilemiştir [131].

Yağ asitleri, kontrol ve farklı mikroorganizmalarla fermente edilmiş olan örnekler üzerinden ayrı ayrı incelendiğinde Bütirik asit (C4:0) içeriği BC grubunda %2 iken, BT1 ürünlerinde bu değer %0,673'tür. BT2 ve BT3 ürünlerinde ise BT1'den istatistiksel olarak anlamlı bir farkla yaklaşık %2,1 oranında ölçülmüştür ($p<0.05$). Diğer bir yağ asidi olan kaproik asit (C6:0), fermente edilmemiş örneklerde %1,8 olarak bulunurken, BT1 ürünlerinde bu oran %0,4'tür. Kurabiye örneklerinin içeriğinde en çok bulunan yağ asidi palmitik asit (C16:0)'tir. BC örneklerinde %30,5 olarak bulunurken, fermantasyonla birlikte içeriğinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür ($p<0.05$). Hem *S. cerevisiae* hem de *S. boulardii* suşları kullanılarak elde edilen kurabiye ürünlerinde içerik yaklaşık %28,6 olarak tespit edilmiştir.

Stearik asit (C18:0) içeriği fermente edilmemiş BC örneğinde ortalama %9,259 oranında, BT2 ve BT3 kodlu ürünlerde ise yaklaşık %8,8 oranında tespit edilmiştir. Kurabiye ürünlerinde bulunan majör yağ asitlerinden biri olan oleik asit, tüm ürünlerde ortalama olarak %23 olarak bulunmuştur. Ancak ürün grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.05$). BT1 grubu fermantasyonla yaklaşık %0,2'lik bir artış göstermiştir. BT2 kodlu ürünlerde ise ilgili yağ asidinin yüzde içeriği BC grubundan daha düşük hesaplanmıştır.

Son olarak dekanoik (C10:0) ve linoleik (C18:2) yağ asitlerinde fermente edilmiş ve edilmemiş örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p<0.05$). Pentadekanoik (C15:0), Palmitoleik (C16:1), heptadekanoik (C17:0) ve linolenik (C18:3) yağ asitleri ise tüm gruplarda farklı oranlarda hesaplandığından, bu yağ asitlerinin ürünlerde bulunma yüzdelerinin değişimi fermantasyonla kesin olarak ilişkilendirilememiştir.

4.5.4. Son Üründe Birincil Metabolitlerin Belirlenmesi

Bu çalışmada elde edilen son ürünlerde GC-MS sistemi ile birincil metabolit analizi kantitatif olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm metabolitler, uygulanan derivatizasyon işlemi dolayısıyla, içerdikleri karboksil ve hidroksil gruplarına bağlanan TMS (trimetilsilil ester) sayısına göre TMS türevi cinsinden verilmiştir [144].

Çalışma sonucunda örneklerde toplam 37 adet birincil metabolit tespit edilmiştir. Metabolitlere ait alıkonma zamanları ve ürünlerdeki içerikleri Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12’de gösterilmiştir.



Çizelge 4.11. Kraker örneklerine ait birincil metabolit analizi sonuçları

Grup Adı ve #	Metabolit Adı	Derivatizasyon	Rt (dk)	AC (mg/kg)	AT1 (mg/kg)	AT2 (mg/kg)	AT3 (mg/kg)
Aminoasitler							
1	L-Alanine	2 TMS	6,459	0,050 ± 0,005 ^c	0,355 ± 0,029 ^b	0,193 ± 0,010 ^a	0,161 ± 0,001 ^a
2	L-Valine	TMS	9,126	0,020 ± 0,001 ^b	0,136 ± 0,023 ^a	0,114 ± 0,000 ^a	0,113 ± 0,002 ^a
3	L-Proline	2 TMS	11,09	0,123 ± 0,018 ^b	0,208 ± 0,030 ^a	0,245 ± 0,001 ^a	0,211 ± 0,003 ^a
4	Glycine	3 TMS	11,371	0,017 ± 0,002 ^a	0,127 ± 0,002 ^b	0,083 ± 0,002 ^a	0,088 ± 0,005 ^a
5	Serine	3 TMS	12,854	0,013 ± 0,001 ^a	0,103 ± 0,008 ^b	0,086 ± 0,002 ^a	0,081 ± 0,002 ^a
6	L-Threonine	3 TMS	13,536	0,013 ± 0,002 ^a	0,142 ± 0,004 ^b	0,112 ± 0,003 ^a	0,106 ± 0,002 ^a
7	β-Alanine	TMS	14,364	0,008 ± 0,002 ^a	0,026 ± 0,004 ^b	0,010 ± 0,000 ^a	0,011 ± 0,000 ^a
8	L-Aspartic acid	3 TMS	16,756	0,033 ± 0,003 ^a	0,180 ± 0,017 ^b	0,087 ± 0,005 ^a	0,084 ± 0,005 ^a
9	L-Glutamic acid	3 TMS	19,035	0,018 ± 0,003 ^a	0,201 ± 0,024 ^b	0,181 ± 0,010 ^b	0,175 ± 0,009 ^b
10	L-Asparagine	2 TMS	20,178	0,008 ± 0,002 ^a	0,057 ± 0,020 ^b	0,013 ± 0,001 ^a	0,012 ± 0,000 ^a
11	L-Ornithine	5 TMS	23,332	Tespit Edilmedi	0,023 ± 0,003 ^a	0,042 ± 0,001 ^b	0,055 ± 0,003 ^c
12	L-Tryptophan	TMS	30,829	0,004 ± 0,000 ^b	0,009 ± 0,002 ^a	0,013 ± 0,000 ^c	0,009 ± 0,000 ^a
Yağ Asitleri							
13	9,12-Octadecadienoic acid (Linoleik asit)	TMS	30,401	0,376 ± 0,044 ^c	0,192 ± 0,012 ^b	0,335 ± 0,016 ^{ac}	0,30 ± 0,02 ^a
14	9-Octadecenoic acid (Oleik asit)	TMS	30,495	0,143 ± 0,014 ^a	0,130 ± 0,006 ^{ab}	0,146 ± 0,006 ^a	0,11 ± 0,00 ^b
15	Palmitic Acid	TMS	27,434	0,128 ± 0,008 ^a	0,041 ± 0,002 ^b	0,169 ± 0,004 ^c	0,12 ± 0,01 ^a
16	Stearic acid	TMS	30,949	0,017 ± 0,002 ^a	0,017 ± 0,001 ^a	0,024 ± 0,012 ^a	0,02 ± 0,00 ^a

Organik Asitler

17	Lactic Acid	TMS	5,584	0,011 ± 0,001 ^a	1,379 ± 0,004 ^b	1,139 ± 0,037 ^c	1,637 ± 0,075 ^d
18	Acetic acid	TMS	5,865	0,003 ± 0,000 ^a	0,010 ± 0,000 ^b	0,009 ± 0,000 ^c	0,006 ± 0,000 ^d
19	Propanedioic acid (Malonic Acid)	2 TMS	8,818	0,017 ± 0,003 ^b	0,039 ± 0,006 ^a	0,037 ± 0,001 ^a	0,031 ± 0,002 ^a
20	Butanedioic acid	2 TMS	11,491	0,01 ± 0,001 ^a	0,040 ± 0,002 ^a	0,184 ± 0,007 ^b	0,115 ± 0,106 ^{ab}
21	Propanoic acid	TMS	12,119	0,005 ± 0,001 ^b	0,009 ± 0,000 ^c	0,018 ± 0,001 ^a	0,018 ± 0,001 ^a
22	2-Butenedioic acid	2 TMS	12,3	0,008 ± 0,001 ^a	0,011 ± 0,000 ^a	0,007 ± 0,001 ^a	0,039 ± 0,038 ^a
23	Malic acid	3 TMS	16,028	0,135 ± 0,016 ^b	0,080 ± 0,006 ^a	0,088 ± 0,002 ^a	0,022 ± 0,002 ^c
24	Hexanedioic acid	2 TMS	16,209	0,015 ± 0,003 ^a	0,014 ± 0,001 ^a	0,010 ± 0,001 ^a	0,026 ± 0,006 ^b
25	Citric acid	4 TMS	23,545	0,604 ± 0,025 ^c	1,352 ± 0,061 ^a	1,258 ± 0,015 ^a	1,046 ± 0,075 ^b
26	D-Gluconic acid	6 TMS	27,341	0,062 ± 0,005 ^a	0,072 ± 0,005 ^a	0,109 ± 0,005 ^b	0,069 ± 0,004 ^a

Şekerler

27	D-Fructose	5 TMS	24,848	1,493 ± 0,132 ^d	4,234 ± 0,017 ^c	2,185 ± 0,032 ^b	2,869 ± 0,133 ^a
28	D -Galactose	5 TMS	25,223	0,367 ± 0,026 ^c	2,307 ± 0,030 ^b	2,703 ± 0,088 ^a	2,711 ± 0,118 ^a
29	D-Glucose	5 TMS	25,363	7,182 ± 0,465 ^b	3,576 ± 0,007 ^a	3,258 ± 0,038 ^a	3,085 ± 2,319 ^a
30	d-Mannose	5 TMS	25,677	1,282 ± 0,099 ^a	0,661 ± 0,026 ^a	1,399 ± 0,740 ^a	0,986 ± 0,039 ^a
31	Melibiose	8 TMS	39,97	0,093 ± 0,019 ^c	0,143 ± 0,003 ^a	0,126 ± 0,005 ^a	0,084 ± 0,006 ^b

Şeker Alkolleri

32	Xylitol	5 TMS	21,608	0,02 ± 0,002 ^c	0,096 ± 0,007 ^b	0,009 ± 0,001 ^a	0,011 ± 0,001 ^{ac}
33	Inositol	6 TMS	23,94	0,681 ± 0,055 ^c	2,493 ± 0,141 ^b	1,793 ± 0,055 ^a	1,688 ± 0,076 ^a
34	D-Mannitol	6 TMS	25,951	0,012 ± 0,001 ^d	0,575 ± 0,004 ^c	0,125 ± 0,003 ^b	0,733 ± 0,033 ^a
35	D-Glucitol	6 TMS	26,098	0,166 ± 0,016 ^c	0,094 ± 0,007 ^b	0,119 ± 0,002 ^a	0,105 ± 0,006 ^{ab}
36	Scyllo-Inositol	6 TMS	26,405	0,11 ± 0,011 ^c	0,366 ± 0,011 ^a	0,336 ± 0,014 ^a	0,286 ± 0,011 ^b
37	Myo-Inositol	6 TMS	28,884	0,25 ± 0,018 ^c	0,856 ± 0,051 ^b	0,672 ± 0,017 ^a	0,677 ± 0,035 ^a

Bir satır içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

Çalışma kapsamında fermente edilen ve edilmeyen kraker örneklerinde 12 adet aminoasit tespit edilmiştir. Bu örneklerde alanin, valin, prolin, glisin, serin, treonin, β -alanin, aspartik asit, glutamik asit, asparajin, ornitin ve triptofan aminoasitlerinin bulunduğu saptanmıştır. Özellikle valin, treonin ve triptofan diyetle alınması gereken esansiyel aminoasitler olmaları nedeniyle önemlidir [145].

Örneklerde bulunan alanin, tüm proteinlerin yapısına katılması dolayısıyla önemli bir esansiyel olmayan aminoasittir [146]. Alanin içeriği fermente edilmemiş AC örnekleri için ortalama 0,05 ve fermente edilmiş AT1, AT2 ve AT3 grupları için sırasıyla 0,355; 0,193 ve 0,161 mg/kg olarak saptanmıştır. *S. cerevisiae* suşu kullanılması durumunda fermantasyon sonucunda alanin içeriğinin fermantasyona tabi tutulmayan ve *S. boulardii* ile fermente edilmiş kraker örneklerine göre daha fazla olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

Valin ise protein sentezinde kullanılan, hayvansal ve bitkisel gıdalardan alınabilen esansiyel bir aminoasittir [147]. AC örneklerinde ortalama 0,02 mg/kg valin bulunurken, fermente edilmiş AT1, AT2 ve AT3 örneklerinde 0,136, 0,114 ve 0,113 mg/kg olarak bulunmuştur. Valin içeriğinde fermantasyon prosesi uygulandıktan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0.05$). Bu durumda fermantasyonla valin içeriğinin yükseldiği görülmüştür. Ancak *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* ile fermente edilen ürünler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Prolin aminoasidi protein sentezi ve metabolik aktivitelerin yanı sıra, yaraların iyileşmesi ve bağışıklık sisteminde görev almaktadır [148]. AC grubunda 0,123 mg/kg olarak bulunan prolin, *S. cerevisiae* ile fermente edilen AT1 örneklerinde ortalama 0,208 mg/kg olarak bulunurken, *S. boulardii* ile fermente edilen AT2 ve AT3 gruplarında 0,245 ve 0,211 mg/kg olarak bulunmuştur. Bu durumda fermente edilmemiş örneklerde prolin miktarı fermente edilen örneklere göre istatistiksel olarak daha düşüktür ($p < 0.05$). Fermantasyonda kullanılan mikroorganizmaların prolin içeriği üzerinde ayrıca bir etkisi olmadığı saptanmıştır.

Glisin merkezi sinir sistemi üzerinde etkisi bulunan; antioksidan, anti-inflamatuar ve bağışıklık sistemi düzenleyici bir aminoasittir [149]. AC örneklerinde içeriği 0,017 mg/kg düzeyindeyken; AT1, AT2 ve AT3 örneklerinde 0,127;0,083 ve 0,088 mg/kg olduğu saptanmıştır. Serin folat ve metionin döngülerinde rol oynarken, aynı zamanda sülfür içeren aminoasitlerin sentezinde kilit rol oynamaktadır [150]. AC örneklerinde ortalama 0,013; AT1’de 0,103; AT2’de 0,086 ve AT3’te 0,081 mg/kg bulunmaktadır. Treonin lipid metabolizması ve protein sentezi üzerine etkili bir aminoasittir [151]. AC örneklerinde ortalama 0,013; AT1’de 0,142; AT2’de 0,112 ve AT3’te 0,106 mg/kg bulunmaktadır.

β -Alanin AC örneklerinde ortalama 0,008; AT1’de 0,026; AT2’de 0,010 ve AT3’te 0,011 mg/kg bulunmaktadır. Aspartik asit vücutta amonyağın çevriminde rol oynamaktadır [152]. Fermente edilmemiş AC örneklerinde 0,033 mg/kg bulunurken, fermente edilen AT1, AT2 ve AT3 örneklerinde kilogram ürün başına sırasıyla 0,180; 0,087 ve 0,084 mg bulunmaktadır. Ornitin kreatin sentezinin ilk basamağında rol oynayan bir aminoasittir [153]. Fermantasyon öncesi kraker içeriğinde tespit edilmezken, fermantasyonla birlikte içeriğinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p<0.05$). Gerçekleştirilen istatistiksel hesaplamalar sonucunda, fermente edilmeyen AC örneklerinden farklı olarak yalnızca *S. cerevisiae* ile fermente edilmiş AT1 örneklerinde glisin, serin, treonin, β -alanin ve aspartik asit miktarlarının arttığı görülmüştür. Asparajin içeriği AC grubunda 0,08 iken, *S. cerevisiae* ile fermente edilmiş örneklerde ortalama kilogram başına 0,057; *S. boulardii* ile fermente edilen örneklerde ise 0,013 ve 0,012 mg olarak bulunmaktadır. İstatistiksel hesaplamalar sonucunda, *suş farklılığından bağımsız olarak* fermente edilen örneklerde asparajin miktarında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$).

Triptofan miktarı kraker ürünlerinde fermente olmayan örneklerde 0,004; fermente olan örneklerde ise kilogram başına 0,009; 0,013 ve 0,09 mg bulunmaktadır. Fermantasyon sayesinde *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanılan örnek gruplarında triptofan içeriğinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğu görülmektedir ($p<0.05$).

Örnek içeriklerinde saptanan yağ asitleri linoleik, oleik, palmitik ve stearik asitlerdir. Bu yağ asitleri daha önce çalışma kapsamında gerçekleştirilmiş olan “Yağ asidi kompozisyonu tayini” bölümünde de kraker örneklerinin içeriğinde saptanan majör yağ asitleridir. Yani yağ asidi kompozisyonu tayini sonucunda elde edilen veriler, birincil metabolit analizi sonucunda elde edilen verilerle örtüşmektedir. Ürünlerin içeriğinde bulunan yağ asitleriyle ilgili ayrıntılı bilgi “Yağ asidi kompozisyonu tayini” bölümünde tartışılmıştır.

Organik asit grubunda laktik ve asetik asit içeriği dikkat çekerken; propanedioik, propanoik, 2-bütanedioik, malik, hekzanedioik, bütanoik, sitrik ve glukonik asitlere de rastlanmıştır. Asetik asitin fermente olmamış ürün gruplarında daha az bulunduğu ancak fermente edilmiş örneklerinde beklendiği üzere içeriğin yükseldiği tespit edilmiştir.

Laktik asit, fermantasyon sonucu özellikle laktik asit bakterilerinin oluşturduğu bir organik asittir. Ancak endüstride faj kontaminasyonu endişesi dolayısıyla laktik asit bakterilerinin kullanımından daha güvenli bir yol olan *S. cerevisiae* kullanılarak laktik asit üretimi teşvik edilmektedir. *S. cerevisiae* laktat dehidrojenaz (*ldh*) geni sayesinde laktik asit üretebilmektedir [154]. *S. boulardii*’nin de laktik asit üretme yeteneği olduğu bildirilmiştir [155]. Kraker örneklerinde fermente edilmemiş AC ürünlerinde laktik asit içeriği 0,011 mg/kg iken, fermantasyonla birlikte AT1, AT2 ve AT3 örneklerinde sırasıyla kilogram ürün başına 1,379; 1,139 ve 1,637 mg’a çıktığı görülmektedir. İstatistiksel analizler sonucunda fermente edilmemiş kraker ürünleriyle karşılaştırıldığında, fermantasyon ile ürün içeriğindeki laktik asit miktarının anlamlı düzeyde farklı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

Asetik asit *S. cerevisiae*’nin fermantasyon sonucu ürettiği bir yan üründür [156]. Ayrıca *S. boulardii*’nin bakteri gelişimine karşı inhibe edici bir ajan olarak asetik asit üretebildiği belirtilmiştir [157]. AC ürünlerinde ortalama 0,003 mg/kg olarak bulunan asetik asit, fermente edilmiş AT1, AT2 ve AT3 örneklerinde kilogram başına 0,01; 0,009 ve 0,006 mg bulunmaktadır. İstatistiksel analizler sonucunda fermantasyon ile ürün içeriğindeki miktarların anlamlı düzeyde arttığı görülmektedir ($p < 0.05$).

Propanedioik, bir diğer ismiyle malonik asit hücre içinde yağ asidi sentezinde kullanılmaktadır [158]. Kraker örneklerinde fermente edilmeyen ürün grubunda 0,017 olarak bulunmuştur. Fermente edilen AT1, AT2 ve AT3 ürünlerinde ise kilogram başına 0,039; 0,037 ve 0,031 mg bulunduğu kaydedilmiştir. Bu örnek grubunda fermantasyonla malonik asit içeriğinin anlamlı düzeyde arttığı, *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* ile fermantasyonda malonik asit miktarını aynı düzeyde arttırdığı görülmüştür ($p < 0.05$).

Bütanedioik asit, diğer adıyla süksinik asit *S. boulardii* tarafından kullanılmadığından dolayı, *S. boulardii* kullanılarak fermente edilen ürünlerde birikebilen bir asittir [159]. Fermente edilmemiş AC örneklerinde 0,01 mg/kg bulunan süksinik asit seviyesi, fermantasyon sonrası AT1 örneklerinde 0,040; AT2 örneklerinde 0,184 ve AT3 örneklerinde 0,115 mg/kg seviyesine kadar artmıştır. İstatistiksel analizler sonucunda AC ile karşılaştırıldığında, AT1 örnekleri arasında anlamlı fark görülmezken, *S. boulardii* ile fermente edilen AT2 ve AT3 örneklerinde süksinik asit oranında anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$).

Propanoik (propiyonik) asit gıdalarda koruyucu görevi gören bir organik asittir [160,161]. AC örneğinin içerisinde 0,005 mg/kg olarak bulunan propanoik asit miktarı, fermente edilmiş örneklerde AT1 için 0,009; AT2 için 0,018 ve AT3 için 0,018 mg/kg saptanmıştır. Fermantasyon prosesiyle birlikte istatistiksel düzeyde anlamlı artış gösteren bu oran, *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanımı açısından da farklılıklara sahiptir ($p < 0.05$). Kraker formülasyonuna sahip fermente örneklerde *S. boulardii* kullanımı propiyonik asit miktarını *S. cerevisiae* kullanımından daha fazla yükseltmiştir.

Malik asit gıdalarda tat/aroma arttırıcı olarak kullanılan dört karbonlu dikarboksilik bir asittir [162]. Kraker formülasyonuna sahip ürünlerde, AC grubunda malik asit miktarı 0,135 mg/kg olarak ölçülmüştür. AT1, AT2 ve AT3 ürünlerinde ise bu miktarlar sırasıyla kilogram başına 0,080; 0,088 ve 0,022 mg'dır. Fermantasyonla birlikte kraker ürünlerindeki malik asit içeriği istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($p < 0.05$).

Sitrik asit, özellikle süt ürünlerinde *S. boulardii*'nin sitrik asidi parçalayamaması nedeniyle birikebilen bir asittir [159]. AC ürünlerinde sitrik asit miktarı 0,604'ken AT1, AT2 ve AT3'te sırasıyla 1,352; 1,258 ve 1,046 mg/kg'a yükselmiştir. Fermantasyonla birlikte tüm ürünlerin içeriğindeki sitrik asit miktarı artarken, AT1 ve AT2 ürünlerindeki artış kendi içlerinde anlamlı bir fark teşkil etmemektedir ($p < 0.05$).

Glukonik asit gıdalara eklenebilen, özellikle et, süt ve şarapçılık endüstrisinde kullanılan bir şeker asididir [163]. Hem kraker örneklerinde glukonik asit içeriği fermantasyonla veya farklı suşların kullanımıyla değişmemiştir ($p < 0.05$). AC grubunda 0,062 mg/kg bulunan glukonik asit; AT1, AT2 ve AT3 gruplarında 0,072; 0,109 ve 0,069 mg/kg bulunmaktadır.

Literatürde bulunan farklı çalışmalar sonucunda benzer soya bazlı örneklerde glutarik, glukonik, fumarik, asetik, laktik, sitrik ve benzoik asitlerin saptandığı belirtilmiştir [164]. Ancak çalışmalar benzer olsa da son ürünlerde saptanabilen organik asitlerin varlığının; fermantasyon ortamı ve normu, kullanılan mikroorganizmalar ve kullanılan hammaddelerin durumu gibi birçok etkene bağlı olduğu da vurgulanmaktadır [165].

Şekerler ve şeker alkoller grubunda fruktoz, glukoz, galaktoz, mannoz ve melibioz saptanmıştır. Literatür verileri ile karşılaştırma yapıldığında ise, benzer örneklerde, çalışmalar sonucunda saptanan birincil metabolitler maltoz, ksilitol, galaktoz, inositol ve türevleridir [166]. Bu grupta dikkat çeken en önemli metabolitlerden biri soya içeriğinde bulunan ve anti-diyabetik bir ajan olan Inositol'dür [167]. Tüm örneklerde inositol, siklo-inositol ve miyo-inositol formunda saptanmıştır.

Fruktoz *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* tarafından karbon kaynağı olarak kullanılabilen altı karbonlu bir ketozdur [168,169]. AC ürünlerinde 1,493 mg/kg bulunan fruktoz; AT1'de 4,234; AT2'de 2,185 ve AT3'te 2,869 mg/kg olarak saptanmıştır. Glukoz *S. cerevisiae* ve *S. boulardii*'nin fermantasyonda kullandığı başlıca karbon kaynağıdır [170]. AC ürünlerinde 7,182 olarak bulunan glukoz; AT1'de 3,576; AT2'de 3,258 ve AT3'te 3,085 mg/kg olarak bulunmuştur. Bu durumda fermantasyonla glukoz içeriği anlamlı olarak

düşerken, farklı suş kullanımının glukoz içeriği üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı saptanmıştır ($p < 0.05$).

Şeker alkolleri grubunda ise örnek içeriklerinde ilk olarak ksilitol saptanmıştır. Ksilitol düşük kalorili olması nedeniyle endüstride şeker ikamesi olarak kullanılabilir [171]. AC örneklerinde 0,02 mg/kg olarak bulunan ksilitol; AT1 örneklerinde 0,096; AT2 örneklerinde 0,009 ve AT3 örneklerinde 0,011 mg/kg bulunmaktadır. Fermantasyonla birlikte kraker örneklerindeki ksilitol içeriğinin yükseldiği görülmüştür. Ayrıca *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanılarak elde edilen ürünlerde *S. cerevisiae*'nin ksilitol içeriğini daha fazla yükselttiği istatistiksel olarak anlamlı düzeyde saptanmıştır ($p < 0.05$).

