

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
2024-YL-70

EKŞİ HAMUR FERMANTASYONUNDAN İZOLE EDİLEN
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN GLUTENİ HİDROLİZE
ETME VE PROBİYOTİK POTANSİYELİ

Rana GÖNÜL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Çisem BULUT ALBAYRAK

AYDIN-2024

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı öğrencisi RANA GÖNÜL tarafından hazırlanan “EKŞİ HAMUR FERMANTASYONUNDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN GLUTENİ HİDROLİZE ETME VE PROBİYOTİK POTANSİYELİ” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:07/08/2024

Üye (T.D.) :	Doç. Dr. Çisem BULUT ALBAYRAK	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Doç. Dr. Olcay BOYACIOĞLU	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Seda GENÇ	Yaşar Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Fen Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan numaralı Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ethem AKTÜRK

Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında değerli bilgilerini benimle paylaşıp yardımlarını esirgemeyen, yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren, her zaman yanımda hissettiğim danışman hocam Sayın Doç. Dr. Çisem BULUT ALBAYRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren Sayın Doç. Dr. Olcay BOYACIOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarımda bilgileriyle çalışmalarına destek olan Öğr. Gör. Dr. Mustafa DURAN'a, Giresun ilinden geleneksel ekşi maya hamur örneklerini getirerek çalışmama katkıda bulunan Eren GÜVENDİ'ye teşekkür ederim.

Son olarak, hayatım boyunca sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim bana her daim güvenen aileme teşekkürü borç bilirim.



BİLİMSEL ETİK BEYANI

“EKŞİ HAMUR FERMANTASYONUNDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN GLUTENİ HİDROLİZE ETME VE PROBİYOTİK POTANSİYELİ” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Rana GÖNÜL

07/08/2024



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	iii
BİLİMSEL ETİK BEYANI	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
ÖZET	xxiii
ABSTRACT	xxv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Ekşi Maya Hamuru ve Mikroflorası.....	5
2.2. Ekşi Maya Üretim Prosesi	10
2.3. Ekşi Maya Hamurunun Sağlık Açısından Önemi.....	15
2.3.1. Ekşi Maya Hamurunun Probiyotik, Postbiyotik ve Prebiyotik Potansiyeli.....	18
2.3.2. Ekşi Maya Hamurundaki Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Potansiyeli	20
2.4. Gluten Proteini ve Gluten Hassasiyeti.....	30
2.5. Gıda Endüstrisinin Gluten İnflamasyonuna Sunduğu Yenilikçi Çözümler	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Ekşi Maya Hamuru Örnekleri.....	35
3.1.2. Referans Mikroorganizmalar	35
3.1.3. Besiyeri ve Kimyasallar	35
3.2. Yöntem	36
3.2.1. Ekşi Maya Hamurundan Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu	36
3.2.1.1. İzolasyon ve Saflaştırma.....	36
3.2.1.2. Saflaştırma	36
3.2.2. Hücre Morfolojisi İnceleme ve Ön Tanımlama	37
3.2.1.3. Laktik Asit Bakterisi Ön Tanımlama	37

3.2.1.3.1. Katalaz Testi	37
3.2.1.3.2. Gram Boyama.....	37
3.2.3. İzolatların Uzun Süreli Muhafazası	38
3.2.4. Glutenli Besiyerinde LAB Suşlarının Gluten Hidroliz Etme Yetenekleri	38
3.2.5. Glutenli Besiyerinde LAB'ların Gelişme Yetenekleri	39
3.2.6. Asit ve Safra Tuzu Toleransına Göre Ön Eleme	39
3.2.6.1. Aside Karşı Dayanıklılık Testi.....	39
3.2.6.2. Safra Tuzuna Direnç	40
3.2.6.3. İzolatların Simüle Mide ve Pankreatik Sıvılarına Toleransı.....	40
3.2.7. Diğer Başlıca Probiyotik Özelliklerin Değerlendirilmesi	42
3.2.7.1. Otoagregasyon	42
3.2.7.2. Koagregasyon	42
3.2.7.3. Hidrofobisite.....	43
3.2.7.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	43
3.2.7.5. Antibiyotik Direnci	44
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	45
4.1. İzolasyon ve Saflaştırma.....	45
4.2. Gram Boyama ve Katalaz Testi	45
4.3. Glutenli Besiyerinde LAB Suşlarının Gluten Hidroliz Etme Yetenekleri	50
4.4. Glutenli Besiyerinde LAB'ların Gelişme Yetenekleri	51
4.5. Asit ve Safra Tuzu Toleransına Göre Ön Eleme	52
4.5.1. Aside Karşı Dayanıklılık Testi.....	52
4.5.2. Safra Tuzuna Direnç	54
4.6. İzolatların Simüle Mide ve Pankreatik Sıvılarına Toleransı	57
4.7. Diğer Başlıca Probiyotik Özelliklerin Değerlendirilmesi	58
4.7.1. Otoagregasyon	58
4.7.2. Koagregasyon	59
4.7.3. Hidrofobisite.....	60
4.7.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	61
4.7.5. Antibiyotik Direnci	63
4.8. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması	65

5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
6. KAYNAKLAR	71
7. EKLER.....	83
ÖZ GEÇMİŞ.....	95





SİMGELER DİZİNİ

°C Celcius

μm Mikrometre





KISALTMALAR DİZİNİ

<i>B. cereus</i>	: <i>Bacillus cereus</i>
C	: kloramfenikol
<i>Coml. crustorum</i>	: <i>Commensalibacter crustorum</i>
<i>Coml. mindensis</i>	: <i>Commensalibacter mindensis</i>
<i>Coml. nantensis</i>	: <i>Commensalibacter nantensis</i>
<i>Coml. paralimentarius</i>	: <i>Commensalibacter paralimentarius</i>
CN	: Gentamisin
E	: Eritromisin
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. durans</i>	: <i>Enterococcus durans</i>
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
EFSA	: European Food Safety Authority
<i>E. mundtii</i>	: <i>Enterococcus mundtii</i>
EPS	: Ekzopolisakkarit
FDA	: Food and Drug Administration
FODMAP	: Fermente Olabilen Oligosakkaritler, Disakkaritler, Monosakkaritler ve Polioller
<i>F. prausnitzii</i>	: <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
<i>Frul. sanfranciscensis</i>	: <i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>
g	: gram
GABA	: Gama-aminobütirik asit
GI	: Gastrointestinal
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
Kob	: Koloni oluşturan birim

<i>K. pneumonia</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>K. marxianus</i>	: <i>Kluyveromyces marxianus</i>
I	: Orta düzey dirençli
LAB	: Laktik asit bakterileri
l	: litre
<i>L. acidophilus</i>	: <i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. citreum</i>	: <i>Lactobacillus citreum</i>
<i>L. crispatus</i>	: <i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>L. casei</i>	: <i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>L. delbrueckii</i>	: <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>L. fermentum</i>	: <i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>L. frumenti</i>	: <i>Lactobacillus frumenti</i>
<i>Lact. garvieae</i>	: <i>Lactobacillus garvieae</i>
<i>L. innocua</i>	: <i>Lactobacillus innocua</i>
<i>L. mesenteroides</i>	: <i>Lactobacillus mesenteroides</i>
<i>L. monocytogenes</i>	: <i>Lactobacillus monocytogenes</i>
<i>L. panis</i>	: <i>Lactobacillus panis</i>
<i>L. pontis</i>	: <i>Lactobacillus pontis</i>
<i>L. reuteri</i>	: <i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lb. sakei</i>	: <i>Lactobacillus sakei</i>
<i>L. sanfranciscensis</i>	: <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>L. welshimeri</i>	: <i>Lactobacillus welshimeri</i>
<i>Lacp. plantarum</i>	: <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Levl. brevis</i>	: <i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Leu. citreum</i>	: <i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Leu. mesenteroides</i>	: <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

<i>Lp. plantarum</i>	: <i>Lactoplanibacillus plantarum</i>
MRS	: de Man, Rogosa, Sharpe agar
OD	: Optik densite
P	: Penisilin
PBS	: fosfat tampon
PCR analizi	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDO	: Protected Designation of Origin (Menşe Adı Koruması)
PGI	: Protected Geographical Indication (Korunmuş Coğrafi İşaret)
<i>P. pentosaceus</i>	: <i>Pediococcus pentosaceus</i>
R	: Dirençli
Rpm	: Revolution per minute
S	: Duyarlı
S	: Streptomisin
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCFA	: Short-Chain Fatty Acids (Kısa Zincirli Yağ Asitleri)
<i>Sh. Dysenteriae</i>	: <i>Shigella dysenteriae</i>
<i>S. typhimurium</i>	: <i>Salmonella typhimurium</i>
<i>W. anomalus</i>	: <i>Wickerhamomyces anomalus</i>
<i>Y. enterocolitica</i>	: <i>Yersinia enterocolitica</i>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. LAB'ların homofermentatif (düz çizgi) ve heterofermentatif (kesik çizgi) laktik asit bakterilerinin metabolik yolları.	7
Şekil 2.2. Un-su karışımının inoküle edilmesine dayalı çeşitli tipte ekşi maya üretim süreçleri.	12
Şekil 2.3. Üretim proses teknolojisine göre çeşitli ekşi maya hamurları	14
Şekil 2.4. Ekşi hamur mikroorganizmaları tarafından üretilen metabolitlerin unlu mamuller/ fırıncılık ürünleri üzerindeki önemi.....	18
Şekil 2.5. Glutenle İlişkili Rahatsızlıklar	31
Şekil 2.6. Probiyotiklerin çölyak hastalığına karşı gösterdiği enzim reaksiyonu	33
Şekil 4.1. İzolatların seçilen sürelerde gösterdikleri otoagregasyon değerleri.....	59
Şekil 4.2. İzolatların ksilene karşı % hidrofobisite grafiği.....	61



RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1. Temsili izolatın MRS Agar besisi ortamında çizgi plaka görünümü (L9).	45
Resim 4.2. Gram boyama ile ışık mikroskobu görüntüsü (K27/K 35)	49
Resim 4.3. Temsili LAB suşlarının gluten hidrolizi incelemeleri (L9/L10/L11/L12) ...	51
Resim 4.4. Temsili izolatların <i>E. coli</i> (ATCC 11229) ve <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi (L 15, K 16, K 26).	63
Resim 4.5 Temsili izolatların (L2, L11, K16) antibiyotik duyarlılığı (a: Tetrasiklin, b: Kloramfenikol, c: Eritromisin).	65



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Ekşi maya hamuru mikrobiyotasındaki bakteriler	9
Çizelge 2.2. Ekşi maya hamuru mikrobiyotasındaki mayalar	10
Çizelge 2.3. Ticari probiyotiklerde kullanılan bazı LAB türleri	21
Çizelge 2.4. Ekşi maya hamuru LAB florası ve probiyotik potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar.....	24
Çizelge 2.5. Tahıllarda bulunan prolaminler	30
Çizelge 3.1. Ekşi maya hamur örnekleri	35
Çizelge 4.1. İzolat kaynakları ve mikroskop görüntüleri	46
Çizelge 4.2. 44 LAB suşunun glutenli besiyerinde gluten hidrolizi	50
Çizelge 4.3. Glutenli besiyerinde en yüksek canlılık gösteren izolatlar	52
Çizelge 4.4. İzolatların mide asidine toleransı (pH 2,5).....	53
Çizelge 4.5. İzolatların safra tuzuna toleransı	55
Çizelge 4.6. İzolatların safra tuzu tolerans oranları.....	56
Çizelge 4.7. İzolatların simüle mide bağırsak ortamında canlılığı.....	57
Çizelge 4.8. İzolatların 6. Saat/10.saat % otoagregasyon değerleri	58
Çizelge 4.9 İzolatların koagregasyon değerleri.	60
Çizelge 4.10. Seçili izolatların Hücre yüzey hidrofobisite özellikleri.	61
Çizelge 4.11. Seçili izolatların antimikrobiyal özellikleri (mm).	62
Çizelge 4.12. İzolatların antibiyotik direnci.	64



ÖZET

EKŞİ HAMUR FERMANTASYONUNDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN GLUTENİ HİDROLİZE ETME VE PROBİYOTİK POTANSİYELİ

Gönül R. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Doç. Dr. Çisem Bulut Albayrak, Aydın, 2024.