İnositol soya fasülyesi içeriğinde bulunduğu bilinen bir bileşendir [172]. Kraker ürünlerinde inositol, siklo-inositol ve myo-inositol formlarında bulunmaktadır. Toplam olarak AC ürünlerinde 1,041; AT1'de 3,715; AT2'de 2,801 ve AT3'te 2,651 mg/kg bulunmaktadır. Kraker ürünlerinde fermantasyonla birlikte anlamlı düzeyde artış görülmüştür. Ayrıca *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanımı inositol içeriğini farklı şekilde yükseltmiştir. *S. cerevisiae* ile fermente edilen ürünlerde inositol içeriğindeki artışın, *S. boulardii* ile fermente edilen ürünlerden daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.12. Kurabiye örneklerine ait birincil metabolit analizi sonuçları

Grup Adı ve #	Metabolit Adı	Derivatizasyon	Rt (dk)	BC (mg/kg)	BT1 (mg/kg)	BT2 (mg/kg)	BT3 (mg/kg)
Aminoasitler							
1	L-Alanine	2 TMS	6,459	0,011 ± 0,004 ^c	0,142 ± 0,018 ^b	0,065 ± 0,002 ^a	0,066 ± 0,002 ^a
2	L-Valine	TMS	9,126	0,030 ± 0,002 ^d	0,229 ± 0,003 ^c	0,209 ± 0,000 ^b	0,197 ± 0,007 ^a
3	L-Proline	2 TMS	11,09	0,111 ± 0,004 ^b	0,176 ± 0,006 ^a	0,196 ± 0,022 ^a	0,198 ± 0,004 ^a
4	Glycine	3 TMS	11,371	0,046 ± 0,002 ^a	0,056 ± 0,016 ^a	0,048 ± 0,002 ^a	0,049 ± 0,001 ^a
5	Serine	3 TMS	12,854	0,023 ± 0,001 ^a	0,051 ± 0,001 ^b	0,024 ± 0,005 ^a	0,022 ± 0,003 ^a
6	L-Threonine	3 TMS	13,536	0,034 ± 0,003 ^a	0,096 ± 0,015 ^b	0,049 ± 0,013 ^a	0,047 ± 0,004 ^a
7	β-Alanine	TMS	14,364	0,019 ± 0,001 ^a	0,021 ± 0,003 ^a	0,022 ± 0,018 ^a	0,021 ± 0,001 ^a
8	L-Aspartic acid	3 TMS	16,756	0,072 ± 0,005 ^a	0,040 ± 0,004 ^a	0,045 ± 0,036 ^a	0,048 ± 0,015 ^a
9	L-Glutamic acid	3 TMS	19,035	0,084 ± 0,010 ^a	0,085 ± 0,007 ^a	0,085 ± 0,002 ^a	0,084 ± 0,007 ^a
10	L-Asparagine	2 TMS	20,178	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi
11	L-Ornithine	5 TMS	23,332	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi
12	L-Tryptophan	TMS	30,829	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi
Yağ Asitleri							
13	9,12-Octadecadienoic acid (Linoleik asit)	TMS	30,401	0,261 ± 0,016 ^c	0,406 ± 0,004 ^b	0,373 ± 0,011 ^a	0,360 ± 0,012 ^a
14	9-Octadecenoic acid (Oleik asit)	TMS	30,495	0,298 ± 0,036 ^b	0,217 ± 0,007 ^a	0,209 ± 0,027 ^a	0,203 ± 0,024 ^a
15	Palmitic Acid	TMS	27,434	0,394 ± 0,018 ^b	0,434 ± 0,007 ^a	0,407 ± 0,009 ^{ab}	0,411 ± 0,014 ^{ab}
16	Stearic acid	TMS	30,949	0,171 ± 0,037 ^a	0,159 ± 0,132 ^a	0,135 ± 0,017 ^a	0,131 ± 0,007 ^a

Organik Asitler

17	Lactic Acid	TMS	5,584	0,067 ± 0,003 ^c	1,087 ± 0,008 ^b	0,766 ± 0,085 ^a	0,756 ± 0,030 ^a
18	Acetic acid	TMS	5,865	0,005 ± 0,001 ^b	0,025 ± 0,001 ^a	0,021 ± 0,003 ^a	0,020 ± 0,003 ^a
19	Propanedioic acid (Malonic Acid)	2 TMS	8,818	0,015 ± 0,004 ^a	0,021 ± 0,001 ^b	0,020 ± 0,001 ^a	0,020 ± 0,002 ^a
20	Butanedioic acid	2 TMS	11,491	0,012 ± 0,001 ^b	0,011 ± 0,000 ^b	0,068 ± 0,017 ^a	0,064 ± 0,008 ^a
21	Propanoic acid	TMS	12,119	0,019 ± 0,002 ^a	0,026 ± 0,021 ^a	0,037 ± 0,002 ^a	0,036 ± 0,004 ^a
22	2-Butenedioic acid	2 TMS	12,3	0,013 ± 0,003 ^a	0,014 ± 0,002 ^a	0,015 ± 0,000 ^a	0,014 ± 0,004 ^a
23	Malic acid	3 TMS	16,028	0,114 ± 0,009 ^a	0,096 ± 0,001 ^{ab}	0,100 ± 0,005 ^{ab}	0,087 ± 0,009 ^b
24	Hexanedioic acid	2 TMS	16,209	0,016 ± 0,011 ^b	0,136 ± 0,033 ^a	0,105 ± 0,000 ^a	0,091 ± 0,040 ^a
25	Citric acid	4 TMS	23,545	1,852 ± 0,099 ^b	2,602 ± 0,319 ^a	2,607 ± 0,310 ^a	2,264 ± 0,189 ^{ab}
26	D-Gluconic acid	6 TMS	27,341	0,193 ± 0,008 ^a	0,195 ± 0,036 ^a	0,228 ± 0,036 ^a	0,196 ± 0,014 ^a

Şekerler

27	D-Fructose	5 TMS	24,848	6,967 ± 0,112 ^b	2,437 ± 0,010 ^a	2,482 ± 0,069 ^a	2,476 ± 0,016 ^a
28	D -Galactose	5 TMS	25,223	1,983 ± 0,060 ^b	1,388 ± 0,168 ^a	1,768 ± 0,131 ^b	1,741 ± 0,165 ^b
29	D-Glucose	5 TMS	25,363	7,814 ± 0,375 ^b	1,170 ± 0,166 ^a	1,723 ± 0,788 ^a	1,720 ± 0,264 ^a
30	d-Mannose	5 TMS	25,677	3,139 ± 0,083 ^b	0,106 ± 0,001 ^a	0,243 ± 0,113 ^a	0,247 ± 0,007 ^a
31	Melibiose	8 TMS	39,97	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi

Şeker Alkolleri

32	Xylitol	5 TMS	21,608	0,012 ± 0,002 ^a	0,015 ± 0,001 ^a	0,013 ± 0,005 ^a	0,013 ± 0,002 ^a
33	Inositol	6 TMS	23,94	1,592 ± 0,068 ^a	2,470 ± 0,176 ^b	1,919 ± 0,294 ^{ab}	1,901 ± 0,242 ^a
34	D-Mannitol	6 TMS	25,951	0,068 ± 0,018 ^b	0,784 ± 0,098 ^a	0,785 ± 0,075 ^a	0,792 ± 0,055 ^a
35	D-Glucitol	6 TMS	26,098	0,081 ± 0,004 ^a	0,139 ± 0,031 ^a	0,126 ± 0,028 ^a	0,127 ± 0,017 ^a
36	Scyllo-Inositol	6 TMS	26,405	0,179 ± 0,022 ^a	0,275 ± 0,012 ^b	0,203 ± 0,002 ^a	0,207 ± 0,003 ^a
37	Myo-Inositol	6 TMS	28,884	0,168 ± 0,023 ^b	0,328 ± 0,015 ^a	0,273 ± 0,041 ^a	0,269 ± 0,028 ^a

Bir satır içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

Çalışma kapsamında fermente edilen ve edilmeyen kurabiye örneklerinde toplam 9 adet aminoasit tespit edilmiştir. Örneklerin içeriğinde valin, prolin, glisin, serin, treonin, β -alanin, aspartik asit ve glutamik asit olduğu görülmektedir. Özellikle valin, treonin ve triptofan diyetle alınması gereken esansiyel aminoasitler olmaları nedeniyle oldukça önemlidir [145].

Alanin içeriği BC örnekleri için ortalama 0,011 mg/kg ve fermente edilmiş BT1, BT2 ve BT3 grupları için sırasıyla 0,142; 0,065 ve 0,066 mg/kg olarak ölçülmüştür. Fermantasyon sonucunda alanin içeriğinin arttığı, *S. cerevisiae* ile fermente edilen örneklerde alanin miktarının *S. boulardii* ile fermente edilmiş örneklerle göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür ($p < 0.05$).

Kurabiye örneklerinde valin içeriği, BC grubunda ortalama 0,030 mg/kg olarak bulunurken, fermente edilmiş BT1, BT2 ve BT3 örneklerinde 0,229, 0,209 ve 0,197 mg/kg olarak bulunmuştur. Fermantasyon işleminin uygulanmış olması, kurabiye örneklerindeki valin içeriğini istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır ($p < 0.05$).

Fermente edilmemiş kurabiye örneklerinde ortalama prolin içeriği 0,111 mg/kg olarak bulunurken, *S. cerevisiae* ile fermente edilen BT1 örneklerinde bu değer 0,176 mg/kg'dır. Ayrıca *S. boulardii* kullanılarak fermantasyon sonucu elde edilen BT2 ve BT3 örneklerinde sırasıyla 0,196 ve 0,198 mg/kg prolin bulunduğu görülmektedir. Prolin içeriğinde fermantasyonla birlikte artış yaşandığı ancak kullanılan farklı suşlarla fermantasyonun, örnekler arasında karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür ($p < 0.05$). Bu durumda prolin içeriğine etki söz konusu olduğunda *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* arasında herhangi bir farklılık saptanmamıştır.

Kurabiye örneklerinde glisin, β -alanin, aspartik asit ve glutamik asit içeriğinde, fermente örnekler ve fermente edilmemiş örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür ($p < 0.05$).

Serin ve treonin aminoasitleri için, BC örneklerinin içeriğinde 0,023, BT1 içeriğinde 0,051; BT2 içeriğinde 0,024 ve BT3 içeriğinde 0,022 mg/kg serin bulunduğu görülmüştür. Treonin ise BC örneklerinin içeriğinde 0,034, BT1 içeriğinde 0,096; BT2 içeriğinde 0,049 ve BT3 içeriğinde 0,047 mg/kg olarak bulunmaktadır. BC örneklerinden farklı olarak yalnızca *S. cerevisiae* ile fermente edilmiş BT1 örneklerinde serin ve treonin miktarlarının anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p < 0.05$). *S. boulardii* ile fermente edilen örneklerde bu miktarlar fermentasyon ile değişmemiştir.

Örnek içeriklerinde saptanan yağ asitleri linoleik, oleik, palmitik ve stearik asitlerdir. Bu yağ asitleri daha önce çalışma kapsamında gerçekleştirilmiş olan “Yağ asidi kompozisyonu tayini” bölümünde de kraker ve kurabiye örneklerinin içeriğinde saptanan majör yağ asitleridir. Yani yağ asidi kompozisyonu tayini sonucunda elde edilen veriler, birincil metabolit analizi sonucunda elde edilen verilerle örtüşmektedir. Ürünlerin içeriğinde bulunan yağ asitleriyle ilgili ayrıntılı bilgi “Yağ asidi kompozisyonu tayini” bölümünde verilmiştir.

Organik asit grubunda fermentasyon için önem arz eden laktik ve asetik asit içeriği dikkat çekerken; propanedioik, propanoik, 2-bütanedioik, malik, hekzanedioik, bütanoik, sitrik ve glukonik asitlere de rastlanmıştır. Asetik asitin fermente olmamış ürün gruplarında daha az bulunduğu ancak fermente edilmiş örneklerinde beklendiği üzere içeriğin yükseldiği tespit edilmiştir.

Kurabiye örneklerinde fermente edilmemiş BC ürününde laktik asit miktarı 0,067 mg/kg’dır. BT1, BT2 ve BT3 ürünlerinde ise kilogram başına laktik asit miktarı 1,087; 0,766 ve 0,756 olarak kaydedilmiştir. Bu örnek grubunda fermentasyonla birlikte laktik asit miktarının arttığı istatistiksel olarak anlamlı biçimde görülmektedir ($p < 0.05$). *S. cerevisiae* ile fermente edilen BT1 örneğinin laktik asit içeriğinde görülen artış, *S. boulardii* ile fermente edilen BT2 ve BT3 ürünlerinden daha yüksektir. BT2 ve BT3 ürünleri arasında ise anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p < 0.05$).

Asetik asit kraker örneklerinde fermente edilmeyen BC grubunda 0,005; *S. cerevisiae* ile fermente edilen BT1 örneklerinde 0,025; *S. boulardii* ile fermente edilen BT2 ve BT3 örneklerinde ise 0,021 ve 0,02 mg/kg asetik asit bulunmaktadır. Fermantasyonla birlikte asetik asit içeriğinin anlamlı derecede yükseldiği görülürken, kullanılan suşların kendi arasında karşılaştırıldığında anlamlı fark yaratmadığı, yani *S. cerevisiae* ve *S. boulardii*'nin kurabiye örneklerinde asetik asit miktarını aynı düzeyde yükselttiği görülmüştür ($p < 0.05$).

Bütanedioik asit, diğer adıyla süksinik asit BC grubunda 0,012 mg/kg olarak bulunmuş, BT1 ürünlerinde 0,011; BT2 ve BT3 ürünlerinin içeriğinde ise 0,068 ve 0,064 mg/kg olarak ölçülmüştür. Kraker örneklerinde fermantasyon sonucunda yalnızca *S. boulardii* ile fermente edilen BT2 ve BT3 örneklerinde süksinik asit içeriğinde artış olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

Kurabiye ürünlerinin fermantasyon öncesi propiyonik asit miktarı 0,019 iken, fermantasyonla birlikte BT1, BT2 ve BT3 örneklerinde sırasıyla 0,026; 0,037 ve 0,036 mg/kg içeriğe sahip olduğu görülmüştür. Ancak kurabiye formülasyonuna sahip ürünlerde görülen bu değişim, anlamlı bir fark olarak yorumlanmamaktadır ($p < 0.05$).

Kurabiye ürünlerinde, BC grubunda 0,114 mg/kg malik asit bulunurken; BT1 0,096; BT2 0,1 ve BT3 ise 0,087 mg/kg malik asit içermektedir. Malik asit miktarı fermantasyonla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş göstermiştir ($p < 0.05$).

Sitrik asit, özellikle süt ürünlerinde *S. boulardii*'nin sitrik asidi parçalayamaması nedeniyle birikebilen bir asittir [159]. Kurabiye örneklerinde de bu birikim görülebilmektedir. Fermantasyon öncesi 1,852 mg/kg bulunmasının ardından fermantasyon sonrasında 2,6 mg/kg seviyelerine kadar artış görülmüştür. Bu artış, istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Örneklerdeki glukonik asit içeriği fermantasyonla veya farklı suşların kullanımıyla anlamlı olarak değişmemiştir ($p < 0.05$). BC grubunda 0,193; BT1’de 0,195; BT2’de 0,228 ve BT3’te 0,196 mg/kg bulunmaktadır.

Şekerler ve şeker alkoller grubunda fruktoz, glukoz, galaktoz, mannoz ve melibioz saptanmıştır. BC grubunda 6,976 mg/kg olarak bulunan fruktoz, beklendiği üzere fermantasyonla birlikte daha düşük seviyelere inmiştir. BT1 ürününde 2,437; BT2’de 2,482 ve BT3’te 2,476 mg/kg olarak bulunmuştur. Fermantasyonda *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanımı kendi arasında anlamlı bir fark yaratmamıştır ($p < 0.05$). Galaktoz miktarı BC, BT2 ve BT3 gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı olarak değişmemiş ve sabit kalmıştır. Ancak BT1 grubunda galaktoz içeriği anlamlı şekilde azalmıştır ($p < 0.05$).

Glukoz *S. cerevisiae* ve *S. boulardii*’nin fermantasyonda kullandığı başlıca karbon kaynağıdır [170]. BC ürünlerinde 7,814 mg/kg bulunurken; BT1’de 1,170; BT2’de 1,723 ve BT3’te 1,720 mg/kg olarak bulunmuştur. Her iki örnek grubunda da fermantasyonla glukoz içeriği anlamlı olarak düşerken, farklı suş kullanımının glukoz içeriği üzerine etkisi olmadığı saptanmıştır ($p < 0.05$).

Ksilitol, fermantasyon öncesinde 0,012 mg/kg bulunurken, fermantasyon sonrası ürünlerde BT1’de 0,015; BT2 ve BT3’te 0,013 mg/kg düzeyinde bulunmaktadır. Kurabiye ürünlerinde fermantasyon öncesi ve sonrası örneklerde ksilitol miktarında herhangi bir anlamlı fark görülmemiştir ($p < 0.05$).

Kurabiye ürünlerinde inositol, siklo-inositol ve myo-inositol formları bulunmaktadır. Toplam olarak BC ürünlerinde 1,939 mg/kg olarak hesaplanmıştır. BT1, BT2 ve BT3 ürünlerinde sırasıyla kilogram başına 3,072; 2,395 ve 2,377 mg/kg olarak bulunmuştur. *S. cerevisiae* ile fermente edilen ürünlerde inositol içeriğindeki artışın, *S. boulardii* ile fermente edilen ürünlerden istatistiksel düzeyde daha fazla olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

Fermantasyon şekerlerin kullanılarak organik asitlere ve şeker alkollerine dönüştürülmesidir [173]. Çalışmalar sonunda elde edilen verilere göre fermantasyon sonrasında şekerlerin toplam metabolitler içerisindeki oranı azalmıştır. Bu durumun yanı sıra organik asit ve şeker alkollerinin oranlarının ise arttığı görülmektedir. Böylece kraker ve kurabiye örneklerinde beklendiği gibi fermantasyonun gerçekleştiği sonucu çıkarılabilir. Kraker ve kurabiye ürünleri için yapılan analizlerin formülasyona özel olarak optimize edilmesi gerekmektedir. Ayrıca fermantasyonla postbiyotik potansiyel taşıması için önemli olduğu belirtilen bazı bileşenler açısından, kontrol örnekleri ile karşılaştırılmalı olacak şekilde bir genel kompozisyon ortaya koyulmuştur.

4.5.5. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Son ürünlerde fermantasyon sırasında farklı kültür kullanımına bağlı olarak gerçekleşebilecek antioksidan aktivite değişimlerinin ortaya koyulabilmesi için ABTS metodu ile analiz gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde hesaplanan tüm veriler trolox eşdeğeri (TEAC) cinsinden verilmiştir. Elde edilen veriler kraker örnekleri için Çizelge 4.13 ve kurabiye örnekleri için Çizelge 4.14'te yer almaktadır.

Çizelge 4.13. Kraker örnekleri için antioksidan aktivite sonuçları

Ürün Kodu	%İnhibisyon	Antioksidan Aktivite (mM TEAC/g DW*)	Ortalama Antioksidan Aktivite (mM TEAC/g DW*)
AC	40,236	2,628	2,630 ± 0,008 ^c
	40,367	2,636	
	40,105	2,619	
	40,367	2,636	
	58,191	3,822	
AT1	58,191	3,822	3,762 ± 0,071 ^b
	56,094	3,684	
	56,619	3,719	
	58,716	3,877	
	58,978	3,894	
AT2	62,910	4,154	4,024 ± 0,160 ^a
	63,172	4,171	
	58,585	3,956	
	58,978	3,982	
	57,929	3,913	
AT3	58,322	3,939	3,948 ± 0,029 ^a

Farklı harflere sahip değerler (ortalama $\pm$ SD, n=4) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p<0.05$. DW: Dry weight, kuru madde cinsinden verilmiştir.

Çalışma kapsamında geliştirilen ürünlerde, AC örneklerinde antioksidan aktivite kuru madde cinsinden 2,6 mM TEAC/g seviyelerinde tespit edilmiştir. Aktiviteler AT1, AT2 ve AT3 gruplarında ise sırasıyla yaklaşık 3,76; 4,02 ve 3,95 olarak hesaplanmıştır. Fermantasyon öncesinde 2,5 seviyelerinde bulunan aktivitenin *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanıldığı durumda arttığı görülmüştür. AT2 ve AT3 grupları arasında istatistiksel bir fark görülmemesine karşın, AT1 ve AC grubu örneklerle göre *S. boulardii* ile fermente edilen örnekler daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Ayrıca AT1 grubu örneklerinde de fermantasyonla antioksidan aktivitenin anlamlı düzeyde yükseldiği gözlenmiştir ($p < 0.05$). Fermente örnekler kendi arasında karşılaştırıldığında, suş seçiminin antioksidan aktiviteye etkisi daha net görülebilmektedir. Bu durumda *S. boulardii* ile fermente edilen kraker örneklerinde aktivite, *S. cerevisiae* ile fermente edilen örneklerden daha fazla yükselmiştir.

Çizelge 4.14. Kurabiye örnekleri için antioksidan aktivite sonuçları

Ürün Kodu	%İnhibisyon	Antioksidan Aktivite (mM TEAC/g DW*)	Ortalama Antioksidan Aktivite (mM TEAC/g DW*)
BC	47,313	4,047	3,981 $\pm$ 0,059 ^b
	47,510	4,013	
	52,425	3,920	
	52,621	3,943	
	61,206	5,436	
BT1	60,944	5,413	5,570 $\pm$ 0,169 ^a
	64,220	5,704	
	64,482	5,727	
	63,794	5,653	
	64,106	5,681	
BT2	62,857	5,570	5,625 $\pm$ 0,050 ^a
	63,169	5,598	
	65,211	5,780	
	65,832	5,835	
	61,173	5,422	
BT3	61,484	5,450	5,622 $\pm$ 0,216 ^a

Farklı harflere sahip değerler (ortalama $\pm$ SD, n=4) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p<0.05$. DW: Dry weight, kuru madde cinsinden verilmiştir.

Kurabiye örneklerinde BC grubunda antioksidan aktivite kuru madde cinsinden yaklaşık 3,9 mM TEAC/g seviyesinde tespit edilmiştir. Aktiviteler BT1, BT2 ve BT3 gruplarında ise sırasıyla yaklaşık 5,57; 5,63 ve 5,62'dir. Fermantasyon öncesinde 3,9 seviyelerinde bulunan aktivitenin *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanıldığı durumda anlamlı biçimde arttığı görülmüştür ($p < 0.05$). BT1, BT2 ve BT3 grupları arasında istatistiksel bir fark görülmemesine karşın, BC kontrol grubu fermente örneklerle göre yaklaşık %20 daha düşük aktivite göstermiştir. Ayrıca *S. boulardii* ve *S. cerevisiae* suşları, fermente kurabiye örneklerinde antioksidan aktivitenin yükselmesi durumunda aynı etkiyi göstermiştir.

Fermente soya unu ile gerçekleştirilen bir çalışmada 48 saatlik fermantasyon sonucunda belirli oranlarda soya unu içeren formülasyonlara sahip krakerlerle gerçekleştirilen bir başka çalışmada antioksidan aktivite ortalama kuru madde cinsinden 2,54 mM TE/g olarak hesaplanmıştır [174]. Bu durumda literatür ile karşılaştırıldığında elde edilen örneklerin yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu söylenebilmektedir.

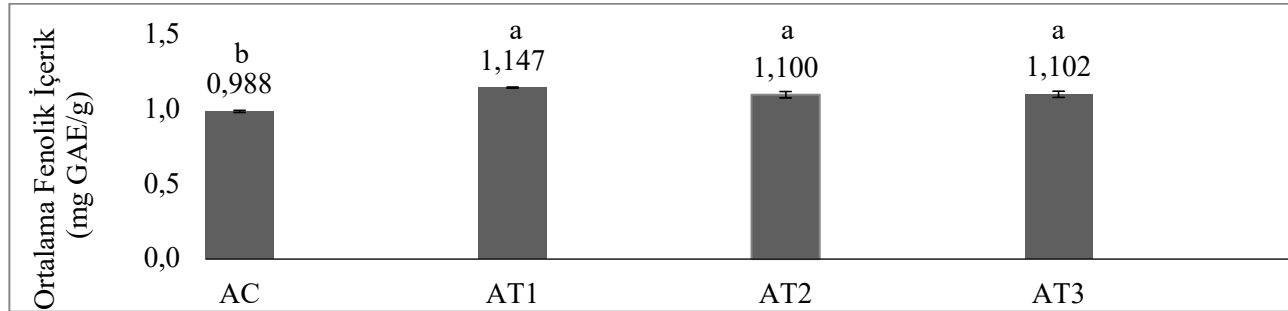
4.5.6. Toplam Fenolik İçeriğin Belirlenmesi

Son ürünlerde fermantasyon sırasında farklı kültür kullanımına bağlı olarak gerçekleşebilecek toplam fenolik içerikteki (TPC) değişimlerinin ortaya koyulabilmesi için analiz gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde hesaplanan tüm veriler mg gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden verilmiştir. Hesaplanan veriler kraker örnekleri için Çizelge 4.15 ve Şekil 4.9'da; kurabiye örnekleri için Çizelge 4.16 ve Şekil 4.10'da yer almaktadır.

Çizelge 4.15. Kraker örnekleri için toplam fenolik içeriklere ait deney sonuçları

Örnek Kodu	Denklem Sonucu	Toplam Fenolik İçerik	Ortalama TPC* (mg GAE/g)		
AC	55,909	0,994	0,988	±	0,007 ^b
	55,182	0,981			
	55,909	0,994			
	55,273	0,983			
AT1	64,727	1,151	1,147	±	0,004 ^a
	64,273	1,143			
	64,636	1,149			
	64,455	1,146			
AT2	60,818	1,081	1,100	±	0,022 ^a
	62,909	1,118			
	60,818	1,081			
	62,909	1,118			
AT3	61,000	1,084	1,102	±	0,021 ^a
	63,000	1,120			
	61,000	1,084			
	63,000	1,120			

*TPC: Total phenolic content/Toplam fenolik içerik, farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=4) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

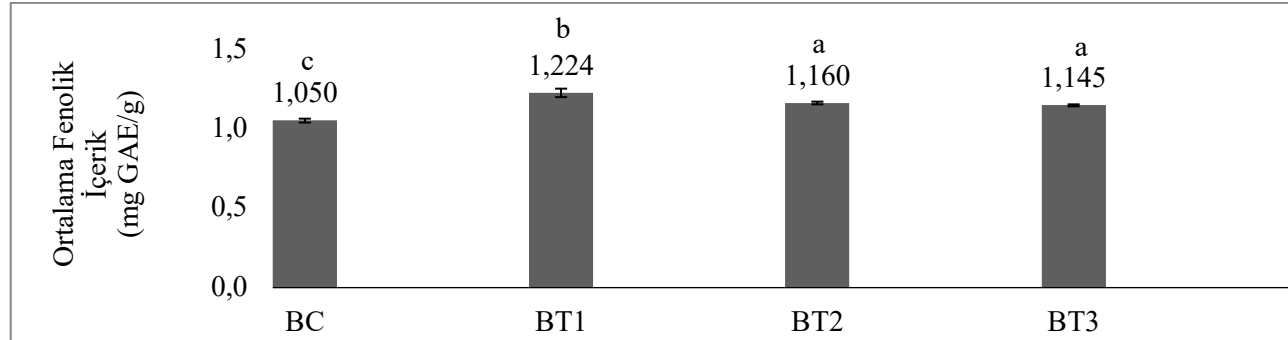


Şekil 4.9. Kraker örnekleri için toplam fenolik içeriklere ait sütun grafikleri

Çizelge 4.16. Kurabiye örnekleri için toplam fenolik içeriklere ait deney sonuçları

Örnek Kodu	Denklem Sonucu	Toplam Fenolik İçerik	Ortalama TPC* (mg GAE/g)		
BC	58,455	1,039	1,050	±	0,012 ^c
	59,636	1,060			
	58,455	1,039			
	59,636	1,060			
BT1	67,545	1,201	1,224	±	0,027 ^b
	70,182	1,248			
	67,545	1,201			
	70,091	1,246			
BT2	65,727	1,168	1,160	±	0,009 ^a
	64,909	1,154			
	65,636	1,167			
	64,818	1,152			
BT3	64,727	1,151	1,145	±	0,006 ^a
	64,273	1,143			
	64,727	1,151			
	64,000	1,138			

*TPC: Total phenolic content/Toplam fenolik içerik, farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=4) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.



Şekil 4.10. Kraker örnekleri için toplam fenolik içeriklere ait sütun grafikleri

Soya unu bazlı olarak farklı suşlar kullanılarak geliştirilen fermente ürünlerde, AC örneklerinde toplam fenolik içeriğin ortalama 0,998 mg GAE/g olduğu tespit edilmiştir. AC grubunun yanı sıra AT1, AT2 ve AT3 gruplarında ise sırasıyla ortalama değerler 1,147; 1,100 ve 1,102'dir. Kullanılan farklı suşlardan bağımsız olarak fermantasyon prosesinin kraker ürünlerinin fenolik içeriğini arttırdığı görülmüştür. Ayrıca *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanılarak fermente edilen ürünler arasında, toplam fenolik içeriğin belirlenmesi sırasında istatistiksel bir fark bulunmadığı saptanmıştır ($p < 0.05$).

Kurabiye örneklerinde ise, BC grubunda fenolik içerik yaklaşık 1,050 mg GAE/g seviyesinde tespit edilmiştir. BT1, BT2 ve BT3 gruplarında ise sırasıyla yaklaşık 1,224; 1,160 ve 1,145 olarak hesaplanmıştır. Fermantasyon öncesinde 1,050 seviyelerinde bulunan içeriğin *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanıldığı durumda arttığı görülmüştür. BT2 ve BT3 grupları arasında istatistiksel bir fark görülmemesine karşın, BT1 ürün grubuna ait fenolik içeriğin daha yüksek olduğu istatistiksel olarak da görülebilmektedir ($p < 0.05$). BC kontrol grubu fermente örneklerle göre yaklaşık %10 daha düşük fenolik içeriğe sahiptir.

Soyadan elde edilen ürünler ile gerçekleştirilen bir çalışmada fenolik içeriğin 0,037 ila 1,039 mg GAE/g olduğu saptanmıştır [175]. Bu durumda fermente soya unu dışında birçok içeriğe sahip olan ve tez çalışması kapsamında elde edilen fermente kraker ve kurabiye örneklerinin hem fermantasyon prosesi uygulanmadan hem de *S. cerevisiae* ve de *S. boulardii* suşları ile fermente edildiği durumda yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu söylenebilir.

4.6. Son Üründe Duyusal Özelliklerin Belirlenmesi

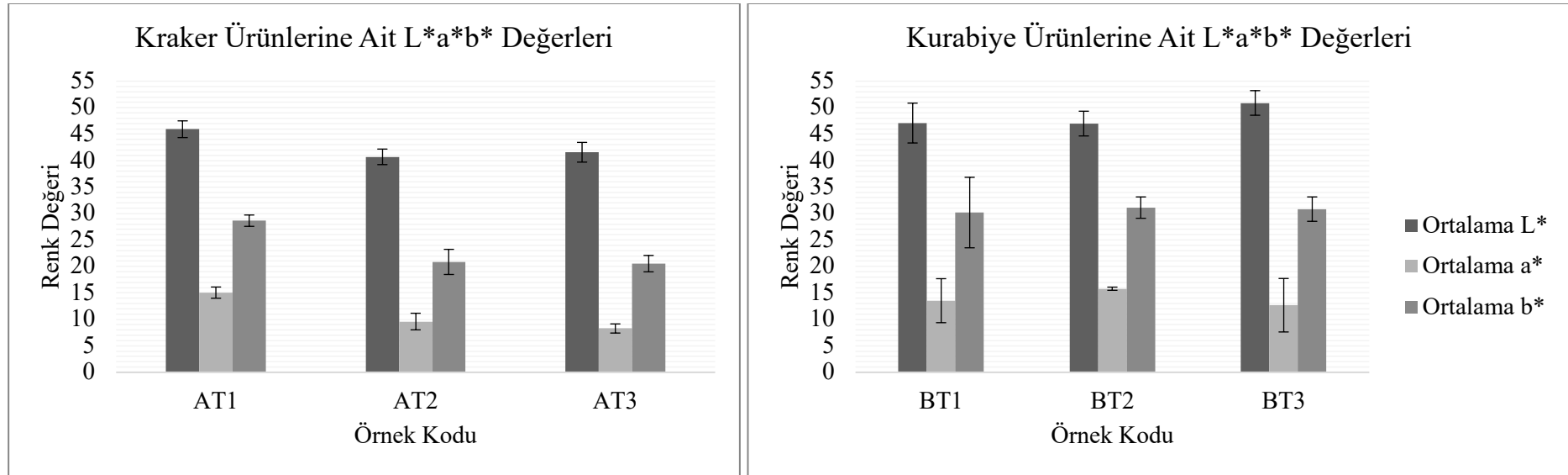
4.6.1. Renk Analizi

Tez çalışması kapsamında geliştirilen son ürünlere uygulanan çeşitli kimyasal analizlerin ardından, son ürünlere renk analizi uygulanmıştır. Kraker ve kurabiye örneklerine ait renk değerlerine Çizelge 4.17 ve Şekil 4.11'de yer verilirken, iki örnek grubu için elde edilen ham verilere Ek 1.10'da yer verilmiştir.

Çizelge 4.17. Kraker ve kurabiye örnekleri için renk analizine ait sonuçlar

Örnek Kodu	Ortalama L*	Ortalama a*	Ortalama b*	Ortalama ΔE
AT1	45,93	15,07	28,65	19,04 ± 2,23 ^a
AT2	40,71	9,60	20,86	28,13 ± 1,41 ^b
AT3	41,58	8,29	20,53	27,08 ± 2,09 ^b
BT1	47,10	13,54	30,19	22,87 ± 8,20 ^a
BT2	47,00	15,80	31,12	23,10 ± 3,90 ^a
BT3	50,89	12,68	30,84	19,28 ± 3,30 ^a

Kraker ve kurabiye örnek gruplarında kendi içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=6) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.



Şekil 4.11. Kraker ve kurabiye örnekleri için renk analizine ait sütun grafikleri

Renk sonuçları verilirken ΔL , Δa , Δb ve ΔE değerlerinin hesaplanması sırasında, AT1, AT2 ve AT3 grupları hesaplanırken AC kontrol grubu ile; BT1, BT2 ve BT3 grupları hesaplanırken ise BC grubu verileri dikkate alınarak hesaplama yapılmıştır. L^* , a^* ve b^* değerleri ayrı olarak incelendiğinde en yüksek L^* değerine sahip örneğin, ortalama 45,93 ile AT1 olduğu görülmüştür. AT2 ve AT3 örneklerine ait L^* değeri sırasıyla 40,71 ve 41,58'dir. AT1 grubu beyazlık seviyesi en yüksek kraker örneğidir. Beyazlık değerlerinin yanı sıra a^* yani kırmızılık değeri olarak en yüksek ortalamaya sahip örnek 15,07 ile AT1'dir. Ardından 9,60 ile AT2 ve 8,29 ile AT3 gelmektedir. Sarılık derecesini ifade eden b^* değeri ise L^* ve a^* değerlerine benzer şekilde AT1 grubunda 28,65 olmak üzere en yüksektir. Kraker grubunda renk analizi sonucunda AT1 örneklerine ait ΔE değeri ortalama 19.04 olarak hesaplanırken, AT2 grubu 28,13 ve AT3 grubu 27,08 olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan ΔE değerlerine uygulanan istatistiksel analizler sonucunda kraker örneklerinde AT2 ve AT3 ürünleri arasında fark gözlenmezken, bu iki ürün grubu AT1 örneklerinden farklı özellik göstermiştir ($p < 0.05$).

Kurabiye örneklerinde L^* , a^* ve b^* değerleri incelendiğinde en yüksek L^* değerine sahip örneğin, ortalama 50,89 ile BT3 olduğu görülmüştür. BT1 ve BT2 örneklerine ait L^* değeri sırasıyla 47,1 ve 47,0'dır. BT3 örnekleri beyazlık seviyesi en yüksek kurabiye örneğidir. Ayrıca a^* değeri olarak en yüksek ortalamaya sahip örnek 15,80 ile BT2'dir. Ardından 13,51 ile BT1 ve 12,68 ile BT3 gelmektedir. Sarılık derecesini ifade eden b^* değeri ise BT2 örneklerinde 31,12 olmak üzere en yüksektir. Kurabiye örneklerinde ise BT1 grubunda ΔE değeri ortalama 22,87 olarak hesaplanmıştır. Bu değer BT2 örnekleri için 23,11 iken, BT3 örnekleri için ise 19,28'dir. Kurabiye örnekleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadığı saptanmıştır ($p < 0.05$).

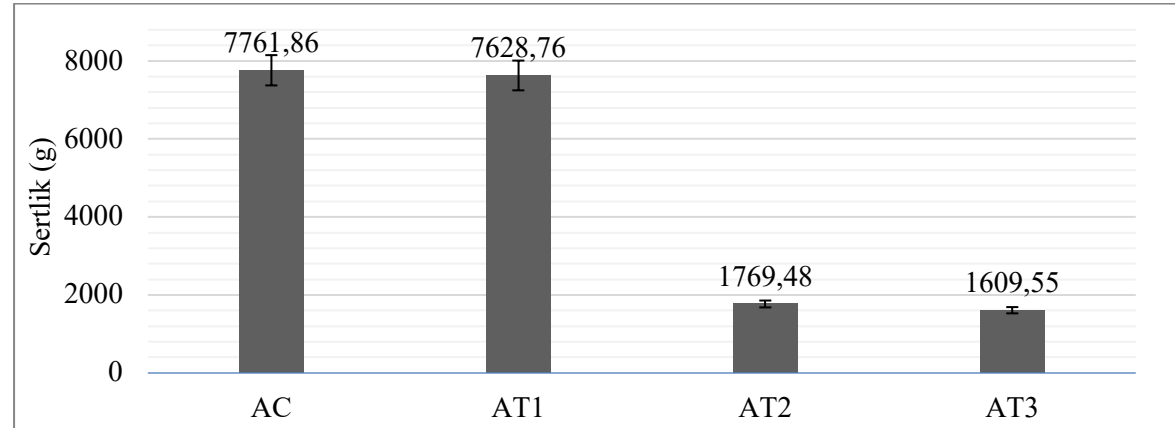
4.6.2. Tekstür Analizi

Tez çalışması kapsamında geliştirilen kraker ve kurabiye ürünlerinde ortaya çıkmış olabilecek tekstürel farklılıkların ortaya koyulabilmesi için tekstür analizi uygulanmıştır. Kraker örneklerine verilere Çizelge 4.18 ve Şekil 4.12'de; kurabiye örneklerine ait verilere Çizelge 4.19 ve Şekil 4.13'te yer verilmiştir. Ayrıca örneklere ait tekstürel özellikleri belirten grafikler Ek 1.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. Kraker örneklerine ait tekstürel analiz sonuçları

Örnek Kodu	Sertlik (g)	Ortalama Sertlik (g)
AC	6376,47	7761,86 ± 1535,18 ^a
	9412,31	
	7496,78	
AT1	6854,68	7628,76 ± 1843,66 ^a
	9733,26	
	6298,34	
AT2	1467,53	1769,48 ± 858,15 ^b
	2737,80	
	1103,12	
AT3	1610,29	1609,55 ± 167,90 ^b
	1777,08	
	1441,29	

Örnek gruplarında kendi içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

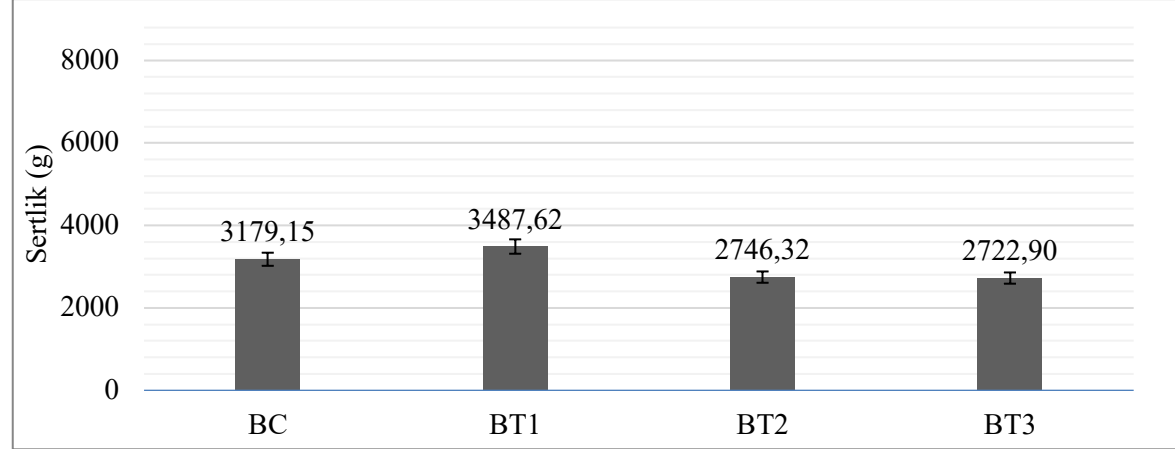


Şekil 4.12. Kraker örneklerine ait tekstürel analiz için sütun grafikleri

Çizelge 4.19. Kurabiye örneklerine ait tekstürel analiz sonuçları

Örnek Kodu	Sertlik (g)	Ortalama Sertlik (g)
BC	3573,24	3179,15 ± 338,40 ^a
	3217,25	
	2746,96	
BT1	3826,06	3487,62 ± 478,59 ^a
	2810,79	
	3826,00	
BT2	2936,62	2746,32 ± 264,01 ^a
	2372,97	
	2929,37	
BT3	3691,19	2722,90 ± 1505,70 ^a
	3881,16	
	596,34	

Örnek gruplarında kendi içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.



Şekil 4.13. Kurabiye örneklerine ait tekstürel analiz için sütun grafikleri

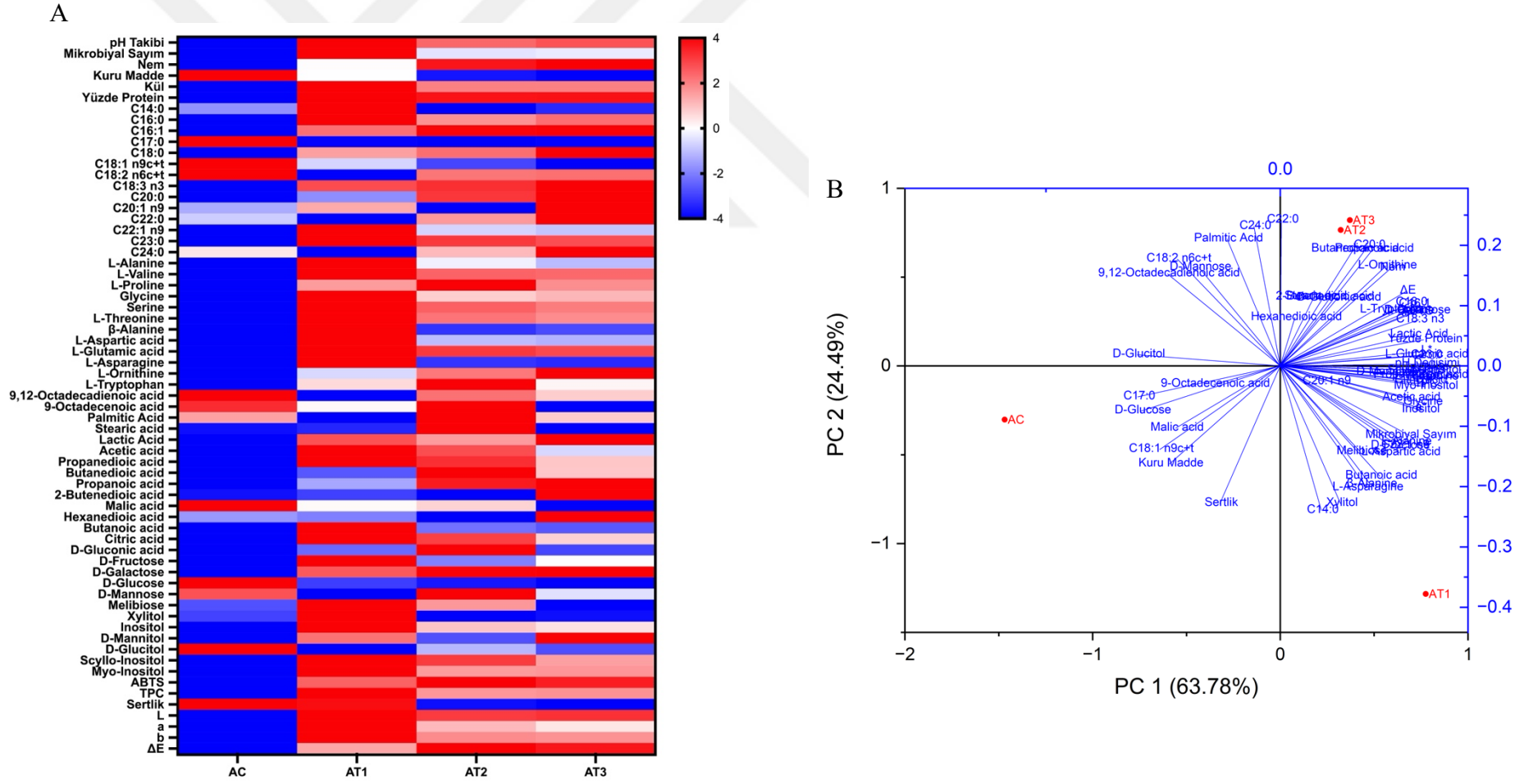
Tez çalışması kapsamında geliştirilen kraker örneklerinde AC kontrol örneklerine ait sertlik değeri ortalama 7761,86'dır. AT1, AT2 ve AT3 örneklerinde ise sırasıyla 7628,76; 1769,48 ve 1609,55 g olarak hesaplanmıştır. Kraker örneklerinde en yüksek sertliğe sahip örnek AC iken, en düşük seviye AT3 örneklerine aittir. *S. cerevisiae* ile fermente edilen örneklerin sertliği kontrol örneklerinden farklılık göstermezken, *S. boulardii* ile fermente edilen örneklerin sertlik seviyesinin fermantasyonla azaldığı istatistiksel olarak da görülebilmektedir ($p < 0.05$).

Kurabiye örneklerinde ise, BC grubunda sertlik yaklaşık 3179,15 g seviyesinde tespit edilmiştir. Sertlikler BT1, BT2 ve BT3 ürünlerinde ise sırasıyla 3487,62; 2746,32 ve 2722,9 g olarak ölçülmüştür. Kurabiye örneklerinde en yüksek sertliğe sahip örnek BT1 iken, en düşük seviye BT3 örneklerine aittir. Fermantasyon işlemi uygulanmış ve uygulanmamış örnekler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, suş farklılıkları da dahil olmak üzere fermantasyonun kurabiye örneklerine tekstürel düzeyde bir etkisi olmadığı görülmüştür ($p < 0.05$).

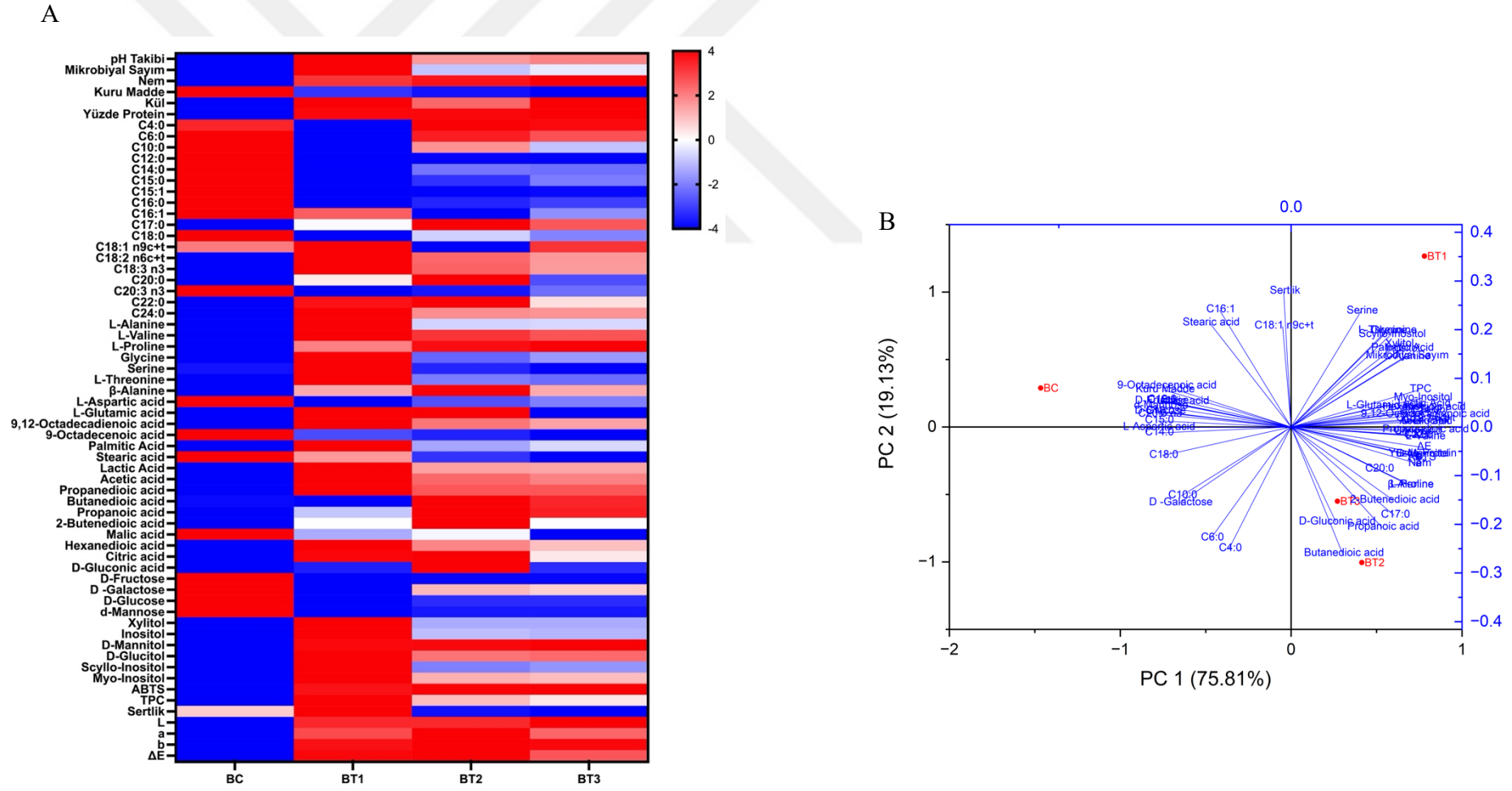
4.7. Isı Haritası ve Temel Bileşen Analizi

Çalışmada kraker ve kurabiye örneklerinin tamamı için kimyasal ve duyuşsal analizlere ait sonuçları kapsayan ısı haritası ve temel bileşen analizleri uygulanmıştır. Fermantasyon prosesinin ve bu proseste farklı suş kullanımının ürünler üzerindeki etkisinin açıklanabilmesi amacıyla, elde edilen tüm veri kümelerindeki değerlerin ısı haritası ve temel bileşen grafiklerinde ifade edildiği veriler normalize edilmiştir.