Amaç: Çeşitli fermente süt ürünleri uzun yıllardan beri üretilmesine karşın, bitkisel esaslı fermante ürünler son yıllarda daha fazla dikkat çekmektedir. Vejetaryen beslenme eğilimleri, bitkisel esaslı fermente ürünlerin sağlık faydaları üzerine yeni bulgular, değişen tüketici tercihleri üzerinde etkili olmuştur. Ekşi maya fermentasyonuna dayalı gıdalar, mikrofloradaki laktik asit bakterileri (LAB) faaliyetleri sonucunda ürüne ve tüketici sağlığına birçok fayda sağlamaktadır. Bu mikroorganizmalar, probiyotik potansiyellerinin yanı sıra gluteni degrade etme yetenekleri ile; günümüzde önemli sağlık sorunlarından biri olan gluten hassasiyeti konusunda yeni çözümler için kullanılabilirler. Bu tez çalışmasının amacı, ekşi mayadan laktik asit bakterileri izole ederek potansiyel probiyotik olma özelliklerinin (düşük pH, safra toleransı, antibiyotiğe duyarlılığı mide asitliğine direnç, gastrointestinal sistem koşullarına direnç) taranması, gluteni parçalama özelliklerinin belirlenmesi ve bu doğrultuda gluten hassasiyeti yaşayan bireylerin tüketimine uygun gıda ürünlerinin geliştirilmesi için yenilikçi bir yaklaşım ortaya koymaktır.

Materyal ve Yöntem: LAB izolasyonu için 6 adet ekşi maya hamur örneği kullanılmıştır. İzolatlar çizgi plaka yöntemiyle saflaştırılıp Gram boyama ve katalaz testi ile ön tanımlama yapılmıştır. Ardından, glutenli besiyerinde gelişim yeteneklerine göre seçilen izolatların gluten hidrolize etme potansiyelleri analiz edilmiştir. Gluteni parçalayan izolatların başlıca probiyotik özellikleri pH direnci, safra tuzuna tolerans, simüle mide ve pankreatik sıvılarına toleransı, otoagregasyon, koagregasyon,

hidrofobisite, antibiyotik direnç ve antimikrobiyal aktivite testleri ile belirlenmiştir. Son olarak, izolatların tür düzeyinde tanımlanmaları 16S rRNA dizi analizi ile belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmanın sonunda, 44 izolat saflaştırılmış ve laktik asit bakterisi olarak ön tanımlaması yapılmıştır. İzolatlardan 16 tanesi glutenli besi ortamında yüksek gelişme potansiyeli göstermiştir. Bu izolatların 8 tanesi yüksek gluten hidrolizi potansiyeline ek olarak pH 2,5’da yüksek canlılık özellikleri nedeni ile seçilmiştir. Seçilen izolatlar safra tuzuna tolerans göstermiştir. Değişen düzeylerde otoagregasyon değerleri (%1,93-31,72), hidrofobisite (%21,11-%57,73) ve koagregasyon özellikleri (%24,39-%33,04) belirlenmiştir. İzolatların tümü, simüle mide bağırsak geçişi sonrasında 10^6 kob/ml üzerinde canlılık ile istenilen probiyotik kriterini sağlamıştır. Tüm patojenler bakteri izolatları tarafından inhibe edilmiştir ancak en çok *Bacillus cereus*’a karşı inhibisyon zonu oluşturmuşlardır. İzolatların çoğunun vankomisine ve streptomisine dirençli olduğu bulgulanmıştır. Son olarak, 8 izolatın *Enterococcus*, *Levilactobacillus* ve *Lactiplantibacillus* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Ekşi maya hamurundan izole edilen LAB’lar, probiyotik potansiyeli yüksek ve gluten degrade eden bakterileri içermektedir. Yüksek gluten hidrolizi gösteren izolatlardan başlıca probiyotik kriterleri sağlayan L11 kodlu *Enterococcus faecium*, K26 kodlu *Levilactobacillus spicheri* ve K35 kodlu *Lactiplantibacillus plantarum* bakterileri gluten hassasiyetini gözetten probiyotik takviye veya tahıl bazlı probiyotik içeceklerin geliştirilmesinde kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterisi, Ekşi maya, Gluten, Gluten hassasiyeti, Probiyotik

ABSTRACT

GLUTEN HYDROLYSIS AND PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM SOURDOUGH FERMENTATION

Gönül R. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Food Engineering, Master's Thesis, Advisor: Doç. Dr. Çisem Bulut Albayrak, Aydın, 2024

Objective: While various fermented dairy products have been produced for many years, plant-based fermented products have gained more attention in recent years. The health benefits of plant-based fermented products and the trends in vegetarian diets have influenced changing consumer preferences. Sourdough fermentation based food products provide numerous benefits to the product and consumer health due to the activities of lactic acid bacteria (LAB) in the microflora. These microorganisms, with their probiotic potentials and gluten-degrading abilities, can be used to find new solutions for gluten sensitivity, which is an important health issue today. The aim of this thesis is to isolate lactic acid bacteria from sourdough, to screen their potential probiotic properties (low pH, bile tolerance, antibiotic susceptibility, gastric acid resistance, resistance to gastrointestinal conditions), to determine their gluten-degrading properties, and to present an innovative approach for developing food products suitable for consumption by individuals with gluten sensitivity.

Materials and Methods: Six sourdough samples were used for the isolation of LAB. The isolates were purified by the streak plate method and preliminarily identified by Gram staining and catalase testing. The gluten hydrolysis potential of the selected isolates was then analyzed based on their ability to grow in gluten-containing media. The main probiotic properties of the isolates with gluten-degrading potential were determined by pH resistance, bile salt tolerance, simulated gastric and pancreatic juice tolerance, autoaggregation, coaggregation, hydrophobicity, antibiotic resistance, and antimicrobial activity tests. Finally, the species-level identification of the isolates was determined by 16S rRNA sequencing analysis.

Results: At the end of the study, 44 isolates were purified and preliminarily identified as LAB. Sixteen of the isolates showed high growth potential in gluten-containing media. Eight of these isolates were selected due to their high gluten hydrolysis potential and significant viability at pH 2.5. Selected isolates highly tolerated bile salts. Autoaggregation values (1.93-31.72%), hydrophobicity (21.11-57.73%), and coaggregation properties (24.39-33.04%) were determined at varying levels. All isolates met the desired probiotic criterion with viability above 10^6 cfu/ml after simulated gastrointestinal passage. All pathogens were inhibited by the bacterial isolates, with the largest inhibition zones against *Bacillus cereus*. Most isolates were found to be resistant to vancomycin and streptomycin. Finally, eight isolates were identified as belonging to the genera *Enterococcus*, *Levilactobacillus*, and *Lactiplantibacillus*.

Conclusion: LAB isolated from sourdough contain high probiotic potential and gluten-degrading bacteria. Isolates with high gluten hydrolysis, such as *Enterococcus faecium* coded as L11, *Levilactobacillus spicheri* coded as K26, and *Lactiplantibacillus plantarum* coded as K35, can be used in the future for the development of probiotic supplements or cereal-based probiotic beverages that consider gluten sensitivity.

Keywords: Lactic acid bacteria, Sourdough, Gluten, Gluten sensitivity, Probiotic

1. GİRİŞ

Günümüzde raflarda birçok fermente ürün yer almasına karşın fermente gıda ürünlerinin birçoğunu süt ürünleri oluşturmaktadır. Ancak yüksek kolesterol içeriği, laktoz intoleransı bulunan ve vegan diyet takip eden tüketiciler tarafından tüketilememesi nedeniyle tüketiciler daha sağlıklı bir seçenek olan tahıl bazlı fermente ürünlere yönelmektedir. Ekşi maya ve ekşi hamur terimleri genellikle birbirinin yerine kullanılmakla birlikte, her iki ifade de geleneksel fermente edilmiş hamur kültürünü tanımlamak için kullanılmaktadır (Örü ve Hendek Ertop, 2021). Ülkemizde daha çok ekşi maya fermantasyonuna dayalı ekmek üretimi yaygın iken dünyada pizza, kurabiye, kraker, makarna gibi çeşitli ürünler bu yöntemle üretilmektedir. Endüstriyel ekmek üretimi çoğunlukla *Saccharomyces cerevisiae* mayası ve fermantasyonuna dayalı olarak gerçekleşmektedir. Ekmek besleyici, doyurucu özelliklerinin yanı sıra beslenme alışkanlıkları, kolay bulunur ve ucuz olması yönleriyle asırlar boyu ülkemizde ilgiyle tüketilmektedir. Türkiye’de yılda ortalama kişi başına 200-300 kg ekmek tüketildiği ve beslenmeden elde edilen enerjinin %66’sının tahıllardan sağlandığı bilinmektedir (Erdem ve Gökmen, 2022). Mayalı ilk ekmek üretiminin Mısır’da tesadüfen hamurun bırakılması sonucu kendi kendine fermente olması ile gerçekleştiği bildirilmektedir (Demir, 2020). Ülkemizde ve dünyada, ekşi mayanın hamura sağladığı gerek teknolojik katkılar gerekse sağlık faydaları nedeniyle ekşi mayalı ekmeklere talep ve ilgi giderek artmaktadır. Bu katkılara örnek olarak ekmeğin bayatlamasının geciktirilmesi, ekmek tekstürünün iyileştirilmesi gösterilebilir (Demir, 2020; Gül vd., 2021; Bircan vd., 2017).

Ekşi maya fermantasyonuna dayalı üretimlerde maya ve bakteri faaliyetleri birlikte etkili olmaktadır. Bu üretimler spontan fermantasyon, kültür ilavesi, geri ürün beslemesi gibi yöntemlerle gerçekleşmektedir. Ekşi maya hamurundaki laktik asit bakterileri (LAB) florası ve çeşitliliği özellikle sağlık nedenleriyle son yıllarda daha çok ilgi çekmektedir. Bundan dolayı, ekşi maya hamuru fermantasyonu ile üretilen çeşitli ürünler, mikrofloradaki LAB’ların gösterdiği metabolik aktiviteler sonucunda ürüne ve tüketici sağlığına birçok fayda sağlamaktadır (Akamine vd., 2023). Bu mekanizmalar arasında proteolitik aktiviteleri ile sindirimin kolaylaştırılması, organik asitlerin üretimi

ve nişasta sindiriminin geciktirilmesi ile glisemik indeksin iyileştirilmesi, sindirilemeyen bazı kısa zincirli karbonhidratların (FODMAP) içeriğinin azaltılması, fitaz enzim aktivitesi sayesinde minerallerin biyoyararlanımlarının artırılması, fenolik bileşiklerin parçalanması ile artan antioksidan özellikler yer almaktadır. Ayrıca GABA (Gama-aminobütirik asit) ve çeşitli vitaminler gibi maddeleri sentezleyerek sağlık üzerinde etkili olmaktadır (Akamine vd., 2023; Elvan ve Harsa, 2023).

Bu mikroorganizmaların bir diğer önemli sağlık faydası gluteni hidrolize etme yetenekleri ile ilişkilidir. Günümüzde temel besin maddelerinden biri olan tahıl ürünleri, içerdikleri gluten proteini nedeniyle bireyler arasında değişen düzeylerde hastalıklara yol açabilmektedir. Hafif gluten hassasiyeti gibi tam tespit edilememiş rahatsızlıkların yanında, çölyak hastalığı gibi ciddi semptomlara sahip sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıkların tedavisi için tek tedavi yöntemi olarak ömür boyu takip edilecek glutensiz bir diyet önerilmektedir (Kunduhoglu, 2020). Ayrıca, tedavilerde özel olarak geliştirilmiş probiyotik takviyeler çeşitli faydalar sağlayabilmektedir. Bu noktada gıda endüstrisinin sunduğu yenilikçi yaklaşımlar da ayrıca önem taşımaktadır. Sunulan yeni bakış açılarından biri probiyotiklerin kullanımı ile, glutenin çölyak hastaları tarafından tolere edilmesini sağlayacak güvenli moleküllere indirgenmesidir. Fermantasyon, gluten hassasiyeti yaşayan bireyler için toksik olan protein moleküllerinin düzeyini azaltarak, bu bireyler tarafından tüketilebilecek ürünlerin geliştirilmesine katkı sağlar (Cristofori vd., 2020; Fraberger vd., 2020).

Ekşi maya hamurundan izole edilen laktik asit bakterileri probiyotik potansiyele sahip olmaları ve gluten degrade etme yeteneklerinin bulunması; faydalı yeni ürünlerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle glutenle ilgili hassasiyet yaşayan tüketiciler ve çölyak hastaları için, gluteni azaltılmış ya da tamamen uzaklaştırılmış ürünlerin geliştirilmesinde önemli rol oynayabilmektedir.

Ekşi maya ekmeklerinin üretiminde rol oynayan LAB'ların türlerinin belirlenmesi ve karakterizasyonu ekşi maya florası için var olan bulgulara katkı sağlayacaktır. Dünyada ekşi mayadan LAB izolasyonu ve tanımlanmasına yönelik çok sayıda çalışma olmasına karşın ülkemizde bu konuda yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalara (Yurttaş vd., 2023; Kunduhoglu ve Hacıoglu, 2020) ek olarak farklı bölgelerden örneklerin araştırılması floradaki LAB çeşitliliğinin ve potansiyelinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunur. Bu tip çalışmalar geleneksel yöntemlerle üretilen ekşi maya

ekmeklerinin potansiyel faydalarını ortaya koyarken endüstriyel ekşi maya üretimine yönelik kültür geliştirilmesinde de yol gösterici olmaktadır.

Starter LAB kültürü kullanılmadan geleneksel ekşi maya hamurundan elde edilen LAB'lar endüstriyel amaçlı starter ya da probiyotik kültür olarak çeşitli tahıl bazlı içeceklerin geliştirilmesinde kullanılabilir. Bu tez çalışmasının amacı, ekşi maya hamurundan izole edilen LAB'ların gluten degrade etme yeteneklerinin analiz edilmesinin yanı sıra başlıca probiyotik özelliklerinin araştırılması ile tahıl bazlı ürünlerin üretiminde kullanılabilecek adayların belirlenmesidir. Bunun yanı sıra, farklı özellikleriyle öne çıkan izolatlar gluten hassasiyeti tedavisinde probiyotik takviye üretiminde değerlendirilebilir.





2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1.Ekşi Maya Hamuru ve Mikroflorası

Yaklaşık 5000 yıllık geçmişe sahip ekşi maya hamuru kullanımı, dünya çapında yaygın olarak kabul görmekte; günümüzde ise ekşi maya, geleneksel ekmeklerden tatlı mayalı fırınlanmış ürünlere, glutensiz ürünlerden pizzalara ve Çin buharlı ekmeklerine kadar çeşitli yiyeceklerin yapımında yaygın olarak kullanılmakta ve tüketiciler tarafından ilgi görmektedir (Fekri vd., 2024; Gobbetti vd., 2016; Oshiro vd., 2021).

Ekşi maya hamuru, fermantasyondan sorumlu LAB'lar ve mayaları içermekte olan un ve su karışımıdır (Dertli vd., 2016). Olgun ekşi maya hamurunda LAB'lar 10^8 düzeyinde bulunurken maya türleri 10^6 - 10^7 kob/g düzeyinde bulunmaktadır (Lau vd., 2021).

Ekşi maya hamuru ve düz hamur arasındaki birincil farklılık, hamur aşamasında LAB'ların metabolik dönüşümlere katkısıdır (Ganzle ve Ripari, 2016). Bu metabolik faaliyetler; proteolitik aktiviteler, uçucu bileşiklerin oluşumu, antifungal ve antibakteriyel bileşiklerin oluşumudur (Dertli vd., 2016).

Ekşi maya hamurunun mikrobiyolojik özellikleri bölgesel mikrobiyal türlerden etkilendiği için bileşimi bölgelere göre farklılık göstermektedir; bu nedenle işleme yönteminin standartlaştırılması zordur (Xi vd., 2020). Bu karmaşık mikrobiyal bileşimi ve farklı fermantasyon süreçleri, onu karmaşık bir biyolojik ekosistem haline getirir (Liu vd., 2018). Ekşi maya hamurunun steril olmayan açık koşullarda “open-batch” üretilmesi farklı LAB'ların hamur ekosistemine girmesini sağlamaktadır. Ancak, doğal fermantasyon çeşitli LAB'ların öngörülemez gelişimine olanak sağladığı için LAB topluluğunu kontrol etmek güçtür (Oshiro vd., 2021).

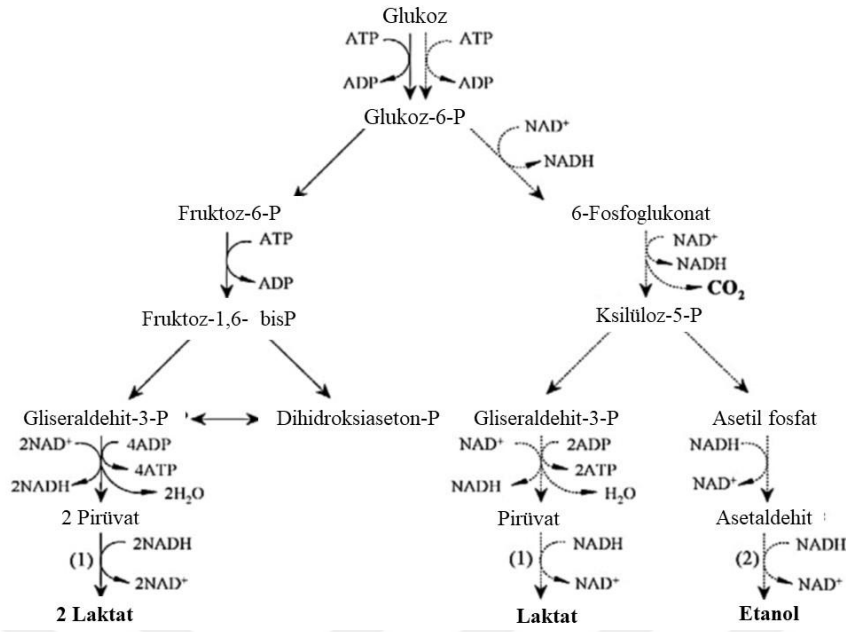
LAB'ların rol oynadığı metabolik faaliyetler sonucu gluten yapısı farklılık gösterebilmektedir. Buna örnek olarak asetik asit, gluten yapısını kısaltıp tekstürün sertleşmesine neden olurken laktik asit hamura daha elastik bir yapı kazandırmaktadır (Oshiro vd., 2021).

Ek olarak ekşi mayanın fermantasyonu sırasında mikroorganizmalar polipeptit, kısa zincirli yağ asitleri ve amino asit gibi çeşitli metabolitler üretmektedir. Maya hücreleri CO₂ üreterek hamur hacmini arttırırken, LAB organik asit ve ekzopolisakkarit (EPS) üreterek ekmeğin yapısal özelliklerini iyileştirir ve ekmeğin aromatik bileşiklerinin oluşmasına katkıda bulunur (Dan vd., 2022; Yılmaz ve Yüksel 2023). Fermantasyonun hamur yapısına sağladığı katkıların yanı sıra, nişasta sindirilebilirliğinin geciktirilmesi, gluten seviyesinin ayarlanması vitamin ve mineral biyo-erişebilirliğinin artırılması gibi faydaları da bulunmaktadır (Perez-Alvarado vd., 2022).

Tüm ekşi mayalar, hem heterofermantatif hem de homofermantatif türleri içermektedir (Çizelge 2.1). Homofermantatif LAB'lar fruktozdifosfat yolu ile heksozları laktik asite dönüştürürken, heterofermantatif LAB'lar heksozları pentoz fosfat yolu ile laktik asit, asetik asit, etanol ve CO₂'e parçalamaktadır (Kaseleth vd., 2011). LAB'lar karbonhidrat fermantasyonu sonucunda laktik asidi ana ürün olarak üretmektedir. Dallanma noktaları ve metabolik farklılıklar heksozların fermantasyonunda kullanılan yola bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Şekil 2.1). Homofermantatif LAB'lar enerji elde etmek için substrat düzeyinde fosforilasyon yoluyla heksoz fermantasyonunda homolaktik yolunu kullanırken heterofermantatif LAB'lar heterolaktik metabolik yolunu kullanmaktadırlar (Mora-Villalobos vd., 2020). Ekşi maya mikroflorasında çoğunlukla heterofermantatif LAB'lar baskındır ve maya hücreleri ile birlikte fermantasyon prosesinde birlikte görev almaktadır (Liu vd., 2018).

Homofermantatif LAB'lar, et ve süt ürünlerinde yüksek tuz konsantrasyonlu baharat fermentasyonlarında çoğunlukla tek başlarına fermantasyon mikrobiyotası olarak bulunurken, sebze ve tahıl fermentasyonlarında genellikle heterofermantatif LAB'larla birlikte görülürler (Ganzle, 2015).

Heterofermantatif LAB'lar ise, karbonhidrat metabolizması için fosfoketolaz yolunu kullanır ve çoğu glikozu tek karbon kaynağı olarak kullanmaktadır. Disakkaritlerin fosforolitik yıkımı ve asetil-fosfatı etanol yerine asetata dönüştürmek için alternatif elektron alıcılarının kullanılması bu metabolik yolun verimini artırmaktadır. Disakkarit fosforilazların varlığı sayesinde maltoz, sükroz, rafinoz ve pentozların metabolizması glikoz tarafından sınırlandırılmamaktadır (Ganzle, 2015).