Tez çalışması sonucunda kraker örnekleri için normalize edilmiş verilere göre ısı haritası ve temel bileşen analizi sonuçları Şekil 4.14'te verilmiştir. Kurabiye örnekleri için ise analiz verileri Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Kraker örnekleri için elde edilen ısı haritası (A) ve temel bileşen analizi (B) sonuçları



Şekil 4.15. Kurabiye örnekleri için elde edilen ısı haritası (A) ve temel bileşen analizi (B) sonuçları

Şekil 4.14 ve 4.15'te görülen renk skalası örneklere göre otomatik olarak ölçeklendirilen, +4 ile -4 arasında normalleştirilmiş analiz değerlerinin yoğunluklarını temsil ederken, koyu kırmızı ve mavi sırasıyla yüksek ve düşük tepe yoğunluklarını temsil etmektedir. Bu çalışmada elde edilen ısı haritaları genel olarak değerlendirildiğinde protein, antioksidan aktivite, fenolik içerik, organik asitler ve amino asitler ile şeker alkollerini bakımından fermantasyona tabi tutulmayan örnekler ve *S. cerevisiae* ile *S. boulardii* ayrı ayrı fermantasyonda kullanıldığında elde edilen örnekler için postbiyotik kraker ve kurabiye bileşiminin biyokimyasal parmak izini göstermektedir. Çalışmada önceden değerlendirmeye alınan ve anlamlı fark gözlenen tüm analizler için yapılan istatistiksel değerlendirmeler ile ısı haritası profili uyumludur.

Örnek profillerinin ısı haritası ile modüle edilmesinde fermente ürünlerin baskın biçimde görünmesinin yanısıra, Şekil 4.14 ve 4.15'te görüldüğü gibi, *S. cerevisiae* ile probiyotik *S. boulardii*'nin fermantasyonda kullanılması nedeniyle çeşitli değişkenlik ve dalgalanmalar izlenebilmektedir. Ancak fermente ürünler için yapılan tüm analiz sonuçlarına bağlı değişiklikler temel alındığında, temel bileşen analizi sonuçlarına göre hem kraker hem de kurabiye örnekleri ilk iki ana bileşenle temsil edildiğinde, ısı haritasında gözlenen dalgalanmalara rağmen örneklerin kendi içinde kümelenemediği saptanmıştır.

Kraker örnekleri fermantasyona bağlı olarak üç ayrı gruba ayrılmıştır (sırasıyla %63,78 ve %24,49; Şekil 4.14). Gözlenen üç grup şu şekildedir:

1. Fermantasyon işlemine tabi tutulmamış AC grubu
2. *S. cerevisiae* ATCC 9763 ile fermente edilmiş AT1 grubu
3. *S. boulardii* CNCM-I 745 ve HUF16M3H11104 ile fermente edilmiş AT2 ve AT3 grubu.

Kurabiye örneklerinde de kraker örneklerine benzer biçimde üç grup gözlenmiştir (sırasıyla %75,81 ve %19,13; Şekil 4.15). Gözlenen gruplar aşağıdaki gibidir:

1. Fermantasyon işlemine tabi tutulmamış BC grubu
2. *S. cerevisiae* ATCC 9763 ile fermente edilmiş BT1 grubu
3. *S. boulardii* CNCM-I 745 ve HUF16M3H11104 ile fermente edilmiş BT2 ve BT3 grubu.

Kraker ve kurabiye ürünlerinde saptanan bu üç grubun kümelenme modelleri hem fermantasyonun hem de *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanımının son ürün farklılığı üzerindeki etkisini vurgulamaktadır. Genel olarak, son ürünlerde farklı *S. boulardii* suşları (*S. boulardii* CNCM-I 745 ve HUF16M3H11104) kullanımının protein, antioksidan aktivite, fenolik içerik, organik asitler ve amino asitler ile şeker alkollerini bakımından farklı bir etkisi olmazken, *S. cerevisiae* kullanılan kraker ve kurabiye örnekleri kimyasal ve duyuşsal analizler bir arada ele alındığında tamamen ayrı şekilde kümelenmiştir. Bu sonuç fermantasyon proseslerinde *S. cerevisiae* gibi *S. boulardii*'nin de kullanılarak postbiyotik gıdaların geliştirilmesi için öngörü sağlayabilir.

5. YORUM

Fermantasyon prosesi uzun yıllardır gıdalarda istenen özelliklerin geliştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Fermantasyon ile gıdaların raf ömrünün uzatılması, duyuusal ve besinsel değerin arttırılması, sindirilebilirlik ve biyoyararlanım gibi etkilerin geliştirilmesi mümkündür. Ayrıca fermente gıdalar probiyotik ve postbiyotik etkiler sayesinde gıda endüstrisinde önemli bir yere sahiptir.

Bu tez çalışmasının amacı probiyotik etkisi kanıtlanmış bir maya olan *S. boulardii*'nin soya unu bazlı kraker ve kurabiye ürünlerinde kullanımının araştırılmasıdır.

Bu amaçla, varolan kültür koleksiyonunda bulunan *S. cerevisiae* suşları arasından *S. boulardii* suşlarının ayrımı ve belirlenen suşlar kullanılarak bitki bazlı fermente gıda üretimi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda, *S. boulardii* ve soya unu bazlı fermente hamur kullanılarak kraker ve kurabiye ürünleri geliştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda;

- FoodOmics Laboratuvarı kültür koleksiyonunda (HUF) bulunan, daha önce *S. cerevisiae* olarak tanımlanan maya suşları canlandırılmış ve saflık kontrolleri yapılmıştır.
- Canlandırılan suşlara belirlenen sıcaklıklarda ve farklı pH'da gelişim ile, glukoz galaktoz kullanımı olmak üzere biyokimyasal testler uygulanmıştır. HUF kodlu 16M3B11021 ve 17M3D31089 numaralı suşların yalnızca pH 6,3 seviyesinde gelişebildiği, buna karşın 16M3H11104 numaralı suşun 745 numaralı *S. boulardii* kontrol suşu ile benzer biçimde pH 6,3; 3,0 ve 2,5 seviyelerinde gelişerek aynı düzeydeki düşük pH değerlerine dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Biyokimyasal testler sonucunda; 37 ve 45 °C'de gelişebilen, galaktozu fermente edemeyen ve pH 2,5 seviyesinde gelişebilen HUF16M3H11104 suşunun *S. boulardii* olma potansiyeli olduğu saptanmıştır.
- Biyokimyasal seviyede ayrımın desteklenmesi için HUF16M3H11104 suşunun DNA tabanlı qPCR-HRM tekniği ile ayrımı çalışması yürütülmüştür. qPCR-HRM

analizi sayesinde *S. boulardii*'nin referans *S. cerevisiae* suşlarından ayrımının sağlanması için bu çalışmada tasarlanan *AAD15* genine spesifik bir primer çifti kullanılmıştır. Test edilen mikroorganizmalara ait erime sıcaklıkları arasında bulunan farklara dayanarak, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ayrım sağlanmış ve HUF16M3H11104 suşunun *S. boulardii* suşu olabileceği gösterilmiştir.

- Önceki analizler sonucunda kullanılmasına karar verilen *S. cerevisiae* ATCC 9763, *S. boulardii* CNCM-I 745 ve *S. boulardii* HUF16M3H11104 olmak üzere üç farklı suşu içeren ve bu çalışmaya özel olarak geliştirilen soya unu bazlı kraker ve kurabiye ürün formülasyonları, fermantasyon takibi yapılarak son ürün haline getirilmiştir. Fermantasyonda kraker ve kurabiye ürünleri için pH takibi ve mikrobiyal sayım sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, *S. cerevisiae* ile fermente edilen kraker ve kurabiye hamurlarında pH değişiminin ve canlı mikroorganizma sayısının *S. boulardii* ile fermente edilen örneklerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca 48 saatlik inkübasyon periyodunun, elde edilen pH ve canlı mikroorganizma sayısının değişim eğilimine göre hem kraker hem de kurabiye örnekleri için 24. saat sonunda bitirilebileceği anlaşılmıştır.
- Elde edilen son ürünlere uygulanan nem, kuru madde ve kül analizi sonucunda fermantasyonla birlikte ürünlerde nem oranının yükseldiği ve kül oranının değişmediği görülmüştür. Fermantasyonda kullanılan suş farklılığının kraker ve kurabiye örneklerinin fermente edilmemiş ürünlerle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmadığı saptanmıştır.
- Postbiyotik ürünlerde fermantasyon sonunda mikrobiyal protein içeriğinin artması beklenir. Bu çalışmada kraker ve kurabiye örneklerinde, ürünler kendi arasında karşılaştırıldığında fermantasyonun sonunda protein içeriğinin beklendiği gibi arttığı anlaşılmıştır. *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanımıyla suş farklılıklarının ise protein içeriğinin artışı için istatistiksel olarak anlamlı bir farka neden olmadığı söylenebilir.
- Yağ asidi kompozisyonu tayini sonucunda, ürün içeriğinde bulunan bileşenlere uygun bir yağ asidi profili elde edilmiştir. Bu analiz sayesinde belirli formülasyonlarda üretilen, üretiminde *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* suşları kullanılan kraker ve kurabiye ürünlerine ait biyokimyasal olarak özgün bir yağ asidi profili çıkarılmıştır.

- GC-MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilen birincil metabolit analiziyle, kraker ve kurabiye ürünlerinde 37 ayrı metabolit saptanmıştır. Bu metabolitlerin ürünlerde bulunma oranları değişiklik gösterebilmekle birlikte, *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* suşlarının ayrı ayrı kullanımı ile bu mikroorganizmalara özgün biyokimyasal parmak izi çıkarılmıştır. İnsanlarda önemli fizyolojik işlevleri bulunduğu belirtilen birincil metabolitler için, bu metabolitlerin günlük olarak uygun dozda alımı ilgili sağlık etkilerinin ortaya çıkmasında önemlidir. Diyetle alınan birincil metabolitlerin insan sağlığı üzerindeki performansı literatür tarafından kabul edilmektedir. Ancak fermente gıdaların günlük diyetle kullanımının beklenen etkileri ortaya çıkarıp çıkarmadığı ayrıca bir araştırma konusudur.
- Son ürünlerde antioksidan aktivitenin belirlenmesi analizi ile kraker ve kurabiye ürünlerinde, fermantasyonun suş farklılıklarından bağımsız biçimde antioksidan aktivitenin yükselmesini sağladığı anlaşılmıştır. Kraker örneklerinde *S. boulardii* ile fermente edilen ürünlerde, *S. cerevisiae* ile fermente edilmiş ürünlerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ve artan bir antioksidan aktivite elde edilmiştir. Kurabiye ürünlerinde ise *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* ile fermente edilen ürünler arasında bu açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir. Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi analizi ile hem kraker hem de kurabiye ürünlerinde, fermantasyon ile ürünlere ait fenolik içeriğin arttığı belirlenmiştir.
- Son ürünlerde duyuşsal özelliklerin belirlenmesi için bu çalışma kapsamında renk ve tekstür analizleri uygulanmıştır. Renk analizi sonucunda kraker örneklerinde *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* kullanımının anlamlı farka neden olduğu, *S. boulardii* kullanılarak fermente edilen ürünlere ait renk değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Kurabiye örneklerinde ise farklı suş kullanımının istatistiksel olarak anlamlı bir farka neden olmadığı saptanmıştır. Tekstür analizi ile kraker ve kurabiye ürünlerinin sertlik değerleri ölçülmüştür. Kraker örneklerinde *S. cerevisiae* ile fermente edilen ürünlerle, fermente edilmemiş örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Ancak *S. boulardii* ile fermente edilen kraker örnekleri, *S. cerevisiae* ve fermente edilmemiş örneklere göre daha düşük sertlik seviyesine sahiptir. Kurabiye örneklerinde ise suş farklılıkları veya fermantasyon, ürünlerin sertlik değeri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır.

- Tez çalışması kapsamında elde edilen tüm analiz verileri normalize edilmiş, kraker ve kurabiye ürünlerinde fermantasyonun ve farklı suş kullanımı etkilerinin araştırılması için ısı haritası ve temel bileşen analizi kullanılmıştır. Bu sayede fermantasyon nedeniyle gözlemlenen tüm analiz sonuçları için oluşan değişkenlikler veya dalgalanmalar daha ayrıntılı şekilde izlenebilmiştir. Ayrıca temel bileşen analizi sayesinde hem kraker hem de kurabiye örneklerinde tüm analiz sonuçları bir arada yorumlanarak *S. boulardii* kullanımının etkileri, *S. cerevisiae* kullanımından farkı ve genel olarak fermantasyon etkisi nedeniyle elde edilen ürünler arasında çalışmanın amacına uygun ayırım ortaya konmuştur.

Sonuç olarak tez kapsamında *S. boulardii* kullanılarak soya unu bazlı, postbiyotik etkiye sahip, yağ asidi ve birincil metabolit profilleri biyokimyasal analizlerle özgün biçimde ortaya koyulmuş; antioksidan aktivite, fenolik içerik ve protein içeriği gibi önemli etkilerin geliştirildiği son ürünler elde edilmiştir. Ayrıca *S. boulardii* kullanıldığında, endüstride büyük bir ticari hacme sahip ve en sık kullanılan mayalardan biri olan *S. cerevisiae*'dan daha farklı etkiler elde edilebileceği anlaşılmıştır. Kraker formülasyonunda *S. boulardii* kullanımı ile protein içeriği daha zengin, triptofan ve ornitin gibi aminoasitler açısından daha yüksek içeriğe sahip; stearik, linolenik ve araşidik asit içeriği geliştirilmiş ürünler elde edilmiştir. Kurabiye ürünlerinde *S. boulardii* kullanımıyla protein içeriği daha zengin; prolin ve β -alanin aminoasitleri açısından daha yüksek içeriğe sahip; antioksidan aktivitesi daha yüksek, araşidik asit ve heptadekanoik asit içeriği geliştirilmiş ürünler elde edilmiştir. Bu durumda *S. boulardii*'nin soya unu bazlı postbiyotik ürün üretiminde kullanılabileceği ve kullanılması durumunda özellikle istenebilecek bazı özellikleri geliştirebileceği anlaşılmıştır.

Gelecek çalışmalarda ise elde edilen kraker ve kurabiye ürünlerinde duyuusal muayenenin yapılması ve ürünlerin fiziksel özelliklerinin daha ayrıntılı biçimde ortaya koyulması ile soya ürünlerinde önem arz eden izoflavonların araştırılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca insan sağlığını geliştirme potansiyeli bulunan mekanizmaların, fermente gıdalar ve insan sağlığıyla ilişkilendirilmesi için biyoyararlanımı da kapsayan ileri araştırmalar önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] S. Salminen, M.C. Collado, A. Endo, C. Hill, S. Lebeer, E.M.M. Quigley, M.E. Sanders, R. Shamir, J.R. Swann, H. Szajewska, G. Vinderola, The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18 (2021) 649–667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>.
- [2] Prebiotic Foods for Postbiotic Abundance | The Institute for Functional Medicine, (n.d.). <https://www.ifm.org/news-insights/prebiotic-foods-postbiotic-abundance/#> (accessed December 12, 2023).
- [3] R.K. Mortimer, *Evolution and Variation of the Yeast (Saccharomyces) Genome Genetic and Molecular Studies of the Yeast Genome*, 2000. www.genome.org.
- [4] G.G. Stewart, *SACCHAROMYCES | Saccharomyces cerevisiae*, *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (2014) 309–315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5>.
- [5] KEGG BRITE: KEGG Organisms, (2023). https://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?htext=br08601.keg&option=-a&query=sce (accessed December 12, 2023).
- [6] F. Sherman, *Getting Started with Yeast*, 2002. http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/yeast/Index.html.
- [7] A.A. Duina, M.E. Miller, J.B. Keeney, Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system, *Genetics* 197 (2014) 33–48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>.
- [8] E. Casalone, C. Barberio, L. Cappellini, M. Polsinelli, Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology, *Res Microbiol* 156 (2005) 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.008>.
- [9] M. Zakhartsev, M. Reuss, Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature, *FEMS Yeast Res* 18 (2018) 52. <https://doi.org/10.1093/FEMSyr/FOY052>.
- [10] C.K. Ejuama, B.C. Onusiriuka, V. Bakare, T.O. Ndibe, M. Yakubu, E.G. Ademu, Effect of *Saccharomyces cerevisiae* – Induced Fermentation on the Antioxidant Property of Roselle Calyx Aqueous Extract, *European Journal of Biology and Biotechnology* 2 (2021) 33–38. <https://doi.org/10.24018/EJBIO.2021.2.3.201>.

- [11] G.M. Walker, Introduction to Yeasts, *Yeast Physiology and Biotechnology* (1998) 1–10. <https://www.wiley.com/en-us/Yeast+Physiology+and+Biotechnology-p-9780471964469> (accessed December 12, 2023).
- [12] M. Do Socorro Mascarenhas Santos, M. Batistote, C.A.L. Cardoso, The Production of Metabolites by *Saccharomyces Cerevisiae* and its Application in Biotechnological Processes, *Fronteiras* 10 (2021) 174–184. <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2021V10I3.P174-184>.
- [13] G. Wang, M. Huang, J. Nielsen, Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production, *Curr Opin Biotechnol* 48 (2017) 77–84. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2017.03.017>.
- [14] W. Xie, L. Ye, X. Lv, H. Xu, H. Yu, Sequential control of biosynthetic pathways for balanced utilization of metabolic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*, *Metab Eng* 28 (2015) 8–18. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2014.11.007>.
- [15] M. Klein, M. Carrillo, J. Xiberras, Z. ul Islam, S. Swinnen, E. Nevoigt, Towards the exploitation of glycerol's high reducing power in *Saccharomyces cerevisiae*-based bioprocesses, *Metab Eng* 38 (2016) 464–472. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2016.10.008>.
- [16] A. Rodriguez, Y. Chen, S. Khoomrung, E. Özdemir, I. Borodina, J. Nielsen, Comparison of the metabolic response to over-production of p-coumaric acid in two yeast strains, *Metab Eng* 44 (2017) 265–272. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2017.10.013>.
- [17] H. Rabeharindranto, S. Castaño-Cerezo, T. Lautier, L.F. Garcia-Alles, C. Treitz, A. Tholey, G. Truan, Enzyme-fusion strategies for redirecting and improving carotenoid synthesis in *S. cerevisiae*, *Metab Eng Commun* 8 (2019). <https://doi.org/10.1016/J.MEC.2019.E00086>.
- [18] T. Ma, B. Shi, Z. Ye, X. Li, M. Liu, Y. Chen, J. Xia, J. Nielsen, Z. Deng, T. Liu, Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene, *Metab Eng* 52 (2019) 134–142. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2018.11.009>.
- [19] X. Tang, J. Lee, W.N. Chen, Engineering the fatty acid metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biofuel production, *Metab Eng Commun* 2 (2015) 58–66. <https://doi.org/10.1016/J.METENO.2015.06.005>.
- [20] W.C. Generoso, V. Schadeweg, M. Oreb, E. Boles, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of butanol isomers, *Curr Opin Biotechnol* 33 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2014.09.004>.

- [21] R.M. Ferreira, M.J. Mota, R.P. Lopes, S. Sousa, A.M. Gomes, I. Delgadillo, J.A. Saraiva, Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high pressure (15, 25 and 35 MPa) to enhance the production of bioethanol, *Food Research International* 115 (2019) 352–359. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.11.027>.
- [22] A. Krivoruchko, J. Nielsen, Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr Opin Biotechnol* 35 (2015) 7–15. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2014.12.004>.
- [23] J. Lian, S. Mishra, H. Zhao, Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications, *Metab Eng* 50 (2018) 85–108. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2018.04.011>.
- [24] M. Eichenberger, B.J. Lehka, C. Folly, D. Fischer, S. Martens, E. Simón, M. Naesby, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for de novo production of dihydrochalcones with known antioxidant, antidiabetic, and sweet tasting properties, *Metab Eng* 39 (2017) 80–89. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2016.10.019>.
- [25] I.J. Trenchard, C.D. Smolke, Engineering strategies for the fermentative production of plant alkaloids in yeast, *Metab Eng* 30 (2015) 96–104. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2015.05.001>.
- [26] J. Cardenas, N.A. Da Silva, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of triacetic acid lactone, *Metab Eng* 25 (2014) 194–203. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2014.07.008>.
- [27] B. Uranukul, B.M. Woolston, G.R. Fink, G. Stephanopoulos, Biosynthesis of monoethylene glycol in *Saccharomyces cerevisiae* utilizing native glycolytic enzymes, *Metab Eng* 51 (2019) 20–31. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2018.09.012>.
- [28] B. Zirpel, F. Degenhardt, C. Martin, O. Kayser, F. Stehle, Engineering yeasts as platform organisms for cannabinoid biosynthesis, *J Biotechnol* 259 (2017) 204–212. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2017.07.008>.
- [29] L. Klug, G. Daum, Yeast lipid metabolism at a glance, *FEMS Yeast Res* 14 (2014) 369–388. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12141>.
- [30] L. V. McFarland, Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients, *World J Gastroenterol* 16 (2010) 2202–2222. <https://doi.org/10.3748/WJG.V16.I18.2202>.

- [31] *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.) | Taxonomy | UniProt, (n.d.). <https://www.uniprot.org/taxonomy/252598> (accessed December 12, 2023).
- [32] M.N. Hossain, S. Afrin, S. Humayun, M.M. Ahmed, B.K. Saha, Identification and Growth Characterization of a Novel Strain of *Saccharomyces boulardii* Isolated From Soya Paste, *Front Nutr* 7 (2020) 517471. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2020.00027/BIBTEX>.
- [33] Z. Tomicic, R. Colovic, I. Cabarkapa, D. Vukmirovic, O. Djuragic, R. Tomicic, Beneficial properties of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*, *Food and Feed Research* 43 (2016) 103–110. <https://doi.org/10.5937/FFR1602103T>.
- [34] M. Guslandi, P. Giollo, P.A. Testoni, A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15 (2003) 697–698. <https://doi.org/10.1097/00042737-200306000-00017>.
- [35] M. Guslandi, G. Mezzi, M. Sorghi, P.A. Testoni, *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease, *Dig Dis Sci* 45 (2000) 1462–1464. <https://doi.org/10.1023/A:1005588911207>.
- [36] Z. Tomičić, J. Zupan, T. Matos, P. Raspor, Probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* (nom. nud.) modulates adhesive properties of *Candida glabrata*, *Med Mycol* 54 (2016) 835–845. <https://doi.org/10.1093/MMY/MYW026>.
- [37] A. Qamar, S. Aboudola, M. Warny, P. Michetti, C. Pothoulakis, J.T. LaMont, C.P. Kelly, *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice, *Infect Immun* 69 (2001) 2762–2765. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2762-2765.2001>.
- [38] L. Du, R. Hao, D. Xiao, L. Guo, W. Gai, Research on the characteristics and culture conditions of *Saccharomyces boulardii*, *Adv Mat Res* 343–344 (2012) 594–598. <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/AMR.343-344.594>.
- [39] M.A. Lazo-Vélez, S.O. Serna-Saldívar, M.F. Rosales-Medina, M. Tinoco-Alvear, M. Briones-García, Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review, *J Appl Microbiol* 125 (2018) 943–951. <https://doi.org/10.1111/JAM.14037>.
- [40] F. Ansari, S. Alian Samakkhah, A. Bahadori, S.M. Jafari, M. Ziaee, M.T. Khodayari, H. Pourjafar, Health-promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products, *Crit Rev Food Sci Nutr* 63 (2023) 457–485. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1949577>.

- [41] R. Hatoum, S. Labrie, I. Fliss, Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications, *Front Microbiol* 3 (2012) 33922. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2012.00421/BIBTEX>.
- [42] M.M. Bhavbhuti, K.-E. Afaf, R.Z. Iwanski, The Role of Fermentation Reactions in the Generation of Flavor and Aroma of Foods, *Fermentation* (2012) 65–102. <https://doi.org/10.1201/B11876-8/ROLE-FERMENTATION-REACTIONS-GENERATION-FLAVOR-AROMA-FOODS-BHAVBHUTI-MEHTA-AFAF-KAMAL-ELDIN-ROBERT-IWANSKI>.
- [43] B.M. Mehta, Afaf. Kamal-Eldin, R.Z. Iwanski, Fermentation : effects on food properties, (2012). https://www.researchgate.net/publication/281272689_Fermentation_Effects_on_Food_Properties_Edited_by_Bhavbhuti_M_Mehta_Afaf_Kamal-Eldin_and_Robert_Z_Iwanski (accessed December 12, 2023).
- [44] G.H. Fleet, Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety, *Curr Opin Biotechnol* 18 (2007) 170–175. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2007.01.010>.
- [45] E.P. Ryan, A.L. Heuberger, T.L. Weir, B. Barnett, C.D. Broeckling, J.E. Prenni, Rice bran fermented with *saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity, *J Agric Food Chem* 59 (2011) 1862–1870. <https://doi.org/10.1021/JF1038103>.
- [46] R. Zamora-Vega, J.L. Montañez-Soto, H.E. Martínez-Flores, R. Flores-Magallón, C.V. Muñoz-Ruiz, J. Venegas-González, T.D.J. Ariza Ortega, Effect of incorporating prebiotics in coating materials for the microencapsulation of *Saccharomyces boulardii*, *Int J Food Sci Nutr* 63 (2012) 930–935. <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.687364>.
- [47] E. Tranquilino-Rodriguez, H.E. Martinez-Flores, J.O. Rodiles-Lopez, R. Zamora-Vega, R. Salgado-Garciglia, R.E. Perez-Sanchez, Survival rate of *Saccharomyces boulardii* adapted to a functional freeze-dried yogurt: Experimental study related to processing, storage and digestion by Wistar rats, *Functional Foods in Health and Disease* 7 (2017) 98–114. <https://doi.org/10.31989/FFHD.V7I2.319>.
- [48] A. Parrella, E. Caterino, M. Cangiano, E. Criscuolo, C. Russo, M. Lavorgna, M. Isidori, Antioxidant properties of different milk fermented with lactic acid bacteria and yeast, *Int J Food Sci Technol* 47 (2012) 2493–2502. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2012.03127.X>.

- [49] S. Moslehi-Jenabian, L.L. Pedersen, L. Jespersen, Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health, *Nutrients* 2 (2010) 449–473. <https://doi.org/10.3390/NU2040449>.
- [50] K. Rajkowska, A. Kunicka-Styczyńska, A. Rygala, A. Kunicka-Styczyn, B. Ska, A. Rygał, Probiotic Activity of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* Against Human Pathogens, *Food Technol Biotechnol* (2012). <https://www.researchgate.net/publication/279598203>.
- [51] N. Değirmencioğlu, O. Gurbuz, Y. Şahan, The Monitoring, Via an In vitro Digestion System, of the Bioactive Content of Vegetable Juice Fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*, *J Food Process Preserv* 40 (2016) 798–811. <https://doi.org/10.1111/JFPP.12704>.
- [52] M.Z.A. Chan, S.Q. Liu, Fortifying foods with synbiotic and postbiotic preparations of the probiotic yeast, *Saccharomyces boulardii*, *Curr Opin Food Sci* 43 (2022) 216–224. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2021.12.009>.
- [53] A. Sarwar, T. Aziz, S. Al-Dalali, X. Zhao, J. Zhang, J. Ud Din, C. Chen, Y. Cao, Z. Yang, Physicochemical and Microbiological Properties of Synbiotic Yogurt Made with Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii* in Combination with Inulin, *Foods* 2019, Vol. 8, Page 468 8 (2019) 468. <https://doi.org/10.3390/FOODS8100468>.
- [54] F. Rengel dos Passos, K. Lopes Maestre, B. Florêncio da Silva, A.C. Rodrigues, C. Contini Triques, H. Alves Garcia, M.R. Fagundes-Klen, E. Antonio da Silva, M.L. Fiorese, Production of a synbiotic composed of galacto-oligosaccharides and *Saccharomyces boulardii* using enzymatic-fermentative method, *Food Chem* 353 (2021) 129486. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129486>.
- [55] A. Sarwar, T. Aziz, S. Al-Dalali, J. Zhang, J. ud Din, C. Chen, Y. Cao, H. Fatima, Z. Yang, Characterization of synbiotic ice cream made with probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in combination with inulin, *LWT* 141 (2021) 110910. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.110910>.
- [56] L.C. Silva, H. de Souza Lago, M.O.T. Rocha, V.S. de Oliveira, R. Laureano-Melo, E.T.G. Stutz, B.P. de Paula, J.F.P. Martins, R.H. Luchese, A.F. Guerra, P. Rodrigues, Craft Beers Fermented by Potential Probiotic Yeast or Lacticaseibacilli Strains Promote Antidepressant-Like Behavior in Swiss Webster Mice, *Probiotics Antimicrob Proteins* 13 (2021) 698–708. <https://doi.org/10.1007/S12602-020-09736-6/METRICS>.
- [57] B. Pereira de Paula, H. de Souza Lago, L. Firmino, W.J. Fernandes Lemos Júnior, M. Ferreira Dutra Corrêa, A. Fioravante Guerra, K. Signori Pereira, M.A. Zarur Coelho, Technological features of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* for

- potential probiotic wheat beer development, LWT 135 (2021) 110233. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110233>.
- [58] B. Senkarcinova, I.A. Graça Dias, J. Nespor, T. Branyik, Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, LWT 100 (2019) 362–367. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.10.082>.
- [59] R.V. Santana, D.C. dos Santos, A.C.A. Santana, J.G. de Oliveira Filho, A.B. de Almeida, T.M. de Lima, F.G. Silva, M.B. Egea, Quality parameters and sensorial profile of clarified “Cerrado” cashew juice supplemented with *Sacharomyces boulardii* and different sweeteners, LWT 128 (2020) 109319. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109319>.
- [60] J. Cielecka-Piontek, M. Dziedziński, O. Szczepaniak, J. Kobus-Cisowska, A. Telichowska, D. Szymanowska, Survival of commercial probiotic strains and their effect on dark chocolate synbiotic snack with raspberry content during the storage and after simulated digestion, Electronic Journal of Biotechnology 48 (2020) 62–71. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2020.09.005>.
- [61] M.Z.A. Chan, H. Lau, S.Y. Lim, S.F.Y. Li, S.Q. Liu, Untargeted LC-QTOF-MS/MS based metabolomics approach for revealing bioactive components in probiotic fermented coffee brews, Food Research International 149 (2021) 110656. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110656>.
- [62] M.Z.A. Chan, S.Q. Liu, Coffee brews as food matrices for delivering probiotics: Opportunities, challenges, and potential health benefits, Trends Food Sci Technol 119 (2022) 227–242. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.11.030>.
- [63] R. Wang, J. Sun, B. Lassabliere, B. Yu, S.Q. Liu, Green tea fermentation with *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and *Lactiplantibacillus plantarum* 299V, LWT 157 (2022) 113081. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.113081>.
- [64] R. Wang, J. Sun, B. Lassabliere, B. Yu, S.Q. Liu, UPLC-Q-TOF-MS based metabolomics and chemometric analyses for green tea fermented with *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and *Lactiplantibacillus plantarum* 299V, Curr Res Food Sci 5 (2022) 471–478. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2022.02.012>.
- [65] Probiotics - International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP), (n.d.). <https://isappscience.org/for-scientists/resources/probiotics/> (accessed December 12, 2023).
- [66] S. Paramithiotis, E.H. Drosinos, The microbiota of spontaneous vegetable fermentations, Fermented Foods: Part I: Biochemistry and Biotechnology (2016)

- 213–230. <https://doi.org/10.1201/B19872-14/MICROBIOTA-SPONTANEOUS-VEGETABLE-FERMENTATIONS-SPIROS-PARAMITHIOTIS-ELEFThERIOS-DROSINOS>.
- [67] A. Staniszewski, M. Kordowska-Wiater, Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application, *Foods* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/FOODS10061306>.
- [68] N.P. Shah, Functional cultures and health benefits, *Int Dairy J* 17 (2007) 1262–1277. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.014>.
- [69] G.R. Gibson, M.B. Roberfroid, Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *J Nutr* 125 (1995) 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/JN/125.6.1401>.
- [70] D. Davani-Davari, M. Negahdaripour, I. Karimzadeh, M. Seifan, M. Mohkam, S.J. Masoumi, A. Berenjian, Y. Ghasemi, Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications, *Foods* 2019, Vol. 8, Page 92 8 (2019) 92. <https://doi.org/10.3390/FOODS8030092>.
- [71] T.C. Pimentel, A.G. Cruz, E. Pereira, W.K. Almeida da Costa, R. da Silva Rocha, G. Targino de Souza Pedrosa, C. dos S. Rocha, J.M. Alves, V.O. Alvarenga, A.S. Sant’Ana, M. Magnani, Postbiotics: An overview of concepts, inactivation technologies, health effects, and driver trends, *Trends Food Sci Technol* 138 (2023) 199–214. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2023.06.009>.
- [72] S.M. Schneider, F. Girard-Pipau, J. Filippi, X. Hébuterne, D. Moyse, G.C. Hinojosa, A. Pompei, P. Rampal, Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition, *World J Gastroenterol* 11 (2005) 6165–6169. <https://doi.org/10.3748/WJG.V11.I39.6165>.
- [73] M. Molska, J. Reguła, M. Rudzińska, M. Świeca, Fatty acids profile, atherogenic and thrombogenic health lipid indices of lyophilized buckwheat sprouts modified with the addition of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Acta Sci Pol Technol Aliment* 19 (2020) 483–490. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.0866>.
- [74] F.M. Mehaya, A.I. El-Shazly, A.N. El-Dein, M.A. Farid, Evaluation of nutritional and physicochemical characteristics of soy yogurt by *Lactobacillus plantarum* KU985432 and *Saccharomyces boulardii* CNCMI-745, *Scientific Reports* 2023 13:1 13 (2023) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40207-4>.
- [75] J.J. Fu, J. Liu, X.P. Wen, G. Zhang, J. Cai, Z. Qiao, Z. An, J. Zheng, L. Li, Unique Probiotic Properties and Bioactive Metabolites of *Saccharomyces boulardii*,

- [76] M. Lukaszewicz, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* – Probiotic Yeast, in: Probiotics, InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/50105>.
- [77] P. Pais, V. Almeida, M. Yilmaz, M.C. Teixeira, *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic?, *Journal of Fungi* 6 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.3390/jof6020078>.
- [78] I. Khatri, R. Tomar, K. Ganesan, G.S. Prasad, S. Subramanian, Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*, *Sci Rep* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00414-2>.
- [79] C. Agrimonti, B. Bottari, M.L.S. Sardaro, N. Marmiroli, Application of real-time PCR (qPCR) for characterization of microbial populations and type of milk in dairy food products, *Crit Rev Food Sci Nutr* 59 (2019) 423–442. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1375893>.
- [80] O. Bazalová, J.Z. Cihlář, Z. Dlouhá, L. Bár, V. Dráb, M. Kavková, Rapid sourdough yeast identification using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis, *J Microbiol Methods* 199 (2022) 106522. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106522>.
- [81] M. Kurosu, M. Kurosu, Biologically Active Molecules from Soybeans, *Soybean and Health* (2011). <https://doi.org/10.5772/18950>.
- [82] S. Sharma, M. Kaur, R. Goyal, B.S. Gill, Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes, *J Food Sci Technol* 51 (2014) 551–557. <https://doi.org/10.1007/S13197-011-0517-7/METRICS>.
- [83] A. Hou, P. Chen, J. Alloatti, D. Li, L. Mozzoni, B. Zhang, A. Shi, Genetic Variability of Seed Sugar Content in Worldwide Soybean Germplasm Collections, *Crop Sci* 49 (2009) 903–912. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2008.05.0256>.
- [84] F.M. Lajolo, M.I. Genovese, Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes, *J Agric Food Chem* 50 (2002) 6592–6598. <https://doi.org/10.1021/JF020191K>.
- [85] L. Mni, M. Lokuruka, Soybean nutritional properties: The good and the bad about soy foods consumption - A review., *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 10 (2010). <https://doi.org/10.4314/AJFAND.V10I4.55335>.

- [86] H. KJ, H. HY, A. AJ, H. S, B. A, N. EP, M. JS, C. GW, Association between alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer, *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 2018–2023. <https://doi.org/10.1093/JNCI/92.24.2018>.
- [87] M. Sasi, S. Kumar, M. Hasan, A. S. R, E. Garcia-Gutierrez, S. Kumari, O. Prakash, L. Nain, A. Sachdev, A. Dahuja, Current trends in the development of soy-based foods containing probiotics and paving the path for soy-synbiotics, *Crit Rev Food Sci Nutr* (2023). <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2078272>.
- [88] M. Messina, Soy and Health Update: Evaluation of the Clinical and Epidemiologic Literature, *Nutrients* 8 (2016). <https://doi.org/10.3390/NU8120754>.
- [89] C. Wijewardana, K.R. Reddy, N. Bellaloui, Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress, *Food Chem* 278 (2019) 92–100. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.11.035>.
- [90] F.-Q. Wang, K. Yao, D.-Z. Wei, F.-Q. Wang, K. Yao, D.-Z. Wei, From Soybean Phytosterols to Steroid Hormones, *Soybean and Health* (2011). <https://doi.org/10.5772/18808>.
- [91] C. Danciu, S. Oana, D.S. Antal, F. Ardelean, A. Rodica Chiş, C. Şoica, F. Andrica, C. Dehelean, V. Brigitha, C. Danciu, S. Oana, D.S. Antal, F. Ardelean, A. Rodica Chiş, C. Şoica, F. Andrica, C. Dehelean, V. Brigitha, New Insights Regarding the Potential Health Benefits of Isoflavones, Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health (2017). <https://doi.org/10.5772/67896>.
- [92] L. Křížová, K. Dadáková, J. Kašparovská, T. Kašparovský, Isoflavones, *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 1076 24 (2019) 1076. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24061076>.
- [93] D.R. Doerge, D.M. Sheehan, Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones., *Environ Health Perspect* 110 (2002) 349–353. <https://doi.org/10.1289/EHP.02110S3349>.
- [94] Y. Pranoto, S. Anggrahini, Z. Efendi, Effect of natural and *Lactobacillus plantarum* fermentation on in-vitro protein and starch digestibilities of sorghum flour, *Food Biosci* 2 (2013) 46–52. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2013.04.001>.
- [95] S. MOELJOPAWIRO, D.T. GORDON, M.L. FIELDS, Bioavailability of Iron in Fermented Soybeans, *J Food Sci* 52 (1987) 102–105. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1987.TB13981.X>.

- [96] I. García-Mantrana, V. Monedero, M. Haros, Reduction of Phytate in Soy Drink by Fermentation with *Lactobacillus casei* Expressing Phytases From *Bifidobacteria*, *Plant Foods Hum Nutr* 70 (2015) 269–274. <https://doi.org/10.1007/S11130-015-0489-2>.
- [97] S.M. Adeyemo, A.A. Onilude, Enzymatic Reduction of Anti-nutritional Factors in Fermenting Soybeans by *Lactobacillus plantarum* Isolates from Fermenting Cereals, *Nigerian Food Journal* 31 (2013) 84–90. [https://doi.org/10.1016/S0189-7241\(15\)30080-1](https://doi.org/10.1016/S0189-7241(15)30080-1).
- [98] J. Bolívar-Monsalve, C. Ceballos-González, C. Ramírez-Toro, G.A. Bolívar, Reduction in saponin content and production of gluten-free cream soup base using quinoa fermented with *Lactobacillus plantarum*, *J Food Process Preserv* 42 (2018) e13495. <https://doi.org/10.1111/JFPP.13495>.
- [99] N.R. Reddy, M.D. Pierson, Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation, *Food Research International* 27 (1994) 281–290. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90096-5).
- [100] A.D.S. Vieira, C.B. de Souza, M. Padilha, E.G. Zoetendal, H. Smidt, S.M.I. Saad, K. Venema, Impact of a fermented soy beverage supplemented with acerola by-product on the gut microbiota from lean and obese subjects using an in vitro model of the human colon, *Appl Microbiol Biotechnol* 105 (2021) 3771–3785. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11252-8/FIGURES/5>.
- [101] V.P. Gourineni, M. Verghese, J. Boateng, L. Shackelford, N.K. Bhat, L.T. Walker, Combinational Effects of Prebiotics and Soybean against Azoxymethane-Induced Colon Cancer In Vivo, *J Nutr Metab* 2011 (2011). <https://doi.org/10.1155/2011/868197>.
- [102] M. Messina, C. Nagata, A.H. Wu, Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes, *Nutr Cancer* 55 (2006) 1–12. https://doi.org/10.1207/S15327914NC5501_1.
- [103] H. Goktas, E. Dertli, O. Sagdic, Comparison of functional characteristics of distinct *Saccharomyces boulardii* strains isolated from commercial food supplements, *LWT* 136 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110340>.
- [104] C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, V. Robert, Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts, in: *The Yeasts*, Elsevier, 2011: pp. 87–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>.

- [105] S. Graff, J.-C. Chaumeil, P. Boy, R. Lai-Kuen, C. Charrueau, Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast, *J Gen Appl Microbiol* 54 (2008) 221–227. <https://doi.org/10.2323/jgam.54.221>.
- [106] AAD15 putative aryl-alcohol dehydrogenase [*Saccharomyces cerevisiae* S288C] - Gene - NCBI, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/853999> (accessed December 12, 2023).
- [107] Soya Fasülyesi Unu 1000 g | İngro Ürün Çeşitleri, (n.d.). https://www.ingro.com.tr/urun/soya-fasulyesi-unu-1000-g?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAkeSsBhDUARIsAK3tiee922r_zip26fOlciowhIxq64eS-37LKSoTGWVXIGAHJyFvCHSa2osaAiCnEALw_wcB (accessed January 6, 2024).
- [108] J. (Jay) Han, J.A.M. Janz, M. Gerlat, Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions, *Food Research International* 43 (2010) 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.015>.
- [109] P. Singracha, N. Niamsiri, W. Visessanguan, S. Lertsiri, A. Assavanig, Application of lactic acid bacteria and yeasts as starter cultures for reduced-salt soy sauce (moromi) fermentation, *LWT* 78 (2017) 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.019>.
- [110] Y. Hu, C. Ge, W. Yuan, R. Zhu, W. Zhang, L. Du, J. Xue, Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation, *J Sci Food Agric* 90 (2010) 1194–1202. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3947>.
- [111] Y. Hu, C. Ge, W. Yuan, R. Zhu, W. Zhang, L. Du, J. Xue, Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation, *J Sci Food Agric* 90 (2010) 1194–1202. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3947>.
- [112] H.K. Mæhre, L. Dalheim, G.K. Edvinsen, E.O. Elvevoll, I.J. Jensen, Protein determination—method matters, *Foods* 7 (2018). <https://doi.org/10.3390/foods7010005>.
- [113] M.M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, 1976.
- [114] S. Shukla, A Bradford multiplexing method for protein estimation in fermented foods: Soy sauces, *Bangladesh J Pharmacol* 11 (2015) 24–27. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i1.25796>.

- [115] P. Sandra, Improving the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters Using Retention Time Locked Methods and Retention Time Databases, 2002. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/>.
- [116] L. Zhang, Y. Yu, R. Yu, Analysis of metabolites and metabolic pathways in three maize (*Zea mays* L.) varieties from the same origin using GC–MS, *Sci Rep* 10 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73041-z>.
- [117] B.Z. Hançerlioğulları, U. Toprak, R. Yılmaz, Analyses of Metabolites in Microwave-treated Maize Flours, *Food Bioproc Tech* (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1007/S11947-023-03164-4/METRICS>.
- [118] A. Serpen, V. Gökmen, A. Karagöz, H. Köksel, Phytochemical Quantification and Total Antioxidant Capacities of Emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) and Einkorn (*Triticum monococcum* L.) Wheat Landraces, *J Agric Food Chem* 56 (2008) 7285–7292. <https://doi.org/10.1021/JF8010855>.
- [119] J. Moore, Z. Hao, K. Zhou, M. Luther, J. Costa, L. Yu, Carotenoid, tocopherol, phenolic acid, and antioxidant properties of Maryland-grown soft wheat, *J Agric Food Chem* 53 (2005) 6649–6657. <https://doi.org/10.1021/JF050481B>.
- [120] M. Keskin, Renk Ölçüm Sistemlerinin Gıda Bilimleri ve Tarımda Kullanım Alanları (Use of Color Measurement Systems in Food Science and Agriculture) Linear Measurements to Estimate Leaf Area of Cucumber under Deficit Irrigation in Greenhouse Condition View project Studying the Effect of Water Content on the Estimation of Nutrient Stress of Detached Strawberry Leaves from Color Data View project, 2017. <https://www.researchgate.net/publication/309764738>.
- [121] B. Wekwete, K.P. Navder, Effects of avocado fruit puree and Oatrim as fat replacers on the physical, textural and sensory properties of oatmeal cookies, *J Food Qual* 31 (2008) 131–141. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2008.00191.x>.
- [122] J.C. Amorim, R.H. Piccoli, W.F. Duarte, Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages, *Food Research International* 107 (2018) 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.054>.
- [123] GGBC, 260/280 and 260/230 ratios, (2023). https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf (accessed December 12, 2023).
- [124] E. Dirican, M. Akkiprik, High Resolution Melting Method in Molecular Diagnostics and Their Clinical Importance, *Clinical and Experimental Health Sciences* 7 (2017) 20–26. <https://doi.org/10.5152/clinexphealthsci.2017.104>.

- [125] B. Pakbin, A.A. Basti, A. Khanjari, W.M. Brück, L. Azimi, A. Karimi, Development of high-resolution melting (HRM) assay to differentiate the species of *Shigella* isolates from stool and food samples, *Sci Rep* 12 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04484-1>.
- [126] M.Z.A. Chan, M. Toh, S.Q. Liu, Growth, survival, and metabolic activities of probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM-I745 in fermented coffee brews, *Int J Food Microbiol* 350 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109229>.
- [127] M. Katayama, L.A. Wilson, Utilization of soybeans and their components through the development of textured soy protein foods, *J Food Sci* 73 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00663.x>.
- [128] S. Li, Z. Jin, D. Hu, W. Yang, Y. Yan, X. Nie, J. Lin, Q. Zhang, D. Gai, Y. Ji, X. Chen, Effect of solid-state fermentation with *Lactobacillus casei* on the nutritional value, isoflavones, phenolic acids and antioxidant activity of whole soybean flour, *LWT* 125 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109264>.
- [129] R.S. Leite, M.C. Carrão-Panizzi, J.M. Curti, I.P. Dias, N.F. Seibel, Tempeh flour as a substitute for soybean flour in coconut cookies, *Food Science and Technology* 33 (2013) 796–800. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400028>.
- [130] M.K. Walsh, Immobilized enzyme technology for food applications, *Novel Enzyme Technology for Food Applications* (2007) 60–84. <https://doi.org/10.1533/9781845693718.1.60>.
- [131] I. Gun, B. Simsek, The Fatty Acid Composition of Butter Stored in Sheep's or Goat's Stomach (Karinyagi), *Food Nutr Sci* 02 (2011) 402–406. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.25056>.
- [132] M.R. Akkaya, Prediction of fatty acid composition of sunflower seeds by near-infrared reflectance spectroscopy, *J Food Sci Technol* 55 (2018) 2318–2325. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3150-x>.
- [133] N. Nikolić, N. Radulović, B. Momcilović, G. Nikolić, M. Lazić, Z. Todorovic, Fatty acids composition and rheology properties of wheat and wheat and white or brown rice flour mixture, *European Food Research and Technology* 227 (2008) 1543–1548. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0877-z>.
- [134] J.W. Lee, D.Y. Kil, B.D. Keever, J. Killefer, F.K. Mckeith, R.C. Sulabo, H.H. Stein, Carcass fat quality of pigs is not improved by adding corn germ, beef tallow, palm kernel oil, or glycerol to finishing diets containing distillers dried grains with solubles, *J Anim Sci* 91 (2013) 2426–2437. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5328>.

- [135] S. Verruck, C.F. Balthazar, R.S. Rocha, R. Silva, E.A. Esmerino, T.C. Pimentel, M.Q. Freitas, M.C. Silva, A.G. da Cruz, E.S. Prudencio, Dairy foods and positive impact on the consumer's health, *Adv Food Nutr Res* 89 (2019) 95–164. <https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2019.03.002>.
- [136] C. Agostoni, L. Moreno, R. Shamir, Palmitic Acid and Health: Introduction, *Crit Rev Food Sci Nutr* 56 (2016) 1941–1942. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1017435>.
- [137] J. Tang, Palmitoleic acid in health and disease, *Advances in Dietary Lipids and Human Health* (2022) 293–302. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823914-8.00007-0>.
- [138] I. Kolouchová, K. Sigler, O. Schreiberová, J. Masák, T. Řezanka, New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid, *Bioresour Technol* 192 (2015) 726–734. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.06.048>.
- [139] D. Senyilmaz-Tiebe, D.H. Pfaff, S. Virtue, K. V. Schwarz, T. Fleming, S. Altamura, M.U. Muckenthaler, J.G. Okun, A. Vidal-Puig, P. Nawroth, A.A. Teleman, Dietary stearic acid regulates mitochondria in vivo in humans, *Nature Communications* 2018 9:1 9 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05614-6>.
- [140] S. Lopez, B. Bermudez, Y.M. Pacheco, A. Ortega, L.M. Varela, R. Abia, F.J.G. Muriana, Oleic Acid: The Main Component of Olive Oil on Postprandial Metabolic Processes, *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (2010) 1385–1393. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00154-6>.
- [141] J. Whelan, K. Fritsche, Linoleic acid, *Adv Nutr* 4 (2013) 311–312. <https://doi.org/10.3945/AN.113.003772>.
- [142] S. Rajaram, Health benefits of plant-derived α -linolenic acid, *Am J Clin Nutr* 100 Suppl 1 (2014). <https://doi.org/10.3945/AJCN.113.071514>.
- [143] Rapid Risk Assessment: What is the long-term risk of erucic acid to UK consumers if sunflower oil in food is substituted with refined rapeseed oil? | Food Standards Agency, (n.d.). <https://www.food.gov.uk/research/research-projects/rapid-risk-assessment-what-is-the-long-term-risk-of-erucic-acid-to-uk-consumers-if-sunflower-oil-in-food-is-substituted-with#> (accessed December 12, 2023).
- [144] A. Crozier, T. Moritz, Physico-chemical methods of plant hormone analysis, *New Comprehensive Biochemistry* 33 (1999) 23–60. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60482-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60482-2).