Şekil 2.1. LAB'ların homofermentatif (düz çizgi) ve heterofermentatif (kesik çizgi) laktik asit bakterilerinin metabolik yolları (Mora-Villalobos vd., 2020).

Lactobacillus cinsinin çok sayıda tür içermesi, zamanla sınıflandırılıp, isimlendirilmeleri ve ayırt edilmelerini güçleştirmiştir. Yıllar içindeki gelişen moleküler biyoloji teknikler ile birlikte bu cinse ait taksonomi yeniden düzenlenmiştir. Zheng vd. (2020), yürüttüğü çalışmalarında değerlendirdikleri tüm genom dizilim parametrelerinin sonucunda *Lactobacillus* cinsinin mevcut olan *Lactobacillus delbrueckii* grubu ve *Paralactobacillus* ile 23 yeni cins olarak *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* ve *Lentilactobacillus* olarak 25 cinse yeniden sınıflandırılmasını önermişlerdir. Ek olarak, heterofermentatif laktobasillerin *Leuconostoc* ve *Weissella*'ya, *L. delbrueckii* grubundan daha yakın ilişkili olduklarını tespit etmişlerdir.

Ekşi maya hamuru mikroflorası, belirli çeşitteki LAB türleri ile mayaların simbiyozisinin bir sonucudur. Mayalar fermantasyon ana ajanıdır ve birçok stres koşuluna dayanıklı mikroorganizmalardır. Endüstriyel üretimde, zamandan tasarruf sağlayıp hızlı üretim yapılmasına olanak sağlamaktadırlar (Perez-Alvarado vd., 2022).

Kullanılan un çeşidi ve çevrenin mikrobiyotası ekşi maya hamuruna hakim olan mikroflora üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Fermentasyon sonundaki mikroflora ise; kullanılan malzeme, metabolik aktivite, sıcaklık, seçilen unun kimyasal ve enzimatik yapısı, pH, su içeriği, zaman, redoks potansiyeli gibi faktörlere bağılı olarak değişiklik göstermektedir (Perez-Alvarado vd., 2022; De Vuyst vd., 2009).

Ekşi maya hamurlarında *Lactobacillus* cinsine ait LAB'lar ve *Saccharomyces* cinsine ait mayaların mikroflorada baskın olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Akamine vd., 2023). Maya hücreleri ürettikleri organik asitler ile hamuru asitlendirir; tahıl ürünlerindeki polifenol düzeyini artırır, antioksidan aktivite gösterirler, aroma metabolitlerini üreterek tat özelliklerini geliştirir, fitaz aktivitesi ile biyoyararlanımı artırır. *S. cerevisiae* kullanımında riboflavin ve D vitamininin arttığı ek olarak *S. cerevisiae* ve *K. humilis*'in starter kültür olarak kullanımında B9 vitamininde artış gerçekleştiği çalışmalarla ortaya konmuştur (Perez-Alvarado vd., 2022).

LAB'lar proteolitik enzimlerin kaynağıdır ve mayaların gösterdiği proteolitik aktivite ile sinerjik çalışarak gluten toksisitesini azaltabilmektedirler (Perez-Alvarado vd., 2022). LAB tarafından gerçekleştirilen fermantasyon süreci sonucunda sağığa faydalı çeşitli yapılar meydana gelmektedir. Bunlar, hücre yüzeyi bileşenleri, laktik asit, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) ve biyoaktif peptitlerdir. Ürettikleri laktik asit ve asetik asit ile ekşi maya hamurunun tat özelliklerinin artmasında rol oynamaktadırlar (Perez-Alvarado vd., 2022).

Çizelge 2.1 Ekşi maya hamuru mikrobiyotasındaki bakteriler (Akamine vd., 2023; Manini vd., 2016; Perez-Alvarado vd., 2022)

Ekşi Maya Mikroflorasındaki Laktik Asit Bakterileri	
<i>Acetobacter lovaniensis</i> spp.	<i>Lactobacillus farciminis</i>
<i>Acetobacter malorum</i> ssp.	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Acetobacter pasteurianus/papaya</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>
<i>Acetobacter tropicalis</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Apilactobacillus kunkeei</i> ,	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Companilactobacillus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Companilactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus kimchii</i>
<i>Companilactobacillus crustorum</i>	<i>Lactobacillus otakiensis</i>
<i>Companilactobacillus crustorum</i>	<i>Lactobacillus parabrevis</i>
<i>Companilactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Companilactobacillus heilongjiangensis</i>	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
<i>Companilactobacillus kimchii</i>	<i>Lactobacillus plantarium</i>
<i>Companilactobacillus mindensis</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Companilactobacillus nantensis</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Companilactobacillus nodensis</i>	<i>Lactobacillus xiangfangensis</i>
<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Lapidilactobacillus dextrinicus</i>
<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Latilactobacillus sakei</i>
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i> ,
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lentilactobacillus kefirii</i> ,
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Enterococcus gilvus</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Leuconostoc gelidum</i>
<i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Fructilactobacillus lindneri</i>	<i>Levilactobacillus acidifarinae</i> ,
<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i> ,
<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>	<i>Levilactobacillus hammesii</i>
<i>Furfurilactobacillus siliginis</i>	<i>Levilactobacillus koreensis</i> ,
<i>Gluconobacter frateurii</i> spp.	<i>Levilactobacillus namurensis</i>
<i>Gluconobacter sphaericus</i> spp.	<i>Levilactobacillus zymae</i> ,
<i>Komagataeibacter cluster 4</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lacticaseibacillus casei</i> ,	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> ,
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Limosilactobacillus mucosae</i> ,
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Limosilactobacillus panis</i> ,
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	<i>Limosilactobacillus pontis</i> ,
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> ,
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Limosilactobacillus vaginalis</i> ,
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Psychrobacter</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Schleiferilactobacillus perolens</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Secundilactobacillus collinoides</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	<i>Weissella</i>

Çizelge 2.2. Ekşi maya hamuru mikrobiyotasındaki mayalar (Akamine vd., 2023; Arora vd., 2021)

Ekşi Maya Hamuru Mikroflorasındaki Mayalar	
<i>Candida glabrata</i>	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Meyerozyma carpophila</i>
<i>Cida glabrata</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<i>Cida humilis</i>	<i>Pichia fermentans</i> (synonym <i>Cida lambica</i>)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Pichia kudriazevii</i>
<i>Hyphopichia pseudoburtoni</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>Kazachstania barnetti</i>	<i>Rhodotorula nucialaginosae</i>
<i>Kazachstania bulderi</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Kazachstania humilis</i>	<i>Saccharomyces uvarum</i>
<i>Kazachstania humilis</i> (synonym <i>Cida humilis</i>)	<i>Saccharomyces sp.</i>
<i>Kazachstania servazzii</i>	<i>Torulopsis holmii</i>
<i>Kazachstania unispora</i>	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Yarrowia keelungensis</i>

2.2.Ekşi Maya Üretim Prosesi

Ekşi maya üretim işlemleri inokuluma dayalı ve proses esaslı olmak üzere başlıca 2 kategoride değerlendirilmektedir ve bu ekşi maya üretim çeşitleri Şekil 2.2 ve Şekil 2.3’de sunulmuştur (De Vuyst vd., 2021). İnokuluma dayalı ekşi maya üretimi 3 başlıkta kategorize edilmiştir (Arslan-Tontul vd., 2024; De Vuyst vd., 2021).

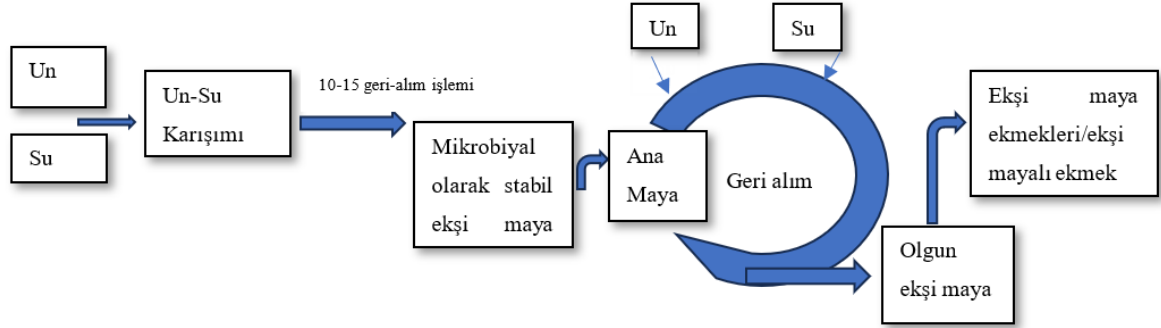
Geleneksel Tip I ekşi maya, özellikle LAB bakımından zengin mikrobiyal çeşitliliğiyle öne çıkmaktadır (Liu vd., 2018). Geleneksel ekşi maya, ya da spontan ekşi maya olarak da bilinen Tip I ekşi maya hamuru, herhangi bir starter kültür veya fırıncılık mayası kullanılmadan un ve su karışımının ortam sıcaklığında spontan olarak fermente edilmesiyle üretilmekte olan çeşididir (Arslan-Tontul vd., 2024; Fekri vd., 2024). Geleneksel Tip I ekşi maya hamuru sert bir hamurdur ve fermentasyonu için 30-37 °C sıcaklık şartının ve sürekli yeniden besleme adımlarının sağlanması gereklidir (Gobbetti vd., 2016). Tip I ekşi maya üretiminin başlatılması ve/veya çoğaltılması için, un-su karışımına kimi zaman mikroorganizmalar yönünden zengin yoğurt, süt, meyve, elma şarabı (cider), sirke, bal gibi un dışı malzeme ilavesi yapılmaktadır. Bu üretim prosesinde ekşi maya LAB’larının ve mayanın metabolik olarak aktif tutulması amacıyla günlük geri alımı ile fermentasyon edilir (De Vuyst vd., 2021; Comasio vd., 2021). Geri alma/geri alım işlemi “back-slopping”, önceki ekşi mayadan alınan bir

kısmın taze un-su karışımıyla birkaç kez yenilenmesini ifade eder. Bu işlem aynı zamanda sonraki ekmek yapımı için kalan ekşi mayanın taze karışımla yenilenmesini de kapsamaktadır. Tip I ekşi maya, uzun fermantasyon süresiyle bilinmekte ve yönetimi için günlük besleme ve deneyimli bir iş gücü gerektirmektedir (De Vuyst vd., 2021; Arslan-Tontul vd., 2024).

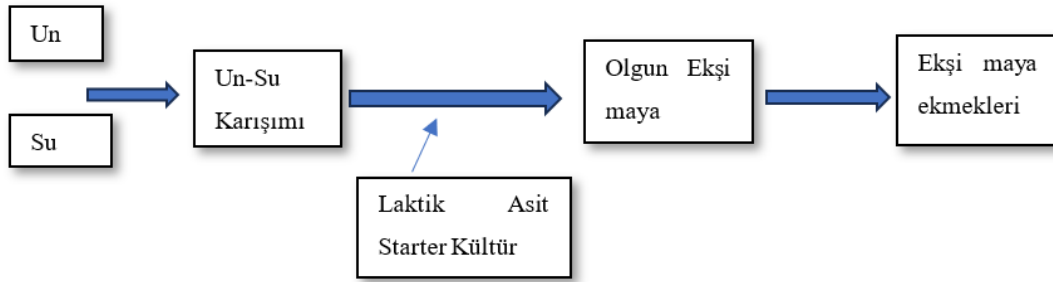
Tip II ekşi maya hamuru ise endüstriyel bir ürün olup, başlangıç/starter kültürle başlatılan bir fermantasyon sürecidir ve bunun için yalnızca LAB'lar veya LAB ve maya suşları bir arada görev alarak (100:1 oranında) un ve sudan oluşan ana karışıma eklenmektedir. Daha sıvı kıvamlıdır ve 15-24 saatlik tek adımlı bir fermantasyon kullanılarak elde edilmektedir (De Vuyst vd., 2021; Fekri vd., 2024). Bu tür fermantasyonlar, geri besleme ile olanlardan daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmekte ve genellikle bir ile üç gün arasında sürmektedir. Fermantasyonu tamamlanan ekşi mayalar, yarı sıvı, ısıyla işlem görmüş veya kurutulmuş ürünler olarak ticarileştirilmektedir (De Vuyst vd., 2014). Tip II ekşi mayanın en belirgin avantajı, güvenilir bir başlangıç kültüründen tutarlı bir nihai ürün elde edilmesidir (Fekri vd., 2024).

Son olarak Tip III ekşi maya hamurunun üretiminde starter LAB kullanılmakta ve süreç geleneksel geri alım işlemi ile devam etmektedir (De Vust vd., 2014). Bu ekşi maya hamuru Tip I ve Tip II'nin bir kombinasyonu olup; esas olarak sıcaklık kontrollü kaplamalı tanklarda hazırlanarak kurutulmuş ve stabilize edilmiş Tip II starter kullanılarak hazırlanmaktadır. Tip III'ü Tip II'den ayıran en önemli fark ekşi maya hamurunun metabolik olarak aktif olmamasıdır; Tip III ekşi maya genellikle lezzet artırıcı olarak fırıncılık endüstrisinde tercih edilmektedir. Sıcak hava kurutma, püskürtme kurutma, dondurarak kurutma ve akışkan yatak kurutma Tip III'ün üretiminde yararlanılan uygulamalardır (Calasso vd., 2021; De Vuyst vd., 2021; Fekri vd., 2024).

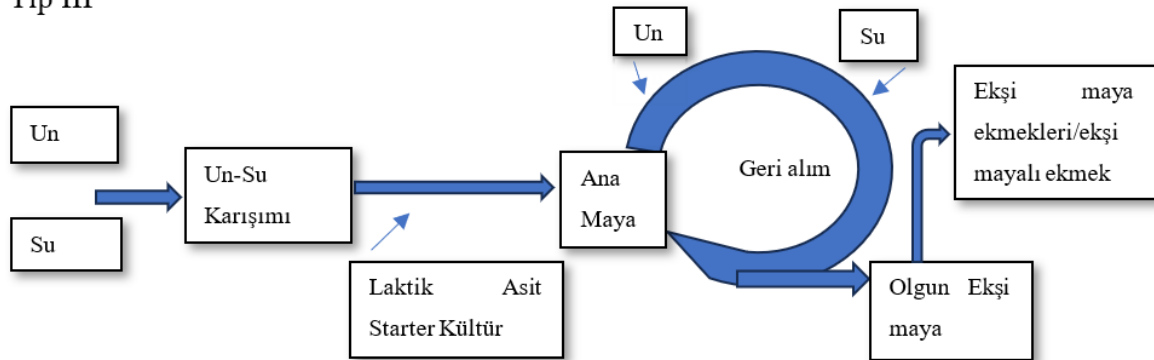
Tip I



Tip II



Tip III



Şekil 2.2. Un-su karışımının inoküle edilmesine dayalı çeşitli tipte ekşi maya üretim süreçleri (De Vuyst vd., 2021).

Proses temelli ekşi maya hamuru üretim tipleri; Tip 0, Tip I, Tip II ve Tip III olmak üzere 4'e ayrılmaktadır (Şekil 2.2). Tip 0 ekşi maya hamuru, un ve su karışımıdır fermentasyon sınırlı sürede gerçekleşmektedir ve daha çok ön hamur olarak adlandırılmaktadır. Mayalar, LAB'lardan daha hızlı gelişim göstermektedir. Ancak unun yapısında doğal olarak bulunan LAB'lar ve fırıncılıkta kullanılan mayalarda kontaminant olarak mevcut olan LAB'lar gelişme göstererek hamurda asitleşme ve tat oluşumu meydana getirmektedir. Tip 0 ekşi maya ürünlerine örnek olarak Fransız baget ekmekleri, Amerikan krakerleri ve İtalyan ciabatta ekmekleri verilebilir (De Vuyst vd., 2021).

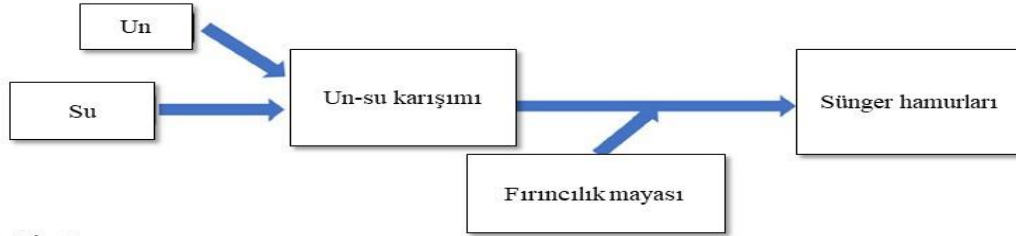
Tip I ekşi maya hamuru, üretimi için 20-30 °C sıcaklık koşulu, yaklaşık pH 4 değeri ve 6-24 saat fermentasyon süresi koşullarını gerektiren geleneksel ekşi maya hamurlarıdır. Bu hamura ait örnek olarak San Francisco ekşi mayası ve çeşitli İtalyan ekşi maya hamurları verilebilir. Bunlar menşe isim koruma belgesi PDO (protected designation of origin) ve PGI (protected geographical indication) coğrafi işaretli ürünler olarak da yasal olarak korunmaktadır. Tip I ekşi maya hamurunda *Frul. sanfranciscensis*, *Lacp. plantarum*, *Levl. brevis*, *Companilactobacillus* türleri (özellikle *Coml. crustorum*, *Coml. mindensis*, *Coml. nantensis*, ve *Coml. paralimentarius*), *Leuconostoc* ve *Weissella* cinslerine ait türler ve mikroflorada sıklıkla yer almaktadır (De Vuyst vd., 2021).

Tip II ekşi maya hamuru ise tek basamaklı bir fermentasyon prosesi olup, 30-37 °C ortam sıcaklığında, aside toleranslı starter kültür ile başlatılmakta ve bu sayede ekşi hamurda arzu edilen özellikleri ve asitlenmeyi artırarak, hızlı sonuçlanmakta olan ekşi hamur tipidir. Karıştırma ve pompalama gibi işlemlerle 1-3 gün süresince kolaylıkla işlenilmesine olanak sağlayan yüksek hamur verimine (>200) sahiptir ve işlem sonucunda genellikle pH 4'ten daha düşük değerlerle karşılaşmaktadır. Tip II ekşi maya hamuru, sıvı, macunumsu, sert ya da ufalanan formlarda olabilmektedir. Bunlara ek olarak yapısındaki mikroorganizmaların canlılığını etkilemeyecek kurutma yöntemleriyle (püskürtmeli, akışkan yataklı veya dondurarak kurutma) üretilen toz versiyonları da bulunmaktadır (De Vuyst vd., 2021; Gänzle ve Zheng, 2019).

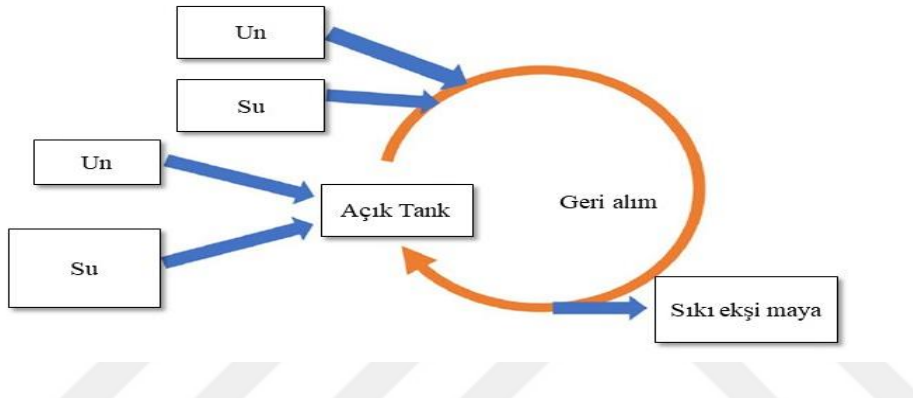
Tip III ekşi maya hamurları üretim süreci olarak tip II ile benzerlik göstermekle beraber metabolik olarak aktif olmamaları sebebiyle tip II'den ayrılmaktadır. Kullanıma hazır olup fırıncılık endüstrisinde asit ve lezzet artırıcı yönüyle tercih edilmektedir. Bu

ekşi maya hamur tipinde fermantasyonun ardından ekşi maya hamuru sprey ya da tamburlu kurutucularla kurutulmaktadır (De Vuyst vd., 2021).

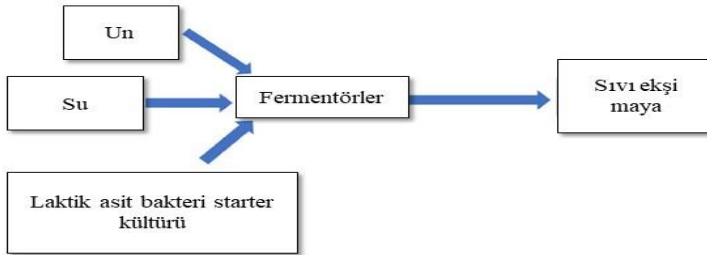
Tip 0



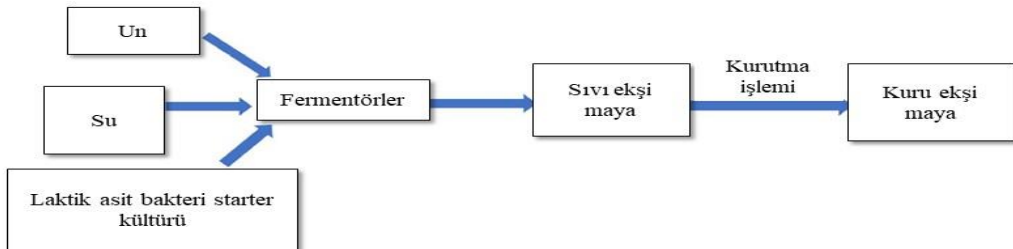
Tip I



Tip II



Tip III



Şekil 2.3. Üretim proses teknolojisine göre çeşitli ekşi maya hamurları (De Vuyst vd., 2021).

2.3. Ekşi Maya Hamurunun Sağlık Açısından Önemi

Günümüzde bilinçli tüketicilerin sayısındaki artış ve gıda üreticilerinin fonksiyonel ve besinsel özellikleri iyileştirip geliştirecek gıdalara yönelmesi sonucunda ekşi maya ile üretilen gıdalara gösterilen ilgi tekrar artmıştır (Calasso vd., 2023; Ribet vd., 2023).