- [145] M.J. Lopez, S.S. Mohiuddin, Biochemistry, Essential Amino Acids, StatPearls (2023). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/> (accessed December 12, 2023).
- [146] M. Kohlmeier, Alanine, Nutrient Metabolism (2003) 308–314. <https://doi.org/10.1016/B978-012417762-8.50050-8>.
- [147] A.B. Hodgson, Valine, Nutritional Supplements in Sport, Exercise and Health: An A-Z Guide (2003) 370–377. <https://doi.org/10.1016/B978-012417762-8.50058-2>.
- [148] G. Wu, F.W. Bazer, R.C. Burghardt, G.A. Johnson, S.W. Kim, D.A. Knabe, P. Li, X. Li, J.R. McKnight, M.C. Satterfield, T.E. Spencer, Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition, Amino Acids 40 (2011) 1053–1063. <https://doi.org/10.1007/S00726-010-0715-Z>.
- [149] M.A. Razak, P.S. Begum, B. Viswanath, S. Rajagopal, Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: A Review, Oxid Med Cell Longev 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/1716701>.
- [150] M. Holeček, Serine Metabolism in Health and Disease and as a Conditionally Essential Amino Acid, Nutrients 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/NU14091987>.
- [151] Q. Tang, P. Tan, N. Ma, X. Ma, Physiological Functions of Threonine in Animals: Beyond Nutrition Metabolism, Nutrients 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/NU13082592>.
- [152] L. Eggeling, H. Sahm, Amino Acid Production, Comprehensive Biotechnology (2011) 563–571. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00186-5>.
- [153] A.C. Edmondson, M.J. Bennett, Biochemical genetic disorders, Biochemical and Molecular Basis of Pediatric Disease (2021) 439–476. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817962-8.00001-9>.
- [154] B.K. Jang, Y. Ju, D. Jeong, S.K. Jung, C.K. Kim, Y.S. Chung, S.R. Kim, L-lactic acid production using engineered saccharomyces cerevisiae with improved organic acid tolerance, Journal of Fungi 7 (2021) 928. <https://doi.org/10.3390/JOF7110928/S1>.
- [155] A.K. Niamah, Physicochemical and microbial characteristics of yogurt with added saccharomyces boulardii, Current Research in Nutrition and Food Science 5 (2017) 300–307. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.5.3.15>.

- [156] N. Guaragnella, M. Bettiga, Acetic acid stress in budding yeast: From molecular mechanisms to applications, *Yeast* 38 (2021) 391–400. <https://doi.org/10.1002/YEA.3651>.
- [157] B. Offei, P. Vandecruys, S. De Graeve, M.R. Foulquié-Moreno, J.M. Thevelein, Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Genome Res* 29 (2019) 1478–1494. <https://doi.org/10.1101/GR.243147.118>.
- [158] W.N. Chen, K.Y. Tan, “Malonate uptake and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Appl Biochem Biotechnol* 171 (2013) 44–62. <https://doi.org/10.1007/S12010-013-0334-8>.
- [159] A. Lourens-Hattingh, B.C. Viljoen, Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products, *Food Research International* 34 (2001) 791–796. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00085-0](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00085-0).
- [160] S.C. Gad, Propionic Acid, *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (2014) 1105–1107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00914-3>.
- [161] X. Xu, T.C. Williams, C. Divne, I.S. Pretorius, I.T. Paulsen, Evolutionary engineering in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a TRK1-dependent potassium influx mechanism for propionic acid tolerance, *Biotechnol Biofuels* 12 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13068-019-1427-6/FIGURES/6>.
- [162] R.M. Zelle, E. De Hulster, W.A. Van Winden, P. De Waard, C. Dijkema, A.A. Winkler, J.M.A. Geertman, J.P. Van Dijken, J.T. Pronk, A.J.A. Van Maris, Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export, *Appl Environ Microbiol* 74 (2008) 2766–2777. <https://doi.org/10.1128/AEM.02591-07>.
- [163] L. Karaffa, C.P. Kubicek, Production of Organic Acids by Fungi, *Encyclopedia of Mycology: Volume 1,2* 2 (2021) 406–419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21066-2>.
- [164] S.Y. Lee, S. Lee, S. Lee, J.Y. Oh, E.J. Jeon, H.S. Ryu, C.H. Lee, Primary and secondary metabolite profiling of doenjang, a fermented soybean paste during industrial processing, *Food Chem* 165 (2014) 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.089>.
- [165] S. Shukla, T.B. Choi, H.K. Park, M. Kim, I.K. Lee, J.K. Kim, Determination of non-volatile and volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang), *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 2005–2010. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.034>.

- [166] Y.S. Kwon, S. Lee, S.H. Lee, H.J. Kim, C.H. Lee, Comparative evaluation of six traditional fermented soybean products in east asia: A metabolomics approach, *Metabolites* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/metabo9090183>.
- [167] E. Lee, Y. Lim, S.W. Kwon, O. Kwon, Pinitol consumption improves liver health status by reducing oxidative stress and fatty acid accumulation in subjects with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Journal of Nutritional Biochemistry* 68 (2019) 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.03.006>.
- [168] *Saccharomyces cerevisiae* fructose degradation, (n.d.). <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?object=PWY3O-0> (accessed December 12, 2023).
- [169] J. Kim, C. Atkinson, M.J. Miller, K.H. Kim, Y.-S. Jin, Microbiome Engineering Using Probiotic Yeast: *Saccharomyces boulardii* and the Secreted Human Lysozyme Lead to Changes in the Gut Microbiome and Metabolome of Mice, *Microbiol Spectr* 11 (2023). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.00780-23>.
- [170] Ö. Kayikci, J. Nielsen, Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res* 15 (2015). <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOV068>.
- [171] S. Rehman, M.A. Murtaza, Z. Mushtaq, Xylitol as Sweetener, (2016) 1–21. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26478-3_30-1.
- [172] T. Morinaga, M. Yamaguchi, Y. Makino, H. Nanamiya, K. Takahashi, H. Yoshikawa, F. Kawamura, H. Ashida, K.I. Yoshida, Functional myo-Inositol Catabolic Genes of *Bacillus subtilis* Natto Are Involved in Depletion of Pinitol in Natto (Fermented Soybean), *Biosci Biotechnol Biochem* 70 (2006) 1913–1920. <https://doi.org/10.1271/BBB.60084>.
- [173] S. Maicas, The Role of Yeasts in Fermentation Processes, *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 1142 8 (2020) 1142. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8081142>.
- [174] G. Ghoshal, P. Kaushik, Development of soymeal fortified cookies to combat malnutrition, *Legume Science* 2 (2020) e43. <https://doi.org/10.1002/LEG3.43>.
- [175] T.S. Tyug, K.N. Prasad, A. Ismail, Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products, *Food Chem* 123 (2010) 583–589. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.04.074>.

EKLER

EK 1.1 – Çalışmada Kullanılan Suşların Gelişim Özellikleri ve Morfolojileri

No	Kaynak	İzolasyon Bölgesi	İzolasyon Kodu	Canlılık (30 °C)	Makroskobik Morfoloji
1	Ticari	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	745	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
2	Ticari	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	9763	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
3	Ticari	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 6328	6328	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
4	HUF (FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu)	Çankırı, Üzüm	16M3H11104	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
5		Kırıkkale, Üzüm	16M3B11017	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
6		Kırıkkale, Üzüm	16M3B11021	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
7		Kırşehir, Üzüm	16M3C11031	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
8		Kırşehir, Üzüm	16M3C11032	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
9		Kırşehir, Üzüm	16M3C11033	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
10		Nevşehir, Üzüm	16M3D11047	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
11		Eskişehir, Üzüm	16M3G11088	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
12		Çankırı, Üzüm	16M3H11101	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
13		Ankara, Toprak	16M2K10007	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
14		Kırıkkale, Toprak	17M3B32047	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
15		Kırşehir, Üzüm	17M3C31063	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
16		Kırşehir, Üzüm	17M3C31065	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
17		Kırşehir, Üzüm	17M3C31066	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
18		Nevşehir, Üzüm	17M3D31086	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
19		Nevşehir, Üzüm	17M3D31088	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
20		Nevşehir, Üzüm	17M3D31089	Gelişme Var	Şeffaf, Yuvarlak, Pürüzsüz
21		Aksaray, Üzüm	17M3E21112	Gelişme Var	Şeffaf, Yuvarlak, Pürüzsüz
22		Aksaray, Üzüm	17M3E21113	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
23		Aksaray, Üzüm	17M3E21114	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
24		Ankara, Üzüm	17M3F21122	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
25		Ankara, Üzüm	17M3F21126	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
26		Ankara, Toprak	17M3F21134	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz

27	Ankara, Üzüm	17M3F31136	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
28	Eskişehir, Toprak	17M3G32157	Gelişme Var	Şeffaf, Yuvarlak, Pürüzsüz
29	Karaman, Üzüm	17M3H21208	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
30	Karaman, Üzüm	17M3H21209	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
31	Ankara, Toprak	18M2Y10013	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
32	Adana, Toprak	18M2Z10001	Gelişme Var	Şeffaf, Yuvarlak, Pürüzsüz
33	Adana, Toprak	18M2Z10009	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
34	Adana, Toprak	18M2Z10014	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
35	Adana, Toprak	18M2Z10021	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
36	Adana, Toprak	18M2Z10026	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
37	Kırıkkale, Üzüm	18M3B21008	Gelişme Var	Şeffaf, Yuvarlak, Pürüzsüz
38	Kırıkkale, Toprak	18M3B21010	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
39	Kırşehir, Üzüm	18M3C21001	Gelişme Var	Şeffaf, Yuvarlak, Pürüzsüz
40	Kırşehir, Üzüm	18M3C21008	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
41	Kırşehir, Toprak	18M3C21010	Gelişme Var	Şeffaf, Yuvarlak, Pürüzsüz
42	Nevşehir, Üzüm	18M3D21001	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
43	Nevşehir, Üzüm	18M3D21006	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
44	Nevşehir, Üzüm	18M3D21008	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
45	Aksaray, Üzüm	18M3E21007	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
46	Ankara, Üzüm	18M3F21010	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
47	Ankara, Üzüm	18M3F21012	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
48	Eskişehir, Üzüm	18M3G21009	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
49	Sivas, Üzüm	18M3J21008	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
50	Konya, Üzüm	18M3K21007	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
51	Yozgat, Üzüm	18M3L21008	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz
52	Yozgat, Üzüm	18M3L21010	Gelişme Var	Krem-Beyaz, Mat, Yuvarlak, Pürüzsüz

HUF
(FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu)

EK 1.2 – Belirlenen Sıcaklıklarda Gelişim Testi Sonuçları

No	Kaynak	İzolasyon Kodu	Belirlenen Sıcaklıklarda Gelişim		
			30 °C	37 °C	45 °C
1	Ticari	745	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
2	Ticari	9763	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
3	Ticari	6328	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
4		16M2K10007	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
5		16M3B11017	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
6		16M3B11021	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
7		16M3C11031	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
8		16M3C11033	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
9		16M3D11047	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
10		16M3H11104	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
11		17M3C31063	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
12		17M3C31065	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
13		17M3D31086	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
14		17M3D31088	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
15		17M3D31089	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
16		17M3E21112	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
17		17M3E21113	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
18		17M3E21114	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
19		17M3F21126	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
20		17M3F21134	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
21		17M3H21209	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
22		18M2Y10013	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
23		18M2Z10009	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
24		18M2Z10021	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
25		18M2Z10026	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
26		18M3C21001	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
27		18M3C21008	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
28		18M3D21001	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
29		18M3D21008	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
30		18M3F21012	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
31		18M3L21008	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Var
32		16M3C11032	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
33		16M3G11088	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
34		16M3H11101	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
35		17M3B32047	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
36		17M3C31066	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
37		17M3F21122	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok

HUF
(FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu)

38		17M3F31136	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
39		17M3G32157	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
40		17M3H21208	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
41		18M2Z10001	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
42		18M2Z10014	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
43		18M3B21008	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
44		18M3B21010	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
45		18M3C21010	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
46		18M3D21006	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
47		18M3E21007	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
48		18M3F21010	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
49		18M3G21009	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
50		18M3J21008	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
51		18M3K21007	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok
52		18M3L21010	Gelişme Var	Gelişme Var	Gelişme Yok

HUF
(FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu)

EK 1.3 – Glukoz ve Galaktoz Testi Sonuçları

No	Kaynak	İzolasyon Kodu	Glukoz ve Galaktoz Kullanımı			
			Glukoz		Galaktoz	
			Renk Değişimi	Gaz Oluşumu	Renk Değişimi	Gaz Oluşumu
1	Ticari	745	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
2	Ticari	9763	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
3	Ticari	6328	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
4		16M2K10007	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
5		16M3B11017	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
6		16M3C11031	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
7		16M3C11032	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
8		16M3C11033	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
9		16M3G11088	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
10		16M3H11101	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
11		17M3B32047	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
12		17M3C31063	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
13		17M3C31065	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
14		17M3C31066	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
15		17M3D31086	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
16		17M3D31088	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
17		17M3E21113	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
18		17M3E21114	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
19		17M3F21122	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
20		17M3F21126	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
21		17M3F21134	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
22		17M3F31136	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
23		17M3H21208	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
24		17M3H21209	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
25		18M2Y10013	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
26		18M2Z10009	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
27		18M2Z10014	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
28		18M2Z10021	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
29		18M2Z10026	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
30		18M3B21010	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
31		18M3C21008	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
32		18M3D21001	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
33		18M3D21008	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
34		18M3E21007	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
35		18M3F21010	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif

HUF
(FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu)

36	18M3F21012	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
37	18M3G21009	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
38	18M3J21008	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
39	18M3K21007	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
40	18M3L21008	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
41	18M3L21010	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
42	16M3B11021	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
43	17M3D31089	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
44	17M3E21112	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
45	17M3G32157	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
46	18M2Z10001	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
47	18M3B21008	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
48	18M3C21001	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
49	18M3C21010	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
50	18M3D21006	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
51	16M3D11047	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
52	16M3H11104	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif

HUF
(FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu)

EK 1.4 – pH 6,3'te Gelişim Testi Sonuçları

pH	Suş Kodu	Süre (Saat)	Absorbans (A°)	Ortalama Absorbans (A°)	Hücre sayısı (log (cfu/mL))	Ortalama Hücre sayısı (log (cfu/mL))
6,3	745	0	0,055		0,651	
6,3	745	0	0,054	0,058	0,641	0,683 ± 0,043
6,3	745	0	0,062		0,725	
6,3	745	0	0,061		0,714	
6,3	745	4	0,336		3,612	
6,3	745	4	0,337	0,361	3,623	3,876 ± 0,299
6,3	745	4	0,388		4,160	
6,3	745	4	0,383		4,107	
6,3	745	8	0,802		8,523	
6,3	745	8	0,795	0,810	8,449	8,602 ± 0,143
6,3	745	8	0,825		8,765	
6,3	745	8	0,816		8,670	
6,3	745	12	1,207		12,790	
6,3	745	12	1,211	1,213	12,832	12,848 ± 0,047
6,3	745	12	1,217		12,896	
6,3	745	12	1,215		12,875	
6,3	745	16	1,265		13,401	
6,3	745	16	1,268	1,282	13,433	13,578 ± 0,187
6,3	745	16	1,299		13,760	
6,3	745	16	1,295		13,718	
6,3	9763	0	0,057		0,672	
6,3	9763	0	0,053	0,055	0,630	0,649 ± 0,028
6,3	9763	0	0,057		0,672	
6,3	9763	0	0,052		0,620	
6,3	9763	4	0,397		4,255	
6,3	9763	4	0,349	0,372	3,749	3,994 ± 0,308
6,3	9763	4	0,398		4,266	
6,3	9763	4	0,345		3,707	
6,3	9763	8	0,917		9,734	
6,3	9763	8	0,793	0,851	8,428	9,042 ± 0,717
6,3	9763	8	0,903		9,587	
6,3	9763	8	0,792		8,417	
6,3	9763	12	1,295		13,718	
6,3	9763	12	1,26	1,277	13,349	13,525 ± 0,199
6,3	9763	12	1,291		13,675	
6,3	9763	12	1,261		13,359	
6,3	9763	16	1,378		14,592	
6,3	9763	16	1,39	1,382	14,719	14,637 ± 0,057
6,3	9763	16	1,379		14,603	
6,3	9763	16	1,382		14,634	
6,3	16M3B11021	0	0,053		0,630	
6,3	16M3B11021	0	0,065	0,059	0,757	0,696 ± 0,076
6,3	16M3B11021	0	0,053		0,630	
6,3	16M3B11021	0	0,066		0,767	

6,3	16M3B11021	4	0,195		2,126		
6,3	16M3B11021	4	0,361		3,876		
6,3	16M3B11021	4	0,195	0,278	2,126	2,998	± 1,007
6,3	16M3B11021	4	0,36		3,865		
6,3	16M3B11021	8	0,257		2,780		
6,3	16M3B11021	8	0,803		8,533		
6,3	16M3B11021	8	0,255	0,529	2,759	5,649	± 3,325
6,3	16M3B11021	8	0,802		8,523		
6,3	16M3B11021	12	0,383		4,107		
6,3	16M3B11021	12	1,074		11,389		
6,3	16M3B11021	12	0,381	0,728	4,086	7,743	± 4,210
6,3	16M3B11021	12	1,074		11,389		
6,3	16M3B11021	16	0,564		6,015		
6,3	16M3B11021	16	1,114		11,810		
6,3	16M3B11021	16	0,563	0,840	6,004	8,918	± 3,358
6,3	16M3B11021	16	1,117		11,842		
6,3	16M3D11047	0	0,05		0,599		
6,3	16M3D11047	0	0,04		0,493		
6,3	16M3D11047	0	0,05	0,045	0,599	0,546	± 0,061
6,3	16M3D11047	0	0,04		0,493		
6,3	16M3D11047	4	0,18		1,968		
6,3	16M3D11047	4	0,19		2,074		
6,3	16M3D11047	4	0,18	0,188	1,968	2,047	± 0,101
6,3	16M3D11047	4	0,2		2,179		
6,3	16M3D11047	8	0,322		3,465		
6,3	16M3D11047	8	0,326		3,507		
6,3	16M3D11047	8	0,321	0,324	3,454	3,483	± 0,028
6,3	16M3D11047	8	0,326		3,507		
6,3	16M3D11047	12	0,658		7,005		
6,3	16M3D11047	12	0,469		5,014		
6,3	16M3D11047	12	0,658	0,564	7,005	6,012	± 1,147
6,3	16M3D11047	12	0,47		5,024		
6,3	16M3D11047	16	0,736		7,827		
6,3	16M3D11047	16	0,729		7,753		
6,3	16M3D11047	16	0,736	0,733	7,827	7,790	± 0,043
6,3	16M3D11047	16	0,729		7,753		
6,3	16M3H11104	0	0,058		0,683		
6,3	16M3H11104	0	0,059		0,693		
6,3	16M3H11104	0	0,062	0,059	0,725	0,696	± 0,020
6,3	16M3H11104	0	0,058		0,683		
6,3	16M3H11104	4	0,832		8,839		
6,3	16M3H11104	4	0,418		4,476		
6,3	16M3H11104	4	0,83	0,625	8,818	6,660	± 2,504
6,3	16M3H11104	4	0,421		4,508		
6,3	16M3H11104	8	1,242		13,159		
6,3	16M3H11104	8	0,916		9,724		
6,3	16M3H11104	8	1,244	1,080	13,180	11,455	± 1,980
6,3	16M3H11104	8	0,919		9,756		
6,3	16M3H11104	12	1,418	1,330	15,014	14,081	± 1,077

6,3	16M3H11104	12	1,242		13,159	
6,3	16M3H11104	12	1,418		15,014	
6,3	16M3H11104	12	1,24		13,138	
6,3	16M3H11104	16	1,453		15,383	
6,3	16M3H11104	16	1,281	1,367	13,570	14,476 ± 1,059
6,3	16M3H11104	16	1,455		15,404	
6,3	16M3H11104	16	1,279		13,549	
6,3	17M3D31089	0	0,058		0,683	
6,3	17M3D31089	0	0,062	0,061	0,725	0,709 ± 0,025
6,3	17M3D31089	0	0,059		0,693	
6,3	17M3D31089	0	0,063		0,736	
6,3	17M3D31089	4	0,191		2,084	
6,3	17M3D31089	4	0,199	0,195	2,169	2,129 ± 0,046
6,3	17M3D31089	4	0,192		2,095	
6,3	17M3D31089	4	0,199		2,169	
6,3	17M3D31089	8	0,27		2,917	
6,3	17M3D31089	8	0,285	0,277	3,075	2,993 ± 0,094
6,3	17M3D31089	8	0,269		2,906	
6,3	17M3D31089	8	0,285		3,075	
6,3	17M3D31089	12	0,44		4,708	
6,3	17M3D31089	12	0,401	0,421	4,297	4,503 ± 0,237
6,3	17M3D31089	12	0,44		4,708	
6,3	17M3D31089	12	0,401		4,297	
6,3	17M3D31089	16	0,56		5,973	
6,3	17M3D31089	16	0,641	0,600	6,826	6,397 ± 0,616
6,3	17M3D31089	16	0,659		7,016	
6,3	17M3D31089	16	0,541		5,772	

Ek 1.5 – pH 1,5'te Gelişim Testi Sonuçları

pH	Suş Kodu	Süre (Saat)	Absorbans (A°)	Ortalama Absorbans (A°)	Hücre sayısı (log (cfu/mL))	Ortalama Hücre sayısı (log (cfu/mL))		
1,5	745	0	0,06		0,704			
1,5	745	0	0,06	0,061	0,704	0,712	±	0,010
1,5	745	0	0,061		0,714			
1,5	745	0	0,062		0,725			
1,5	745	4	0,062		0,725			
1,5	745	4	0,072	0,067	0,830	0,778	±	0,061
1,5	745	4	0,062		0,725			
1,5	745	4	0,072		0,830			
1,5	745	8	0,039		0,483			
1,5	745	8	0,059	0,049	0,693	0,591	±	0,125
1,5	745	8	0,039		0,483			
1,5	745	8	0,06		0,704			
1,5	745	12	0,029		0,377			
1,5	745	12	0,069	0,050	0,799	0,596	±	0,247
1,5	745	12	0,03		0,388			
1,5	745	12	0,071		0,820			
1,5	745	16	0,062		0,725			
1,5	745	16	0,062	0,063	0,725	0,733	±	0,010
1,5	745	16	0,063		0,736			
1,5	745	16	0,064		0,746			
1,5	9763	0	0,044		0,535			
1,5	9763	0	0,056	0,05	0,662	0,593	±	0,073
1,5	9763	0	0,043		0,525			
1,5	9763	0	0,055		0,651			
1,5	9763	4	0,061		0,714			
1,5	9763	4	0,070	0,066	0,809	0,762	±	0,055
1,5	9763	4	0,061		0,714			
1,5	9763	4	0,07		0,809			
1,5	9763	8	0,102		1,146			
1,5	9763	8	0,087	0,094	0,988	1,062	±	0,086
1,5	9763	8	0,1		1,125			
1,5	9763	8	0,087		0,988			
1,5	9763	12	0,103		1,157			
1,5	9763	12	0,082	0,093	0,936	1,052	±	0,122
1,5	9763	12	0,103		1,157			
1,5	9763	12	0,084		0,957			
1,5	9763	16	0,06		0,704			
1,5	9763	16	0,069	0,065	0,799	0,751	±	0,049
1,5	9763	16	0,061		0,714			
1,5	9763	16	0,068		0,788			
1,5	16M3B11021	0	0,063		0,736			
1,5	16M3B11021	0	0,065	0,065	0,757	0,754	±	0,018
1,5	16M3B11021	0	0,064		0,746			