Gıdaların özelliklerini geliştirmek için kullanılan doğal bir dönüşüm olan fermentasyon tekstür, lezzet, aroma gibi çeşitli unsurları geliştirmektedir (Ribet vd., 2023).

Ekşi maya fermentasyonunda LAB ve maya ortak rol oynamakta olup floradaki LAB'lar proteolitik aktivite sonucunda sindirimi daha kolay olan proteinleri ve çözünür proteinleri artırmakta ve ekşi mayanın daha fazla organik asit ürettiği sonucuna ulaşılmaktadır (Wang ve Wang, 2024). Proteolitik aktivite, LAB'ların fermentasyon esnasında yapılarında bulunan peptidaz ve proteinaz enzimleri ile tahıllarda mevcut olan proteinlerin peptit ve serbest aminoasitlere parçalanması reaksiyonudur. Protein yönünden zengin tahıl unlarının, gluten içeriğini azaltmak için LAB'ların proteoliz mekanizmasından yararlanılarak yapılan çalışmalar mevcuttur (Elvan ve Harsa, 2023). Di Cagno vd. (2005), semolina makarnası üretimi için fermentasyonu seçili LAB'lar ile gerçekleştirmiş, çalışma sonucunda duyuusal profilde herhangi farklılık gerçekleşmeden gluten içeriğinin azaldığını bulgulamıştır. Sakandar vd. (2018), Pakistan ekşi maya hamurunda gluten degrade eden bakterilerin *Wickerhamomyces anomalus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Enterococcus faecalis*, ve *Enterococcus mundtii* olduğunu saptamıştır. Özellikle *Enterococcus*'a ait türlerin yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğunu; izole edilen bakteriler arasında ise *W. anomalus* ve *E. mundtii*'nin en yüksek gluten parçalama potansiyeli gösterdiğini raporlamışlardır. Bu doğrultuda LAB'ların gluten miktarını azaltarak veya gluteni tamamen hidrolize ederek gluten hassasiyetine sahip bireylerin tüketebilmesi için glutensiz gıda üretiminde kullanılabileceği saptanmıştır (Elvan ve Harsa, 2023). Ekşi mayadaki gluten parçalanmasının, çölyak hastası bireyler için tüketimi daha uygun hale getirdiği belirtilmiştir (Wang ve Wang, 2024).

Fırıncılık ürünleri, sindirilebilir karbonhidratların kaynağı olarak bilinmekte ve genellikle yüksek glisemik indekse sahip oldukları bildirilmektedir. Sindirilebilir

karbonhidratların miktarları arttıkça glisemik indeks (kan şeker seviyeleri) hızla yükselmektedir. Tahıl ürünlerinde jelatinleşmiş nişastanın oluşumu, nişastanın sindirilebilirliğini etkilemekte ve yüksek glisemik tepkilerle karşılaşılmasına neden olmaktadır (Elvan ve Harsa, 2023). Bu bağlamda, ekşi maya hamur fermentasyonunda yer alan LAB'lar, ürettikleri organik asitler ile glisemik indeksi azaltır böylece nişasta sindirilebilirliğini geciktirerek mikrofloranın düzenlenmesine katkı sağlamaktadırlar. (Demirkese Bıçak vd., 2021; Elvan ve Harsa, 2023). Nişasta sindiriminin azaltılması ve organik asitlerin oluşumu sonucunda, laktik asit ve asetik asit oluşumuna bağlı olarak glisemik indeks düşmekte ve GI sistem üzerindeki sağlığa faydalı etkiler ortaya çıkmaktadır (Gobbetti vd., 2019; Fernandez-Pelaez vd., 2020; Wang ve Wang, 2024). Bu doğrultuda yapılan çalışmalar ekşi hamur LAB'ları ile fermente edilen buğday ve çavdar unlarının, tam buğday/arpa ekmeği ve buğday ekmeğinin glisemik indeksini azalttığı ve çavdar ekmeğinin insülin seviyesini düşürdüğü bulgulanmıştır (De Angelis vd., 2009; Lappi vd., 2010; Östman, 2003). Tüm bu mekanizmalar sonucunda, gluten duyarlılığı ve gastrointestinal sendromların oluşumu azaltılarak, tahıl bazlı ürünlerin sindirimini engelleyen patolojilere karşı önlem alınmaktadır. Bu bağlamda bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesinde ekşi mayalı ürünlerin büyük bir önemi olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmaktadır (Fernandez-Pelaez vd., 2020).

Ekşi maya hamur fermentasyonunun özellikle sindirim sağlığı için faydalarından bir diğeri, mikrofloradaki LAB'ların sindirilemeyen FODMAP (oligosakkaritlerin, fruktanların ve rafinozun) içeriğini azaltarak gastrointestinal sistem sağlığına katkıda bulunmalarıdır (Lau vd., 2021). FODMAP, ince bağırsakta tam olarak sindirilemeyen kısa zincirli karbonhidratlar (şekerler) olan fermente edilebilir oligosakkaritler, disakkaritler, monosakkaritler ve poliollerin kısaltılmış adıdır. Tüketildikten sonra bazı bireyler sindirimi konusunda problem yaşamaktadır. Fruktanın metabolik bir ürünü olan fruktoz ise FODMAP grubunun bir parçası olup özellikle çölyak olmayan gluten hassasiyetine sebep olmasıyla bilinmektedir (Elvan ve Harsa, 2023). Zhao ve Gänzle (2018), çalışmalarında *Lactobacillus* türlerinin oligosakkaritleri parçalayan enzimler salgıladıklarını bulgulanmıştır. Bir başka çalışmada karbonhidrat aktif enzimlerin fruktan, mannitol ve rafinozu parçalaması ile düşük FODMAP içeren fırıncılık ürünlerinin hazırlanılmasında yararlanılabileceği bulgulanmıştır (Loponen ve Gänzle, 2018). Fraberger vd. (2018), ekşi hamur LAB'larının birçoğunun fruktozu parçalama yeteneği gösterdiğini ve fruktan degrade eden mayalarla sinerjik çalışmalarının

sonucunda ekşi hamur fermentasyonu ile glutensiz ve hipoalerjenik gıda ürünlerinin üretilmesine olanak tanıdığı sonucuna varmıştır.

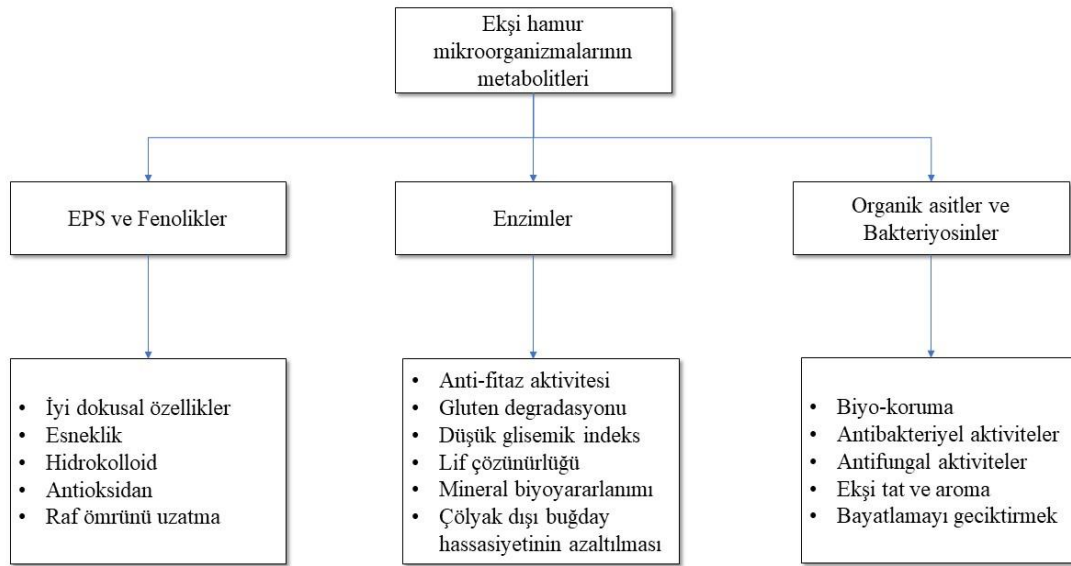
Ekşi maya hamuru kullanımının sağlık açısından bir başka faydası, bazı minerallerin biyoyararlanımını iyileştirmesidir. Tahıllarda bulunan fitat nedeniyle minerallerin bağlanması sonucunda biyoyararlanım azalmaktadır. Bu bağlamda, üründeki fitat seviyesinin azaltılması gerekmektedir. Çeşitli çalışmalar sonucunda ekşi mayanın eklenmesi ile çavdar ekmeğindeki fitatın parçalandığı sonucuna ulaşılmıştır (Nielsen vd., 2007). Buğday ve çavdar ekşi maya hamurundan izole edilen LAB'lar *L. panis*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, ve *P. pentosaceus* olup en yüksek fitat aktivitesine *L. panis* sahiptir. Yürütülen bir başka çalışmada; çavdar ekşi maya hamuru, buğday ekşi maya hamuru ve çavdar/buğday ekşi maya hamurundan *L. mesenteroides*, *L. acidophilus* ve *L. plantarum* izole edilmiş ve buğday unundaki fitatı parçalamak için kullanılmıştır (Coda vd., 2011; Nuobariene vd., 2015). Tahıl/tahıl bazlı gıdaları besinsel açıdan geliştirmek için LAB suşları fermentasyonda kullanılmakta; suşlar tanen, fitat ve enzim inhibitörlerini azaltırken EPS, yararlı enzimler, organik asit ve antimikrobiyal bileşikler gibi yararlı metabolitleri de üreterek fayda sağlamaktadırlar (Elvan ve Harsa, 2023).

Tahıllar E vitamini, tiamin, riboflavin ve folat gibi vitaminlerce zengin olmasına karşın işleme prosesleri esnasında bu bileşikler azalabilmektedir. Ekşi maya fermentasyonunun ve LAB'ların vitamin yönünden de çeşitli katkıları olabilmektedir. Örneğin, ekşi maya hamurundan izole edilen *L. plantarum*'un riboflavin sentez yeteneği ve aşırı riboflavin üretme stabilitesi olduğunu bulgulanmıştır (Carrizo vd., 2020). *L. plantarum* ilavesi yapılan kinoa unu ile üretilen ekşi maya makarnasında folat ve riboflavin miktarlarının arttığı saptanmış olup vitamin ve mineral biyoyararlanımının artırıldığı gözlenmiştir (Carrizo vd., 2020).

Ekşi maya fermentasyonun bir diğer faydası LAB'ların ürettikleri aktif metabolitlerden biri olan Gama-aminobütirik asit (GABA) ile ilişkilidir. GABA'nın sağlık üzerinde olumlu etkileri arasında anksiyete ve depresyonun azaltılması, antidiyabetik ve hipotansif etkilerin yanı sıra nörotransmisyonun düzenlenmesi bulunmaktadır. Ayrıca ekşi maya hamuru fermentasyonunda LAB'lar tuz oranını azaltmakta ve GABA kan basıncını düşürmektedir (Gobbetti vd., 2019). GABA, protein olmayan bir aminoasit olup glutamat dekarboksilaz enzimi tarafından sentezlenmekte ve fermente ürünlerde bulunmaktadır. Bu enzimi içeren LAB'lar GABA

konsantrasyonunu etkilemektedir. GAD genine sahip ekşi maya hamuru izolatlarının GABA üretim potansiyeline sahip olduğu çalışmalarla saptanmıştır (Villages vd., 2016).