1,5	16M3B11021	0	0,067		0,778			
1,5	16M3B11021	4	0,050		0,599			
1,5	16M3B11021	4	0,093	0,072	1,052	0,833	±	0,265
1,5	16M3B11021	4	0,051		0,609			
1,5	16M3B11021	4	0,095		1,073			
1,5	16M3B11021	8	0,057		0,672			
1,5	16M3B11021	8	0,105	0,081	1,178	0,925	±	0,292
1,5	16M3B11021	8	0,057		0,672			
1,5	16M3B11021	8	0,105		1,178			
1,5	16M3B11021	12	0,105		1,178			
1,5	16M3B11021	12	-0,001	0,052	0,061	0,622	±	0,642
1,5	16M3B11021	12	0,105		1,178			
1,5	16M3B11021	12	0,000		0,072			
1,5	16M3B11021	16	0,061		0,714			
1,5	16M3B11021	16	0,109	0,086	1,220	0,973	±	0,298
1,5	16M3B11021	16	0,061		0,714			
1,5	16M3B11021	16	0,111		1,241			
1,5	16M3D11047	0	0,05		0,599			
1,5	16M3D11047	0	0,04	0,045	0,493	0,546	±	0,061
1,5	16M3D11047	0	0,05		0,599			
1,5	16M3D11047	0	0,04		0,493			
1,5	16M3D11047	4	0,101		1,136			
1,5	16M3D11047	4	0,092	0,097	1,041	1,089	±	0,049
1,5	16M3D11047	4	0,1		1,125			
1,5	16M3D11047	4	0,093		1,052			
1,5	16M3D11047	8	0,086		0,978			
1,5	16M3D11047	8	0,09	0,088	1,020	1,002	±	0,028
1,5	16M3D11047	8	0,086		0,978			
1,5	16M3D11047	8	0,091		1,031			
1,5	16M3D11047	12	0,093		1,052			
1,5	16M3D11047	12	0,088	0,091	0,999	1,031	±	0,038
1,5	16M3D11047	12	0,095		1,073			
1,5	16M3D11047	12	0,088		0,999			
1,5	16M3D11047	16	0,093		1,052			
1,5	16M3D11047	16	0,088	0,091	0,999	1,031	±	0,038
1,5	16M3D11047	16	0,095		1,073			
1,5	16M3D11047	16	0,088		0,999			
1,5	16M3H11104	0	0,056		0,662			
1,5	16M3H11104	0	0,076	0,066	0,872	0,767	±	0,122
1,5	16M3H11104	0	0,056		0,662			
1,5	16M3H11104	0	0,076		0,872			
1,5	16M3H11104	4	0,013		0,209			
1,5	16M3H11104	4	0,061	0,037	0,714	0,464	±	0,289
1,5	16M3H11104	4	0,014		0,219			
1,5	16M3H11104	4	0,061		0,714			
1,5	16M3H11104	8	0,043		0,525			
1,5	16M3H11104	8	0,05	0,047	0,599	0,567	±	0,033
1,5	16M3H11104	8	0,046		0,556			
1,5	16M3H11104	8	0,049		0,588			

1,5	16M3H11104	12	0,023		0,314			
1,5	16M3H11104	12	0,039		0,483			
1,5	16M3H11104	12	0,024	0,032	0,325	0,406	±	0,101
1,5	16M3H11104	12	0,041		0,504			
1,5	16M3H11104	16	0,004		0,114			
1,5	16M3H11104	16	0,045		0,546			
1,5	16M3H11104	16	0,005	0,025	0,124	0,333	±	0,246
1,5	16M3H11104	16	0,045		0,546			
1,5	17M3D31089	0	0,052		0,620			
1,5	17M3D31089	0	0,05		0,599			
1,5	17M3D31089	0	0,053	0,052	0,630	0,614	±	0,014
1,5	17M3D31089	0	0,051		0,609			
1,5	17M3D31089	4	0,035		0,440			
1,5	17M3D31089	4	0,021		0,293			
1,5	17M3D31089	4	0,035	0,028	0,440	0,367	±	0,085
1,5	17M3D31089	4	0,021		0,293			
1,5	17M3D31089	8	0,036		0,451			
1,5	17M3D31089	8	0,055		0,651			
1,5	17M3D31089	8	0,035	0,045	0,440	0,546	±	0,116
1,5	17M3D31089	8	0,054		0,641			
1,5	17M3D31089	12	0,015		0,230			
1,5	17M3D31089	12	0,003		0,103			
1,5	17M3D31089	12	0,019	0,011	0,272	0,185	±	0,079
1,5	17M3D31089	12	0,006		0,135			
1,5	17M3D31089	16	0,01		0,177			
1,5	17M3D31089	16	0,003		0,103			
1,5	17M3D31089	16	0,014	0,007	0,219	0,151	±	0,057
1,5	17M3D31089	16	0,003		0,103			

Ek 1.6 – pH 2,0’da Gelişim Testi Sonuçları

pH	Suş Kodu	Süre (Saat)	Absorbans (A°)	Ortalama Absorbans (A°)	Hücre sayısı (log (cfu/mL))	Ortalama Hücre sayısı (log (cfu/mL))		
2,0	745	0	0,052		0,620			
2,0	745	0	0,056	0,054	0,662	0,641	±	0,024
2,0	745	0	0,052		0,620			
2,0	745	0	0,056		0,662			
2,0	745	4	0,061		0,714			
2,0	745	4	0,045	0,05175	0,546	0,617	±	0,108
2,0	745	4	0,06		0,704			
2,0	745	4	0,041		0,504			
2,0	745	8	0,07		0,809			
2,0	745	8	0,055	0,064	0,651	0,743	±	0,102
2,0	745	8	0,074		0,851			
2,0	745	8	0,056		0,662			
2,0	745	12	0,073		0,841			
2,0	745	12	0,057	0,065	0,672	0,759	±	0,089
2,0	745	12	0,072		0,830			
2,0	745	12	0,059		0,693			
2,0	745	16	0,11		1,231			
2,0	745	16	0,065	0,086	0,757	0,981	±	0,277
2,0	745	16	0,108		1,210			
2,0	745	16	0,062		0,725			
2,0	9763	0	0,039		0,483			
2,0	9763	0	0,067	0,053	0,778	0,630	±	0,170
2,0	9763	0	0,039		0,483			
2,0	9763	0	0,067		0,778			
2,0	9763	4	0,033		0,419			
2,0	9763	4	0,076	0,054	0,872	0,643	±	0,253
2,0	9763	4	0,034		0,430			
2,0	9763	4	0,074		0,851			
2,0	9763	8	0,029		0,377			
2,0	9763	8	0,031	0,031	0,398	0,393	±	0,011
2,0	9763	8	0,031		0,398			
2,0	9763	8	0,031		0,398			
2,0	9763	12	0,061		0,714			
2,0	9763	12	0,019	0,04	0,272	0,496	±	0,253
2,0	9763	12	0,061		0,714			
2,0	9763	12	0,02		0,282			
2,0	9763	16	0,042		0,514			
2,0	9763	16	0,039	0,041	0,483	0,501	±	0,022
2,0	9763	16	0,043		0,525			
2,0	9763	16	0,039		0,483			
2,0	16M3B11021	0	0,048		0,577			
2,0	16M3B11021	0	0,049	0,047	0,588	0,564	±	0,023
2,0	16M3B11021	0	0,046		0,556			

2,0	16M3B11021	0	0,044		0,535			
2,0	16M3B11021	4	0,045		0,546			
2,0	16M3B11021	4	0,051	0,048	0,609	0,577	±	0,037
2,0	16M3B11021	4	0,045		0,546			
2,0	16M3B11021	4	0,051		0,609			
2,0	16M3B11021	8	0,051		0,609			
2,0	16M3B11021	8	0,054	0,053	0,641	0,630	±	0,026
2,0	16M3B11021	8	0,051		0,609			
2,0	16M3B11021	8	0,056		0,662			
2,0	16M3B11021	12	0,067		0,778			
2,0	16M3B11021	12	0,054	0,060	0,641	0,704	±	0,074
2,0	16M3B11021	12	0,065		0,757			
2,0	16M3B11021	12	0,054		0,641			
2,0	16M3B11021	16	0,07		0,809			
2,0	16M3B11021	16	0,06	0,064	0,704	0,749	±	0,065
2,0	16M3B11021	16	0,069		0,799			
2,0	16M3B11021	16	0,058		0,683			
2,0	16M3D11047	0	0,048		0,577			
2,0	16M3D11047	0	0,04	0,044	0,493	0,535	±	0,049
2,0	16M3D11047	0	0,048		0,577			
2,0	16M3D11047	0	0,04		0,493			
2,0	16M3D11047	4	0,049		0,588			
2,0	16M3D11047	4	0,041	0,045	0,504	0,546	±	0,049
2,0	16M3D11047	4	0,049		0,588			
2,0	16M3D11047	4	0,041		0,504			
2,0	16M3D11047	8	0,067		0,778			
2,0	16M3D11047	8	0,048	0,058	0,577	0,683	±	0,116
2,0	16M3D11047	8	0,068		0,788			
2,0	16M3D11047	8	0,049		0,588			
2,0	16M3D11047	12	0,039		0,483			
2,0	16M3D11047	12	0,058	0,049	0,683	0,583	±	0,116
2,0	16M3D11047	12	0,039		0,483			
2,0	16M3D11047	12	0,058		0,683			
2,0	16M3D11047	16	0,094		1,062			
2,0	16M3D11047	16	0,045	0,070	0,546	0,804	±	0,311
2,0	16M3D11047	16	0,096		1,083			
2,0	16M3D11047	16	0,043		0,525			
2,0	16M3H11104	0	0,053		0,630			
2,0	16M3H11104	0	0,058	0,055	0,683	0,651	±	0,023
2,0	16M3H11104	0	0,054		0,641			
2,0	16M3H11104	0	0,055		0,651			
2,0	16M3H11104	4	0,046		0,556			
2,0	16M3H11104	4	0,083	0,063	0,946	0,738	±	0,223
2,0	16M3H11104	4	0,044		0,535			
2,0	16M3H11104	4	0,08		0,915			
2,0	16M3H11104	8	0,055		0,651			
2,0	16M3H11104	8	0,094	0,074	1,062	0,854	±	0,240
2,0	16M3H11104	8	0,054		0,641			
2,0	16M3H11104	8	0,094		1,062			

2,0	16M3H11104	12	0,041		0,504			
2,0	16M3H11104	12	0,087		0,988			
2,0	16M3H11104	12	0,042	0,064	0,514	0,749	±	0,277
2,0	16M3H11104	12	0,087		0,988			
2,0	16M3H11104	16	0,039		0,483			
2,0	16M3H11104	16	0,075		0,862			
2,0	16M3H11104	16	0,037	0,057	0,462	0,667	±	0,225
2,0	16M3H11104	16	0,075		0,862			
2,0	17M3D31089	0	0,054		0,641			
2,0	17M3D31089	0	0,059		0,693			
2,0	17M3D31089	0	0,054	0,057	0,641	0,667	±	0,030
2,0	17M3D31089	0	0,059		0,693			
2,0	17M3D31089	4	0,084		0,957			
2,0	17M3D31089	4	0,09		1,020			
2,0	17M3D31089	4	0,083	0,087	0,946	0,983	±	0,037
2,0	17M3D31089	4	0,089		1,009			
2,0	17M3D31089	8	0,089		1,009			
2,0	17M3D31089	8	0,09		1,020			
2,0	17M3D31089	8	0,089	0,089	1,009	1,012	±	0,005
2,0	17M3D31089	8	0,089		1,009			
2,0	17M3D31089	12	0,071		0,820			
2,0	17M3D31089	12	0,035		0,440			
2,0	17M3D31089	12	0,072	0,054	0,830	0,635	±	0,219
2,0	17M3D31089	12	0,036		0,451			
2,0	17M3D31089	16	0,058		0,683			
2,0	17M3D31089	16	0,068		0,788			
2,0	17M3D31089	16	0,058	0,063	0,683	0,738	±	0,064
2,0	17M3D31089	16	0,069		0,799			

Ek 1.7 – pH 2,5'te Gelişim Testi Sonuçları

pH	Suş Kodu	Süre (Saat)	Absorbans (A°)	Ortalama Absorbans (A°)	Hücre sayısı (log (cfu/mL))	Ortalama Hücre sayısı (log (cfu/mL))		
2,5	745	0	0,060		0,704			
2,5	745	0	0,073	0,066	0,841	0,770	±	0,076
2,5	745	0	0,060		0,704			
2,5	745	0	0,072		0,830			
2,5	745	4	0,138		1,526			
2,5	745	4	0,138	0,153	1,526	1,687	±	0,321
2,5	745	4	0,138		1,526			
2,5	745	4	0,199		2,169			
2,5	745	8	0,325		3,496			
2,5	745	8	0,306	0,314	3,296	3,375	±	0,112
2,5	745	8	0,320		3,444			
2,5	745	8	0,303		3,264			
2,5	745	12	0,489		5,224			
2,5	745	12	0,460	0,474	4,919	5,066	±	0,149
2,5	745	12	0,483		5,161			
2,5	745	12	0,464		4,961			
2,5	745	16	0,644		6,858			
2,5	745	16	0,594	0,460	6,331	4,919	±	3,172
2,5	745	16	0,010		0,176			
2,5	745	16	0,592		6,310			
2,5	9763	0	0,060		0,704			
2,5	9763	0	0,055	0,058	0,651	0,680	±	0,028
2,5	9763	0	0,060		0,704			
2,5	9763	0	0,056		0,662			
2,5	9763	4	0,065		0,757			
2,5	9763	4	0,064	0,065	0,746	0,751	±	0,014
2,5	9763	4	0,066		0,767			
2,5	9763	4	0,063		0,736			
2,5	9763	8	0,085		0,967			
2,5	9763	8	0,073	0,079	0,841	0,904	±	0,067
2,5	9763	8	0,084		0,957			
2,5	9763	8	0,074		0,851			
2,5	9763	12	0,085		0,967			
2,5	9763	12	0,105	0,095	1,178	1,067	±	0,116
2,5	9763	12	0,085		0,967			
2,5	9763	12	0,103		1,157			
2,5	9763	16	0,080		0,915			
2,5	9763	16	0,113	0,096	1,262	1,083	±	0,201
2,5	9763	16	0,079		0,904			
2,5	9763	16	0,112		1,252			
2,5	16M3B11021	0	0,052		0,620			
2,5	16M3B11021	0	0,029	0,042	0,377	0,514	±	0,167
2,5	16M3B11021	0	0,059		0,693			

2,5	16M3B11021	0	0,028		0,367			
2,5	16M3B11021	4	0,072		0,830			
2,5	16M3B11021	4	0,057	0,064	0,672	0,749	±	0,088
2,5	16M3B11021	4	0,071		0,820			
2,5	16M3B11021	4	0,057		0,672			
2,5	16M3B11021	8	0,080		0,915			
2,5	16M3B11021	8	0,071	0,075	0,820	0,857	±	0,051
2,5	16M3B11021	8	0,077		0,883			
2,5	16M3B11021	8	0,070		0,809			
2,5	16M3B11021	12	0,095		1,073			
2,5	16M3B11021	12	0,051	0,072	0,609	0,828	±	0,259
2,5	16M3B11021	12	0,091		1,031			
2,5	16M3B11021	12	0,050		0,599			
2,5	16M3B11021	16	0,076		0,872			
2,5	16M3B11021	16	0,061	0,069	0,714	0,799	±	0,091
2,5	16M3B11021	16	0,077		0,883			
2,5	16M3B11021	16	0,062		0,725			
2,5	16M3D11047	0	0,064		0,746			
2,5	16M3D11047	0	0,051	0,058	0,609	0,680	±	0,076
2,5	16M3D11047	0	0,064		0,746			
2,5	16M3D11047	0	0,052		0,620			
2,5	16M3D11047	4	0,071		0,820			
2,5	16M3D11047	4	0,054	0,063	0,641	0,736	±	0,110
2,5	16M3D11047	4	0,073		0,841			
2,5	16M3D11047	4	0,054		0,641			
2,5	16M3D11047	8	0,061		0,714			
2,5	16M3D11047	8	0,067	0,064	0,778	0,741	±	0,043
2,5	16M3D11047	8	0,059		0,693			
2,5	16M3D11047	8	0,067		0,778			
2,5	16M3D11047	12	0,038		0,472			
2,5	16M3D11047	12	0,048	0,043	0,577	0,525	±	0,061
2,5	16M3D11047	12	0,038		0,472			
2,5	16M3D11047	12	0,048		0,577			
2,5	16M3D11047	16	0,046		0,556			
2,5	16M3D11047	16	0,046	0,047	0,556	0,564	±	0,010
2,5	16M3D11047	16	0,048		0,577			
2,5	16M3D11047	16	0,047		0,567			
2,5	16M3H11104	0	0,058		0,683			
2,5	16M3H11104	0	0,068	0,064	0,788	0,746	±	0,068
2,5	16M3H11104	0	0,059		0,693			
2,5	16M3H11104	0	0,071		0,820			
2,5	16M3H11104	4	0,103		1,157			
2,5	16M3H11104	4	0,123	0,113	1,368	1,257	±	0,122
2,5	16M3H11104	4	0,102		1,146			
2,5	16M3H11104	4	0,122		1,357			
2,5	16M3H11104	8	0,250		2,706			
2,5	16M3H11104	8	0,230	0,239	2,495	2,590	±	0,128
2,5	16M3H11104	8	0,249		2,695			
2,5	16M3H11104	8	0,227		2,464			

2,5	16M3H11104	12	0,386		4,139			
2,5	16M3H11104	12	0,335		3,602			
2,5	16M3H11104	12	0,386	0,360	4,139	3,865	±	0,316
2,5	16M3H11104	12	0,333		3,581			
2,5	16M3H11104	16	0,496		5,298			
2,5	16M3H11104	16	0,474		5,066	5,177	±	0,117
2,5	16M3H11104	16	0,492	0,485	5,256			
2,5	16M3H11104	16	0,476		5,087			
2,5	17M3D31089	0	0,042		0,514			
2,5	17M3D31089	0	0,041		0,504	0,535	±	0,056
2,5	17M3D31089	0	0,052	0,044	0,620			
2,5	17M3D31089	0	0,041		0,504			
2,5	17M3D31089	4	0,087		0,988			
2,5	17M3D31089	4	0,079		0,904	0,941	±	0,049
2,5	17M3D31089	4	0,086	0,083	0,978			
2,5	17M3D31089	4	0,078		0,894			
2,5	17M3D31089	8	0,091		1,031			
2,5	17M3D31089	8	0,087		0,988	1,023	±	0,038
2,5	17M3D31089	8	0,095	0,090	1,073			
2,5	17M3D31089	8	0,088		0,999			
2,5	17M3D31089	12	0,104		1,168			
2,5	17M3D31089	12	0,085		0,967	1,062	±	0,116
2,5	17M3D31089	12	0,103	0,094	1,157			
2,5	17M3D31089	12	0,084		0,957			
2,5	17M3D31089	16	0,117		1,305			
2,5	17M3D31089	16	0,095		1,073	1,197	±	0,131
2,5	17M3D31089	16	0,118	0,107	1,315			
2,5	17M3D31089	16	0,097		1,094			

Ek 1.8 – pH 3,0’te Gelişim Testi Sonuçları

pH	Suş Kodu	Süre (Saat)	Absorbans (A°)	Ortalama Absorbans (A°)	Hücre sayısı (log (cfu/mL))	Ortalama Hücre sayısı (log (cfu/mL))		
3,0	745	0	0,059		0,693			
3,0	745	0	0,050	0,055	0,599	0,649	±	0,058
3,0	745	0	0,060		0,704			
3,0	745	0	0,050		0,599			
3,0	745	4	0,179		1,958			
3,0	745	4	0,193	0,186	2,105	2,026	±	0,080
3,0	745	4	0,179		1,958			
3,0	745	4	0,191		2,084			
3,0	745	8	0,510		5,446			
3,0	745	8	0,564	0,537	6,015	5,725	±	0,335
3,0	745	8	0,508		5,425			
3,0	745	8	0,564		6,015			
3,0	745	12	0,845		8,976			
3,0	745	12	0,940	0,889	9,977	9,439	±	0,586
3,0	745	12	0,837		8,891			
3,0	745	12	0,934		9,914			
3,0	745	16	1,082		11,473			
3,0	745	16	1,198	1,138	12,695	12,063	±	0,671
3,0	745	16	1,084		11,494			
3,0	745	16	1,188		12,590			
3,0	9763	0	0,046		0,556			
3,0	9763	0	0,060	0,053	0,704	0,633	±	0,088
3,0	9763	0	0,046		0,556			
3,0	9763	0	0,061		0,714			
3,0	9763	4	0,286		3,085			
3,0	9763	4	0,237	0,261	2,569	2,817	±	0,298
3,0	9763	4	0,284		3,064			
3,0	9763	4	0,235		2,548			
3,0	9763	8	0,715		7,606			
3,0	9763	8	0,646	0,680	6,879	7,232	±	0,432
3,0	9763	8	0,715		7,606			
3,0	9763	8	0,642		6,837			
3,0	9763	12	1,193		12,643			
3,0	9763	12	1,056	1,126	11,199	11,934	±	0,843
3,0	9763	12	1,197		12,685			
3,0	9763	12	1,057		11,210			
3,0	9763	16	1,326		14,044			
3,0	9763	16	1,291	1,310	13,675	13,873	±	0,229
3,0	9763	16	1,331		14,097			
3,0	9763	16	1,291		13,675			
3,0	16M3B11021	0	0,042		0,514			
3,0	16M3B11021	0	0,030	0,036	0,388	0,448	±	0,076
3,0	16M3B11021	0	0,042		0,514			

3,0	16M3B11021	0	0,029		0,377			
3,0	16M3B11021	4	0,046		0,556			
3,0	16M3B11021	4	0,071	0,059	0,820	0,688	±	0,152
3,0	16M3B11021	4	0,046		0,556			
3,0	16M3B11021	4	0,071		0,820			
3,0	16M3B11021	8	0,080		0,915			
3,0	16M3B11021	8	0,092	0,087	1,041	0,986	±	0,065
3,0	16M3B11021	8	0,083		0,946			
3,0	16M3B11021	8	0,092		1,041			
3,0	16M3B11021	12	0,097		1,094			
3,0	16M3B11021	12	0,100	0,099	1,125	1,115	±	0,026
3,0	16M3B11021	12	0,097		1,094			
3,0	16M3B11021	12	0,102		1,146			
3,0	16M3B11021	16	0,088		0,999			
3,0	16M3B11021	16	0,115	0,102	1,283	1,141	±	0,164
3,0	16M3B11021	16	0,088		0,999			
3,0	16M3B11021	16	0,115		1,283			
3,0	16M3D11047	0	0,038		0,472			
3,0	16M3D11047	0	0,047	0,042	0,567	0,514	±	0,049
3,0	16M3D11047	0	0,038		0,472			
3,0	16M3D11047	0	0,045		0,546			
3,0	16M3D11047	4	0,044		0,535			
3,0	16M3D11047	4	0,048	0,045	0,577	0,543	±	0,031
3,0	16M3D11047	4	0,046		0,556			
3,0	16M3D11047	4	0,041		0,504			
3,0	16M3D11047	8	0,060		0,704			
3,0	16M3D11047	8	0,037	0,048	0,462	0,572	±	0,153
3,0	16M3D11047	8	0,060		0,704			
3,0	16M3D11047	8	0,033		0,419			
3,0	16M3D11047	12	0,061		0,714			
3,0	16M3D11047	12	0,042	0,052	0,514	0,614	±	0,122
3,0	16M3D11047	12	0,062		0,725			
3,0	16M3D11047	12	0,041		0,504			
3,0	16M3D11047	16	0,053		0,630			
3,0	16M3D11047	16	0,062	0,057	0,725	0,675	±	0,052
3,0	16M3D11047	16	0,053		0,630			
3,0	16M3D11047	16	0,061		0,714			
3,0	16M3H11104	0	0,043		0,525			
3,0	16M3H11104	0	0,058	0,051	0,683	0,604	±	0,098
3,0	16M3H11104	0	0,042		0,514			
3,0	16M3H11104	0	0,059		0,693			
3,0	16M3H11104	4	0,293		3,159			
3,0	16M3H11104	4	0,262	0,277	2,832	2,993	±	0,169
3,0	16M3H11104	4	0,289		3,117			
3,0	16M3H11104	4	0,265		2,864			
3,0	16M3H11104	8	0,733		7,796			
3,0	16M3H11104	8	0,743	0,738	7,901	7,848	±	0,055
3,0	16M3H11104	8	0,734		7,806			
3,0	16M3H11104	8	0,742		7,890			

3,0	16M3H11104	12	1,111		11,779			
3,0	16M3H11104	12	1,111		11,779			
3,0	16M3H11104	12	1,113	1,112	11,800	11,789	±	0,012
3,0	16M3H11104	12	1,113		11,800			
3,0	16M3H11104	16	1,271		13,465			
3,0	16M3H11104	16	1,275	1,224	13,507	12,974	±	0,727
3,0	16M3H11104	16	1,225		12,980			
3,0	16M3H11104	16	1,127		11,944			
3,0	17M3D31089	0	0,052		0,620			
3,0	17M3D31089	0	0,075	0,064	0,862	0,743	±	0,137
3,0	17M3D31089	0	0,053		0,630			
3,0	17M3D31089	0	0,075		0,862			
3,0	17M3D31089	4	0,095		1,073			
3,0	17M3D31089	4	0,094	0,095	1,062	1,067	±	0,006
3,0	17M3D31089	4	0,095		1,073			
3,0	17M3D31089	4	0,094		1,062			
3,0	17M3D31089	8	0,102		1,146			
3,0	17M3D31089	8	0,107	0,105	1,199	1,175	±	0,028
3,0	17M3D31089	8	0,103		1,157			
3,0	17M3D31089	8	0,107		1,199			
3,0	17M3D31089	12	0,104		1,168			
3,0	17M3D31089	12	0,108	0,106	1,210	1,189	±	0,024
3,0	17M3D31089	12	0,104		1,168			
3,0	17M3D31089	12	0,108		1,210			
3,0	17M3D31089	16	0,096		1,083			
3,0	17M3D31089	16	0,110	0,103	1,231	1,157	±	0,085
3,0	17M3D31089	16	0,096		1,083			
3,0	17M3D31089	16	0,110		1,231			

EK 1.9 – Kraker ve Kurabiye Örneklerine Ait Fermantasyon Takibi Sonuçları

Kraker Örnekleri pH Sonuçları			Kurabiye Örnekleri pH Sonuçları		
Süre (Saat)	Suş Kodu	Ortalama pH	Süre (Saat)	Suş Kodu	Ortalama pH
0	AT1	5,88 ^a	0	BT1	6,74 ^a
	AT2	5,88 ^a		BT2	6,74 ^a
	AT3	5,88 ^a		BT3	6,74 ^a
24	AT1	4,75 ^b	24	BT1	6,19 ^a
	AT2	4,87 ^a		BT2	6,22 ^{ab}
	AT3	4,78 ^a		BT3	6,25 ^a
48	AT1	4,49 ^b	48	BT1	6,04 ^b
	AT2	4,77 ^a		BT2	6,25 ^a
	AT3	4,71 ^a		BT3	6,22 ^a

Kraker Örnekleri Mikrobiyal Sayım Sonuçları			Kurabiye Örnekleri Mikrobiyal Sayım Sonuçları		
Süre (Saat)	Suş Kodu	Ortalama Logaritmik Sayım Sonucu	Süre (Saat)	Suş Kodu	Ortalama Logaritmik Sayım Sonucu
0	AT1	6,85 ^a	0	BT1	6,87 ^a
	AT2	6,99 ^a		BT2	6,91 ^a
	AT3	6,98 ^a		BT3	6,85 ^a
24	AT1	9,14 ^b	24	BT1	7,84 ^b
	AT2	8,56 ^a		BT2	7,08 ^a
	AT3	8,61 ^a		BT3	7,15 ^a
48	AT1	9,98 ^b	48	BT1	7,99 ^b
	AT2	8,38 ^a		BT2	7,34 ^a
	AT3	8,41 ^a		BT3	7,36 ^a

Saat verilerine göre bir grup içerisinde farklı harflere sahip değerler (ortalama $\pm$ SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, p<0.05.

EK 1.10 – Kraker ve Kurabiye Örneklerine Ait Renk Analizi Sonuçları

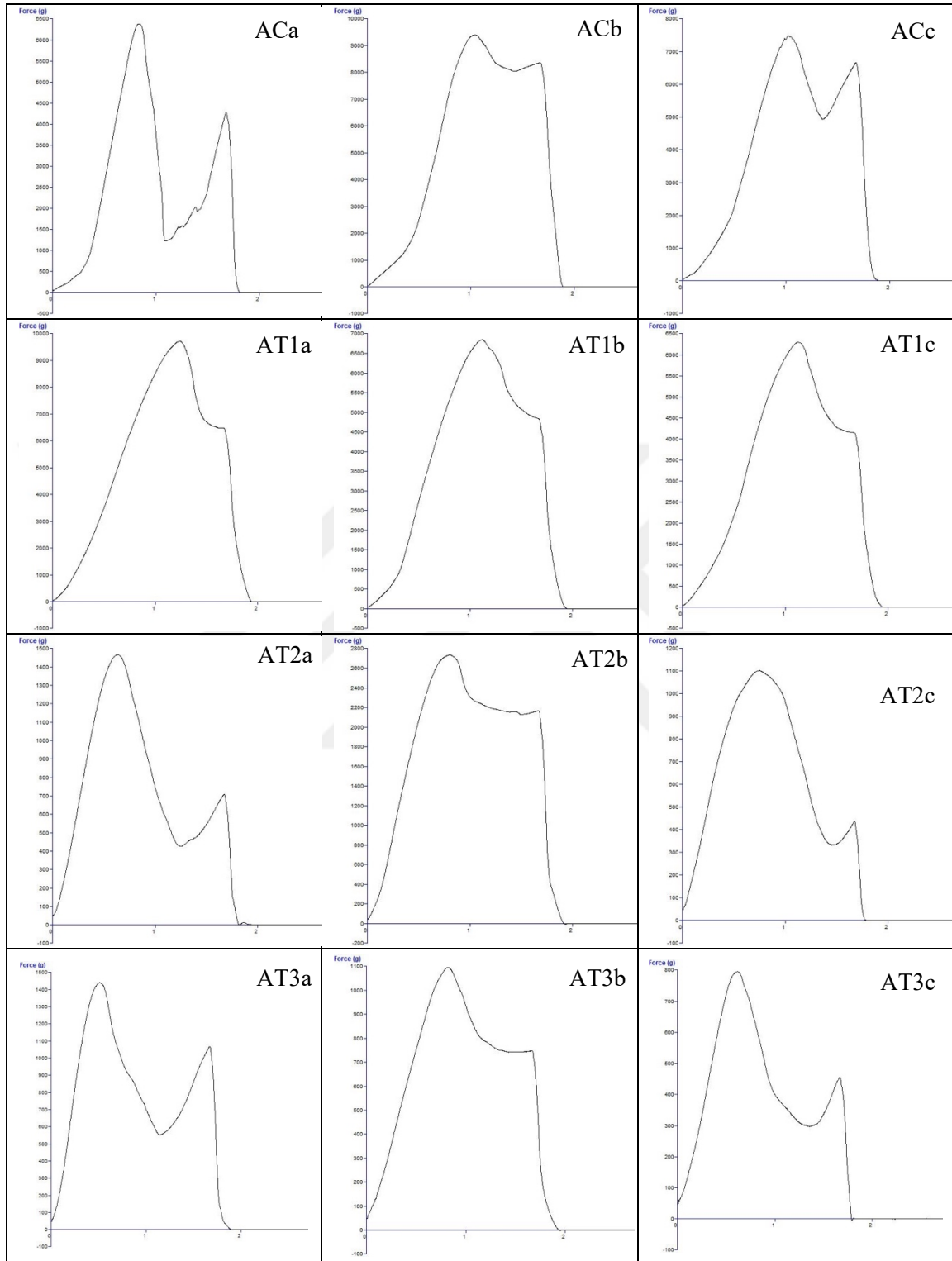
Örnek Kodu	L	ΔL	a	Δa	b	Δb	C	h	ΔE
AT1	47,06	16,93	14,35	-3,07	29,37	11,96	32,69	63,96	20,95
	44,03	15,58	14,4	-1,07	26,66	12,25	30,3	61,63	19,85
	46,93	15,53	14,84	-3,46	29,4	10,47	32,93	63,21	19,05
	47,94	12,46	14,04	-1,46	29,46	10,78	32,64	64,51	16,54
	44,81	17,62	16,56	-6,34	28,48	10,75	32,95	59,82	21,59
	44,8	12,86	16,2	-2,91	28,54	9,47	32,82	60,43	16,23
AT2	42,27	21,72	9,6	1,68	23,18	18,15	25,09	67,51	28,35
	38,56	21,05	7,44	5,89	17,36	21,55	18,88	66,81	30,70
	39,25	19,76	9,54	2,63	19,29	18,48	21,52	63,68	27,18
	41,42	21,04	11,98	-0,6	23,11	16,76	26,03	62,59	26,91
	41,68	20,75	8,52	1,7	19,91	19,32	21,66	66,83	28,40
	41,08	20,4	10,5	2,91	22,32	17,78	24,67	64,8	27,22
AT3	40,9	18,71	9,76	3,57	20,64	18,27	22,83	64,69	26,39
	41,63	17,38	7,98	4,19	20,11	17,66	21,63	68,36	25,13
	43,96	18,5	7,25	4,13	22	17,87	23,17	71,76	26,05
	39,77	20,63	7,89	4,69	19,23	21,01	20,79	67,68	29,82
	43,59	17,89	8,72	4,69	22,6	17,5	24,23	68,91	25,46
	39,6	20	8,12	4,35	18,62	21,4	20,32	66,45	29,61

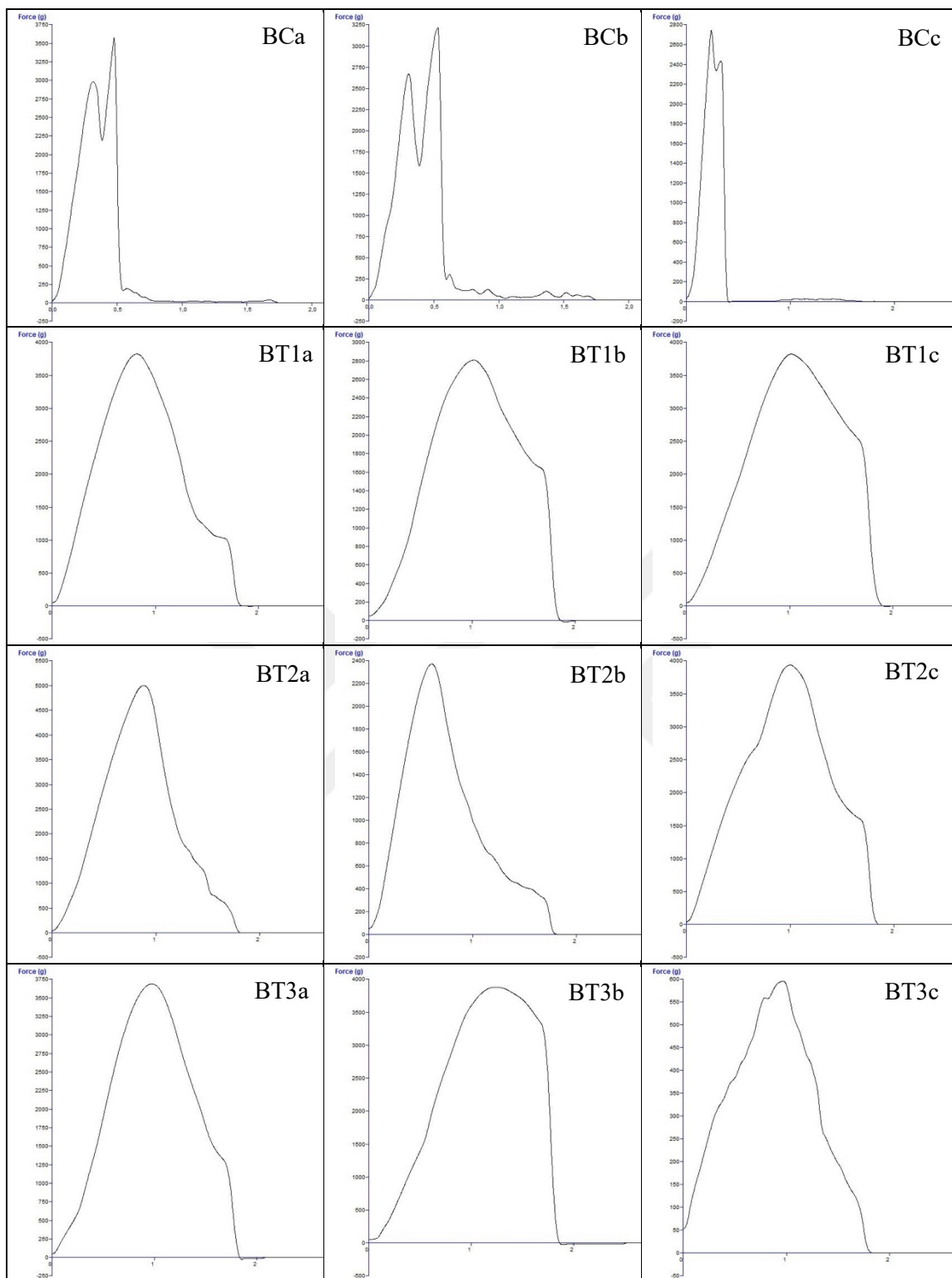
ΔL , Δa , Δb ve ΔE verileri AC kontrol grubuna ait veriler baz alınarak hesaplanmıştır.

Örnek Kodu	L	ΔL	a	Δa	b	Δb	C	h	ΔE
BT1	39,95	30,68	5,48	4,28	16,97	23,19	17,83	72,1	38,70
	48,16	19,04	14,36	-2,98	32,12	7,37	35,18	65,91	20,63
	46,5	21,64	13,75	-7,21	30,23	7,12	33,21	65,53	23,89
	49,64	18,44	14,29	-5,04	33,31	3,78	36,24	66,78	19,49
	47,91	16,66	17,19	-6,37	33,76	3,49	37,88	63,01	18,17
	50,43	15,12	16,15	-3,9	34,72	4,81	38,29	65,05	16,34
BT2	47,26	23,37	15,88	-6,12	31,33	8,83	35,12	63,12	25,72
	47,95	19,25	15,35	-3,97	31,11	8,38	34,69	63,74	21,37
	50,33	17,75	15,71	-6,46	33,97	3,12	37,43	65,17	19,14
	46,83	17,74	15,62	-4,8	31,14	6,11	34,84	63,36	19,37
	43,14	26,7	16,04	-6,17	27,65	9,77	31,97	59,88	29,09
	46,46	22,3	16,19	-4,72	31,54	7,3	35,46	62,83	23,93
BT3	53,27	13,93	8,84	2,54	28,34	11,15	29,69	72,67	18,02
	53,16	16,72	22,78	-15,13	33,33	4,27	35,35	70,54	22,95
	52,29	15,79	11,5	-2,25	33,07	4,02	35,01	70,82	16,45
	49,75	14,82	11,58	-0,76	31,8	5,45	33,84	68,96	15,81
	49,1	16,45	11,12	1,13	30,5	9,03	32,46	69,96	18,80
	47,79	20,97	10,25	1,22	27,99	10,85	29,81	69,89	23,64

ΔL , Δa , Δb ve ΔE verileri BC kontrol grubuna ait veriler baz alınarak hesaplanmıştır.

EK 1.11 – Kraker ve Kurabiye Örnekleri için Tekstür Analiz Grafikleri





EK 2 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

Ek 2.1 – Sayman, B. & Yılmaz, R., “Functional Characteristics of *Saccharomyces boulardii* Strains to Produce Soy-Based Fermented Food Products”, İkinci NIZO Plant Protein Functionality Konferansı”, 11-13 Ekim 2022, Poster Sunumu.

2nd NIZO Plant Protein Functionality Conference, 11-13 October 2022



FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF *SACCHAROMYCES BOULARDII* STRAINS TO PRODUCE SOY BASED FERMENTED FOOD PRODUCTS

Beyza SAYMAN, Remziye YILMAZ*

FoodOmics Research Laboratory, Department of Food Engineering, Hacettepe University, Beytepe Campus, 06800 Ankara, TURKEY

*remziye@hacettepe.edu.tr

P48



INTRODUCTION

With the development of healthy nutrition awareness among consumers worldwide, foods are not merely a means of nutrition but have also started to be noticed as products with benefits. In addition, the trend of plant-based nutrition is growing as they are a much more sustainable and environmentally friendly alternative, especially compared with food of animal origin. To meet these demands simultaneously, this study aims to focus on the identification of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and determine its characteristics in order to be used in soy-based products that were developed with a probiotic yeast and can be used as the most used strain worldwide, *Saccharomyces cerevisiae*, but may also provide functionality.

METHODOLOGY

- For biochemical tests, optimum growth temperatures of all 51 strains of *S. cerevisiae* isolated from certain regions of Anatolia provided by FoodOmics Research Laboratory Culture Collection, were investigated.
- To understand heat stability, strains were incubated for 48 h in YPD (Yeast Peptone Dextrose) Broth at 30, 37, and 45°C in 48-well plates [1].
- For the investigation of glucose and galactose fermentation at the optimum growth temperature of *S. boulardii*, all strains were inoculated in media which contained 20g/L glucose or galactose, 20 mL bromothymol blue (50mg/75mL), 2.25g powdered yeast extract and 3.75g peptone in 1 liter of demineralized water and containing Durham tubes. Incubated at 37°C for 20 days [2].
- Lastly, for the low pH viability test, all experiments were carried out at certain pH values of 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0, respectively. All strains were inoculated in YPD Broth in corresponded pH, adjusted with 1M HCl. All samples were collected at 0, 4, 8, 12, 16 h, and to evaluate the yeast viability, spectrophotometric readings at 600 nm were taken [3].
- For the High Resolution Melting (HRM) analysis, genomic DNAs from broth cultures of all samples were isolated using GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit with minor modifications. Selected genes for differentiation between *S. cerevisiae* and *S. boulardii*, *AAD15* and *MAL11* gene sequences [4] were downloaded from NCBI. Two new primers were designed specifically for this study using the Primer 3 program (Table 1).

Table 1. Designed Primers and Selected Genes for HRM Analysis.

Systematic Name	Gene	Function	Primers (5'-3')
YOL165C	<i>AAD15</i>	Aryl-Alcohol Dehydrogenase	ggatgtcatggagggtgaa actcagtgcattgtctctca
YGR289C	<i>MAL11</i>	Alpha-glucoside transporter	tgggttagcgggtacattt aaccacggcaccattacta

- As control, *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745® and *S. cerevisiae* ATCC®9763 strains were used. The Solis Biodyne Hot FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (ROX) was used for qPCR (Roche Light Cycler® 96), followed by the instruction manual.

REFERENCES

- [1] Growth Characterization of a Novel Strain of *Saccharomyces boulardii* Isolated From Soy Paste, "Front. Nutr.", vol. 7, no. April, pp. 1–10, 2020, doi: 10.3389/fnut.2020.00027.
- [2] C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout, and V. Robert, Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts, vol. 1. Elsevier B.V., 2011.
- [3] J.H. İspirli, F. Demirbaş, and E. Dertli, "Characterization of functional properties of enterococcus faecium strains isolated from human gut," Can. J. Microbiol., vol. 61, no. 11, pp. 861–870, 2015, doi: 10.1139/cjm-2015-0446.
- [4] I. Khatri, R. Tomar, K. Ganesan, G. S. Prasad, and S. Subramanian, "Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*," Sci. Rep., vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-00414-2.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the financial support provided by Hacettepe University BAP (Scientific Research Projects, FYL-2022-20138).

RESULTS

Biochemical Tests

Specific biochemical tests such as low pH viability, optimum growth temperature, and glucose-galactose fermentation ability were applied to differentiate *S. boulardii* strains from *S. cerevisiae* [2]. Table 2 presents *S. boulardii* and *S. cerevisiae* controls with four of the potential *S. boulardii* strains showing viability at 37°C. The selected strains also have the ability to utilize glucose while they cannot ferment galactose.

Table 2. Biochemical Test Results For Potential *S. boulardii* Strains and Reference Strains.

Strains	Source	Viability				Low pH Viability			Optimum Growth Temperature			Fermentation Ability	
		YPD Broth 28 °C 48 h	pH 1.5	pH 2.0	pH 2.5	pH 3.0	28 °C	37 °C	45 °C	Glucose	Galactose		
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	Commercial (Control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> ATCC®9763	Commercial (Control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> HUF16M3H11021	Kırıkkale Grape	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> HUF16M3H11047	Neveşehir Grape	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> HUF16M3H11104	Çankırı Grape	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> HUF17M3D31089	Neveşehir Grape	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

One of the potential *S. boulardii* strains (HUF16M3H11104) showed the desired characteristics as 2.5 pH viability, the growth temperature of 37°C, and not utilizing galactose. Showing similar results as the control *S. boulardii*; therefore, it was selected for HRM analysis.

HRM Analysis

HRM was performed to identify selected strains as *S. boulardii* by using qPCR to be used in future studies for fermentation of soy-based products.

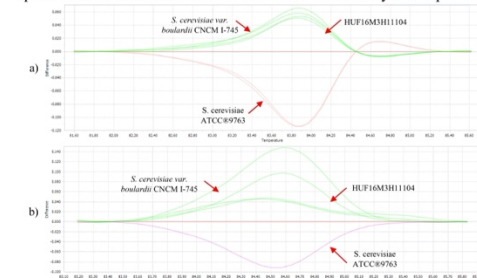


Figure 1. HRM Difference Plots for *AAD15* Gene (a) and *MAL11* Gene (b)

As seen in Figure 1, difference plots for *AAD15* and *MAL11* genes were obtained. The *AAD15* plot represents more reliable results when compared to *MAL11*. Nevertheless, both results satisfy the identification of *S. boulardii* successfully. As a result HUF16M3H11104 was identified as *S. boulardii*.

CONCLUSION

- The HUF16M3H11104 *S. boulardii* strain selected due to biochemical test results and identified by using HRM Analysis can be suitable for fermentation in replacement of *S. cerevisiae* to improve plant-based product quality.
- Considering the results, it has been observed that HRM can be successfully performed using primers designed for *AAD15* and *MAL11* genes.
- Future steps include an investigation of the products obtained from fermentation with identified *S. boulardii* strains. For further investigation, sensory and chemical differences should be considered while comparing traditional fermented products with *S. boulardii*.

Ek 2.2 – Sayman, B. & Yılmaz, R., “Use of Real-time PCR and High-Resolution Melting Analysis for the Identification and Discrimination of *Saccharomyces boulardii* strains by *AAD15* and *MAL11* genes”, Birinci Biotech Studies Kongresi, 9-11 Ekim 2022, Sözlü Sunum.

1st International Congress on Biotech Studies (ICBIOS)

Use Of Real-Time PCR and High-Resolution Melting Analysis for the Identification and Discrimination of *Saccharomyces boulardii* Strains by *AAD15* and *MAL11* Genes

Beyza SAYMAN^{1*} (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9263-1373>),
Remziye YILMAZ¹ (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2041-1205>)

¹Hacettepe University, Department of Food Engineering, FoodOmics Research Laboratory,
Beytepe Campus, 06800 Ankara, TURKEY

*beyzasayman@hacettepe.edu.tr

With the awareness of healthy nutrition developing around the world, foods have ceased to be only for nutritional purposes, and the demand for functional foods has increased at a high rate. Functional foods are frequently preferred due to their features such as providing basic nutritional requirements as well as having a positive effect on chronic diseases and gastrointestinal health. Various microorganisms can be used for foods to have functional properties. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* is a probiotic yeast that can provide functionality. The use of *S. boulardii*, a variety of *S. cerevisiae* which is one of the most used microorganism worldwide, is frequently preferred in the food industry. *S. boulardii*, which has been proven to be effective especially in the treatment of diarrhea by *in vivo* and *in vitro* studies, can provide advantage against other microorganisms, mainly due to its ability to grow optimally at body temperature and to remain viable even at gastric pH.

The aim of this study was to design a new HRMA assay to differentiate *Saccharomyces boulardii* with *Saccharomyces cerevisiae* by two new primers specifically designed for both *AAD15* and *MAL11* genes for this study. HRMA is a cost effective and fast method being used for gene scanning and genotyping. For the rtPCR-HRMA all of the *Saccharomyces cerevisiae* strains were provided by FoodOmics Culture Collection. Considering the optimum growth temperatures and viability at gastric pH, one of the strains were suitable for DNA extraction followed by HRMA. For control *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745® and *S. cerevisiae* ATCC®9763 were used. As a result, both primers for *AAD15* and *MAL11* genes were successfully able to differentiate *Saccharomyces boulardii* strains by using rtPCR-HRMA.

Keywords: *S. boulardii*, Identification, rtPCR, High-Resolution Melting Analysis.

Ek 2.3 – Sayman, B. & Yılmaz, R., *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces boulardii* Kullanılarak Elde Edilen Soya Unu Takviyeli Fermente Ürünlerde Kalite Parametrelerinin Belirlenmesi, 22. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, 20-22 Ekim 2023, Sözlü Sunum.

***S. cerevisiae* ve *S. boulardii* Kullanılarak Elde Edilen Soya Takviyeli Fermente Ürünlerde Kalite Parametrelerinin Belirlenmesi**

Beyza Sayman^{1,2}, Remziye Yılmaz^{1,3}

¹Foodomics Laboratuvarı, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Hacettepe Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

²Gıda Mühendisliği Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

³Uluslararası Gıda Biyogüvenlik ve Biyoteknoloji Araştırma ve Yayın Merkezi (ıfbbc), Hacettepe Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

beyzasayman@hacettepe.edu.tr

Giriş

Fermente soya ürünleri dünyada tüketilmektedir ve sağlıklı gıda arayışına yanıt veren önemli çözüm önerilerinden biridir. *Saccharomyces boulardii* (Sb), gıda endüstrisinde fermentasyon amacıyla en çok kullanılan mikroorganizma olan *Saccharomyces cerevisiae* (Sc)'nin probiyotik bir varyetesidir. Bu çalışmada Sc ve Sb kullanılarak fermente edilen soya ile takviye edilmiş hamur fermentasyonu sırasında ve bu hamur kullanılarak elde edilen soya bazlı kraker ve kurabiyede kalite parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereçler ve Yöntemler

FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan Sc ve Sb kültürleri kullanılarak soya takviyeli hamur formülasyonu (3 birim soya unu:1 birim buğday unu) ve bu hamurun farklı Sc ve Sb suşları ile fermentasyonu (48 h) optimize edilmiştir. Fermentasyon süresi boyunca 0, 24 ve 48. saatlerde örnekler alınarak pH ve mikroorganizma sayımı yapılmıştır. Soya bazlı kraker ve kurabiyede nem, kuru madde, kül (AACC44-15A metodu) ve protein (Bradford Metodu) içerikleri hesaplanmıştır.

Bulgular

Fermentasyon boyunca elde edilen pH ölçümlerinde, hem kurabiye ve hem de kraker için Sc kullanılan örneklerin pH değişimlerinin Sb kullanılan örneklere göre yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Nem, kuru madde ve kül analizlerinde ise farklı Sc ve Sb suşları ile fermente edilen ürünler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sonuç, yüzde protein içerikleri bakımından da aynıdır.

Sonuç ve Tartışma

Buna göre, soya takviyesi ile elde edilen ürünlerin üretiminde fermentasyon için Sc yanı sıra Sb de kullanılabileceği görülmüştür. Son üründe primer metabolit kompozisyonunu ortaya çıkarmak için ileri analizlere ve duyu muayeneye ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, Fermentasyon, Soya

Teşekkür: Hacettepe Üniversitesi BAP'a (20138) çalışma için sağladıkları olanaklar nedeniyle teşekkür ederiz.