Ekşi maya fermentasyonunda kompleks fenolik bileşikler hidrolize edilerek daha basit fenolik bileşiklere parçalanmakta ve ek olarak antioksidan peptitler meydana gelmektedir. Belirli LAB suşlarının antioksidan sentezleme yeteneği bulunmakta ve ekşi maya fermentasyonu sırasında anti-kanser, anti-inflamatuvar nitelik taşıyan peptitler sentezlenmektedir (Rizzello vd., 2016). Martorana vd. (2018), ekşi hamurdan ekmek üretimi için *C. milleri*, *L. citreum* ve *Frul. sanfranciscensis* izolatlarını kullanmış ve çalışma sonucunda sonucunda yüksek fenolik bileşikli ekmekler elde etmişlerdir.



Şekil 2.4. Ekşi hamur mikroorganizmaları tarafından üretilen metabolitlerin unlu mamuller/ fırıncılık ürünleri üzerindeki önemi (Elvan ve Harsa, 2023).

2.3.1. Ekşi Maya Hamurunun Probiyotik, Postbiyotik ve Prebiyotik Potansiyeli

Ekşi maya gibi tahıl bazlı fermente ürünler laktoz intoleransı ve süt alerjisi olan, düşük lipid düzeyi ile ilişkili ya da vegan diyet sürdüren bireyler tarafından ilgi görmektedir. Bu gıdalar probiyotik, prebiyotiklerin yanı sıra postbiyotik potansiyelleriyle de dikkat çekmektedir (Perez-Alvarado vd., 2022; Tsafrakidou vd., 2020). Bu doğrultuda üzerinde çalışılan yenilikçi yaklaşımlardan biri de fermente

ürünlerin fonksiyonel özelliklerinin artırılması amacıyla biyotik yapıların (postbiyotikler ve paraprobiyotiklerin) kullanımıdır (Păcularu-Burada vd., 2021).

Probiyotikler, yeterli miktarda alındığında tüketici sağlığı üzerinde faydalı etkiler gösteren canlı hücrelerdir aynı zamanda depolama sırasında meydana gelen hücre ölümlerinin sonucu olarak da canlı olmayan parabiyoitik hücreleri meydana getirmektedir (Perez-Alvarado vd. 2022; Pacularu-Burada vd., 2020). Bu hücreler pastörizasyon, fırınlama gibi ısı işlemler sırasında ve sonrasında fermente gıdalarda bulunabilmektedir (Pacularu-Burada 2021; Pacularu-Burada vd., 2020).

Fermantasyon esnasında mikrofloradaki mikroorganizmalar tarafından birçok metabolit üretilmektedir; biyotik yapıların oluşumu LAB'ların aktiviteleri ile ilişkilidir. Postbiyotikler; parabiyoitikler (hayalet/inaktif probiyotikler) ve “canlı olmayan mikrobiyal hücreler” olarak ikiye ayrılmaktadır (Cosme vd., 2022). Ekşi maya hamurundaki postbiyotik benzeri yapılar, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA), proteinler/peptidler, bakteriyosinler, biyoyüzey aktif maddeler, amino asitler, flavonoidler, EPS'ler, vitaminler ve organik asitlerdir. Mikrofloradaki LAB çeşitliliği zaman, sıcaklık, pH koşullarına bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Özellikle, pH 4'te laktik asit ve etanolün etkisiyle LAB'ların aktiviteleri artmakta dolayısıyla postbiyotik benzeri bileşiklerin üretimi de artmaktadır (Pérez-Alvarado vd., 2022).

Prebiyotikler ise karbonhidrat esaslı diyet lifleri olarak bilinmekte ve probiyotiklerin kolondaki artışında rol oynamaktadır (Pacularu-Burada 2021; Pacularu-Burada vd., 2020). Bulgulanan en önemli iki prebiyotik grubu frukto-oligosakkaritler ve galaktooligosakkaritlerdir. Bu prebiyotik yapılar bağırsaktaki faydalı mikroorganizmalar tarafından fermente edilerek, parçalanamayan kısımlarından enerji eldesi sağlanmaktadır. Ekşi maya fermantasyonu sürecinde bazı LAB'lar, glukan, fruktan ve oligosakkaritler gibi ekzopolisakkaritler (EPS) üretebilmektedir. Bu maddeler, probiyotik bakterilerin büyümesini destekleyen ve bağırsak sağlığını iyileştiren prebiyotik niteliklere sahiptir. Örneğin, *Lactobacillus sanfranciscensis*'in buğday ve çavdar ekşi maya hamurunda EPS ürettiği ve bu EPS'lerin bifidobakterilerin gelişimini teşvik edici etkisi olduğu bildirilmiştir (Poutanen vd., 2009).

2.3.2. Ekşi Maya Hamurundaki Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Potansiyeli

Probiyotik mikroorganizmalar günümüze kadar çoğunlukla bağırsak ortamı ve çeşitli fermente süt ürünlerinden elde edilmiş olup, süt ürünü olmayan bitkisel kaynaklar da yakın zamanlarda daha fazla ilgi çekmektedir. LAB'ların çoğu güvenli olarak kabul edildiği için *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Weisella* gibi cinslerden oluşan LAB'lar probiyotik potansiyelleri yönünden yıllardır araştırılmaktadır (Kaya vd., 2022; Nami vd., 2024).

- Ekşi maya hamuru un, fermentasyon prosesi, çevre faktörlerinden dolayı probiyotik suşların varlığı için olası bir kaynaktır. Mikroorganizmaların probiyotik kriteri sağlaması/karşılması için belirli niteliklere sahip olması gereklidir. Bunlardan başlıcaları aşağıdaki gibidir (Kaya vd., 2022; Nami vd., 2024);
- Gastrointestinal sistemde canlı olarak varlıklarını sürdürebilmeleri
- Antibiyotiklere duyarlılık durumu
- Bağırsak yüzeyine yapışma ve kolonizasyon yeteneği
- Patojenlerin gelişimini engellenmesi

Probiyotik mikroorganizmalar çoğunlukla *Lactobacillus* cinsine ait LAB olmasının yanı sıra farklı LAB cinsleri Bifidobakteriler *Bacillus* cinsine ait bakteriler ve maya hücrelerinden de oluşabilmektedir (Das vd., 2022). İlk yıllarda daha fazla insan kaynaklı probiyotikler geliştirilmesine karşın son zamanlarda fermente bitkisel esaslı fermente ürünler de yeni probiyotik mikroorganizmalar için iyi birer kaynak olmuştur (Bulut Albayrak ve Duran, 2022). Günümüzde probiyotik ürünlerin üretiminde kullanılan ticari tür ve suşlar sınırlı sayı ve çeşitte olup (Çizelge 2.3) yeni kaynaklardan elde edilmiş türlerin araştırılması ve ticarileştirilmesi önemli olmaktadır. Bu bağlamda, ekşi maya hamur fermentasyonu istenilen özelliklere sahip yeni probiyotik suşlar için iyi bir kaynaktır.

Çizelge 2.3. Ticari probiyotiklerde kullanılan bazı LAB türleri (Das vd., 2022).

Ticari Probiyotik Suşlar	Ülke	Sektör veya kurumun adı
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Helsinki, Finlandiya	Valio Süt Ürünleri
<i>Lactobacillus johnsonii</i> Lal	Lozan, İsviçre	Nestle
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Tokyo, Japonya	Yakult
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Madison, ABD	Rhodia
<i>Lactobacillus casei</i> CRL-43i Gilliland (LaMo)	Wisconsin, ABD	Chr. Hansens
<i>Lactobacillus reuteri</i> SD 2112	Wisconsin, ABD	BioGaia
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 271	Lund, İsveç	Probi
<i>Lactobacillus casei</i> DN01-4001 (Immunitas)	Paris, Fransa	Danone Le Plessis Robinson
<i>Streptococcus thermophiles</i> 1131, <i>Lactobacillus acidophilus</i> SBT-2062, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038	Tokyo, Japonya	Meiji Süt Ürünleri
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-1, <i>Lactobacillus paracasei</i> CRL 431,	Horsholm, Danimarka	Chr. Hansen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SBT-2062,	Tokyo, Japonya	Snow Brand Süt Ürünleri A.Ş.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> R0011, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ROO52	Montreal, Kanada	Rosell Enstitüsü
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DDS-1	Lincoln, Nebraska, ABD	Nebraska
<i>Lactobacillus fermentum</i> RC-14, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1	Londra, Ontario, Kanada	Urex Biyoteknoloji A.Ş.
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	Lozan, İsviçre	Nestle
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21, <i>Lactococcus lactis</i> L1A	Umea, İsveç	Essum A.Ş.
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	Cork, İrlanda	Cork Üniversitesi
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LB	Houdan, Fransa	Lacteol Laboratuvarı
<i>Lactobacillus paracasei</i> F19	Stockholm, İsveç	Arla Süt Ürünleri
<i>Lactobacillus crispatus</i> CTV05, <i>Lactobacillus casei</i> DN114	Seattle, ABD	Gynelogix, Boulder, Co

Ekşi maya hamurundan elde edilen LAB'ların probiyotik özellikleri üzerine son yıllarda çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Çizelge 2.4). Genel olarak LAB'ların izolasyon ve tanımlamaları yanı sıra başlıca probiyotik özellikler bu çalışmalarda araştırılmıştır. Bazılarında LAB'ların gluteni hidrolize etme özelliği de belirlenmiştir. Özellikle *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactococcus*, *Weissella* cinslere ait LAB'lar tanımlanmıştır.

Yakın zamanlarda yapılan çalışmalardan Kaya vd. (2022), ekşi mayadan *Lact. garvieae*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. graminis*, *P. Pentosaceus*; bebek dışkısından ise *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* olmak üzere dört suş izole etmiş ve izolatların probiyotik potansiyelini değerlendirmişlerdir. Bu suşların arasında sırasıyla *Lb. paracasei* F7B (%9,54), *Lc. garvieae* S3 (%7,44) ve *Lb. rhamnosus* F9A (%3,18) izolatları, HT-29 hücrelerine daha yüksek tutunma yeteneği sergilemiştir *Lb. fermentum* F-9C (%0,29) ise en düşük tutunma özelliği göstermiştir. Antibiyotik duyarlılığı 8 antibiyotiğe karşı test edilmiş, analiz sonucunda tüm suşların kanamisine direnç gösterdiği, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus rhamnosus* dışındaki izolatların ise streptomisine direnç gösterdiği bulgulanmıştır. Safra tuzu direnci için analiz konsantrasyonu %0,3 olarak belirlenmiş olup tüm suşların canlılığını koruduğu bulgulanmıştır. En yüksek canlılık oranını *Lb. fermentum* F9C (%91,5) göstermiştir. Bebek dışkısından izole edilen bakterilerin düşük asit koşullarına daha dirençli olduğu saptanmış, pH 4'te en yüksek canlılık potansiyelini ise *Lb. fermentum* F9C göstermiştir. İzolatların birbirine yakın antagonistik etki gösterdiği ancak bebek dışkısından izole edilen bakterilerin, patojenleri daha fazla inhibe ettiği bulgulanmıştır. Suşlar arasında *Lb. fermentum* F9C'nin *E. coli* ve *Y. enterocolitica*'ya karşı daha fazla inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. GABA üretimi için gerekli olan GAD geninin *Lb. paracasei* S11, *Lb. plantarum* S12 and *Lb. plantarum* F6A'da bulunduğu PCR analizi ile saptanmış olup, GABA üretim seviyelerinin 0,034–0,077 mg mL⁻¹ arasında olduğu bildirilmiştir. Tüm suşlar arasında *Lb. paracasei* F7B ve *Lc. garvieae* S3'ün probiyotik potansiyeli için umut verici adaylar olduğu bildirilmiştir.

Diğer bir çalışmada, Kahraman ve Arıcı (2020), ekşi hamur fermantasyonu ile ürettikleri farklı oranlarda (%10, %15, %20) ekşi hamur içeren 3 kek hamurundan 18 LAB izole etmiştir. Bunlardan 10 adeti *Pediococcus pentosaceus*, 5 adeti *Lactobacillus curvatus*, 3 adeti *Leuconostoc mesenteroides* 'tir. LAB'ların çoğu pH 2'de zayıf gelişme gösterirken *Pediococcus* türüne ait izolatlarından bazıları gelişme göstermemiştir. İzolatların çoğu pH 9,6'da iyi gelişme göstermiştir. LAB izolatlarının 9 mm zon çapı ile en çok antibakteriyel etkiyi *Salmonella Typhimurium*'a gösterdiği bulgulanmıştır.

Pakistan'da yöresel ekşi maya hamurundan (khamir) Sakandar vd. (2018) gluten degrade eden 19 LAB, 3 maya izolatu elde etmişlerdir. Bakteri suşları arasında *E. mundtii* QAUSD01 en yüksek gluten degradasyon potansiyeli göstermiştir. Elde edilen

izolatların probiyotik özellikleri (otoagregasyon, safra tuzu direnci ve hidrofobisite) taranmıştır. Maya suşlarının yüksek otoagregasyon yeteneği sergilemiştir. Bakteriyel suşlar arasında *E. faecalis* QAUSD06 en yüksek otoagregasyon yeteneği göstermiştir. Tüm suşların en yüksek antibiyotik direncini vankomisine karşı gösterdiği saptanmıştır. Düşük pH (2,5) değerinde en yüksek canlılık oranını sırasıyla *E. mundtii* QAUSD01, *E. faecalis* QAUSD04 *B. megaterium* QAUSD03 göstermiştir. *E. mundtii* QAUSD01 %0,4 safra tuzunda yüksek canlılık oranı gösterirken aynı konsantrasyonda *B. cereus* gelişimi saptanmamıştır. Hidrofobisitenin değerlendirilmesinde ksilen kullanılmış olup, *E. faecalis* QAUSD05'in (%55,84) en yüksek değere sahip olduğu bulgulanmıştır. Suşların değişen değerlerde patojen inhibisyonu sergilediği ve , *C. albicans* ATCC10231'e karşı *E. mundtii* QAUSD01, *E. faecalis* QAUSD06 ve *L. plantarum* ATCC 14917; *S. aureus* ATCC33862'ye karşı ise *E. faecalis* QAUSD04 antoganistik etki göstermiştir.

Çizelge 2.4. Ekşi maya hamuru LAB florası ve probiyotik potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar

Çalışmanın Amacı	Metotlar	Başlıca Bulgular	Kaynak Bilgisi
Ekşi hamurdan ve bazı geleneksel süt ürünlerinden izole edilen LAB suşlarının probiyotik aktivitesinin değerlendirilmesi	*LAB izolasyonu, farklı sıcaklık ve tuz oranında büyüme, arjinin hidrolizi, proteolitik aktivite, diasetil ve asetoin üretimi *Probiyotik karakterizasyonu (simüle mide bağırsak geçişi toleransı, adhezyon yeteneği, otoagregasyon ve koagregasyon, hidrofobisite, EPS üretimi, antimikrobiyal özellik ve antibiyotik direnç *Safra tuzuna direnç *Virulans faktörlerin varlığı *Kolestrol asimilasyonu *Biyofilm üretimi *Hemolitik aktivite	*İzole edilen 560 LAB'dan 87'si yapay gastrointestinal sıvılarda yüksek hayatta kalma oranları göstermiştir. *Değişen oranlarda otoagregasyon (%18,35- 79,42), koagregasyon (%20,16-71,26), hidrofobisite (%12,32-76,24) düzeyi tespit edilmiştir. *Tüm suşlar streptomisine hassastır. *Safra tuzuna direnç suşlar arasında değişkenlik göstermektedir. *Tüm suşlar <i>L. monocytogenes</i>'i ve <i>B. cereus</i> 'un büyümesini inhibe etmiştir. *Suşlar değişen düzeylerde antibiyotik direnci göstermiştir.	(Nami vd., 2024).

Çizelge 2.4. Ekşi maya hamuru LAB florası ve probiyotik potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar (Devamı)

Ekşi maya ve bebek dışkısından izole edilen LAB'ların bazı probiyotik özelliklerinin karşılaştırılması	*Ekşi maya ve bebek dışkısından LAB izolasyonu ve tanımlanması *EPS üretimi *GABA üretimi *Antifungal aktivite *Antibakteriyel aktivite *Antibiyotik direnci *pH ve safra tuzu direnci *HT-29 hücre hattına tutunma	*Ekşi mayadan <i>Lact. garvieae</i>, <i>Lb. paracasei</i>, <i>Lb. plantarum</i>, <i>Lb. graminis</i>, <i>P. pentosaceus</i> izole edilmiştir. *Tüm suşlar kanamisine çoğu streptomisine direnç göstermiştir. *Suşların safra tuzundaki canlılık oranı %35'den yüksek bulunmuştur. *pH 4 de çoğunlukla daha düşük canlılık oranı tespit edilmiştir. * <i>Lb. fermentum</i> F9C safra tuzu ve düşük pH'a direnç göstermiştir. *Değişen düzeylerde antifungal ve antibakteriyel etki tespit edilmiştir.	(Kaya vd., 2022).
Yunan buğdayı ekşi mayasından izole edilen LAB ve mayaların teknolojik ve güvenlik özellikleri	*LAB ve maya izolasyonu ve tanımlanması *Teknolojik Özellikler (EPS üretimi, Amilaz aktivitesi, Proteolitik aktivite, lipolitik aktivite, fitaz aktivitesi) *Biyojenik amin üretimi *Antimikrobiyal bileşenlerin üretimi	*7 LAB, 8 maya gluteni hidrolize etmiştir. *Değişen düzeyde antibakteriyel özellik tespit edilmiştir.	(Syrokou vd., 2021).

Çizelge 2.4. Ekşi maya hamuru LAB florası ve probiyotik potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar (Devamı)

Tip I ekşi hamur ile üretilmiş kek hamurundaki LAB çeşitliliğinin incelenmesi ve bazı özelliklerinin karakterizasyonu	*Ekşi hamur fermantasyonu ile kek hamuru üretimi LAB izolasyonu ve tanımlanması *Asit üretimi *Farklı pH ve tuz ortamlarında büyüme *Antibakteriyel aktivite	<i>*Leuconostoc, Pediococcus ve Lactobacillus</i> cinslerine ait türler tanımlanmıştır. *LAB izolatları en çok <i>S. typhimurium</i>'a karşı antibakteriyel etki göstermiştir (9 mm zon çapı).	(Kahraman ve Arıcı, 2020)
<i>Lactobacillus brevis</i> KT16-2'nin probiyotik potansiyeli ve gluten hidroliz aktivitesi	*Suşun genotopik tanımlanması *Gluten ve gliadin hidrolizi *SDS-PAGE * Probiyotik karakterizasyon (Farklı pH'larda canlılık, Safra tuzu toleransı, Antibiyotik duyarlılık testi, Otoagregasyon, Simüle-mide bağırsak sıvısında canlılık, *Hidrofobisite) *Antioksidan aktivite	* <i>Lb. brevis</i> KT16-2 suşu, 8 saatlik inkübasyon süresinde 28 ila 66 kDa arasında değişen peptitleri tamamen hidrolize etmiştir. *Suş sadece streptomisin, eritromisin ve nalidiksik asite direnç göstermiştir. *Farklı pH düzeylerinde canlılık tespit edilmiştir. *Simüle mide sıvısında suşun canlılığı kontrol serisi ile benzerdir. *<i>Lb. brevis</i> KT16-2, test edilen tüm safra tuzu konsantrasyonlarında kararlılığını korumaktadır. *<i>Lb. brevis</i> KT16-2'nin değişen düzeylerde otoagregasyon (%85,8-%1,71), ve yüzey hidrofobisite (%0,64-35,55) özellikleri belirlenmiştir.	(Kunduhoglu ve Hacıoğlu, 2020)

Çizelge 2.4. Ekşi maya hamuru LAB florası ve probiyotik potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar (Devamı)

*İran geleneksel ekşi maya hamurundan izole edilen fitat parçalayan, probiyotik laktik asit bakterileri ve maya suşlarının, tam buğday ekmeğinin teknolojik ve besinsel özellikleri üzerindeki işlevsel etkilerinin belirlenmesi	*Fitaz degrade eden bakteri ve maya suşlarının izolasyonu ve tanımlanması *Probiyotik karakterizasyon (Gastrik ve pankreatik sıvılara direnç, hidrofobisite, otoagregasyon, antimikrobiyel özellik, antibiyotik direnci testi) *Ekşi hamur hazırlığı ve ekmek yapımı *Hücre dışı fitaz aktivitesi *Fitik asit içeriğinin belirlenmesi	*Asit ve tuz toleransına göre 3 LAB ve 3 maya suşu seçilmiş ve moleküler tanımlanması yapılmıştır. * <i>E. faecium</i> (AR-L02) düşük pH ve safra tuzu koşulunda en yüksek canlılık oranını göstermiştir. * <i>E. faecium</i> 'un inkübasyon süresince hayatta kalma oranı düşmüş, bağırsak sıvısına karşı en yüksek direnci ise <i>L. Citreum</i> göstermiştir. *Hidrofobisite değerleri değişen aralıkta çıkmıştır. *Otoagregasyon sonuçları değişen düzeylerde çıkmıştır. *Suşlar orta ile yüksek düzeyde antimikrobiyal etki göstermişlerdir. *Tüm bakteriler trimetoprima karşı direnç göstermiştir. * En yüksek fitaz üretim kapasitesini <i>K. Marxianus</i> göstermiştir. *Ekşi hamur fermentasyonu ile üretilen ekmeğin fitat içeriğini azalttığı bulgulanmıştır. *88 LAB suşu izole edilmiş, safra tuzu tolerans yeteneğine göre 5 suş seçilmiştir.	(Fekri vd., 2020)
--	---	--	-------------------

Çizelge 2.4. Ekşi maya hamuru LAB florası ve probiyotik potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar (Devamı)

		*pH 3'te değişen oranlarda (%77-89) canlılık göstermişlerdir.	
Çin geleneksel ekşi maya hamurundan izole edilen laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin in vitro ve in vivo araştırılması	*LAB izolasyonu ve tanımlanması *Safra tuzu toleransı *Simüle edilmiş gastrointestinal sisteme direnç *Agregasyon aktivitesi *<i>In vitro</i> kolesterol giderme yeteneği	*Tüm suşlar kolesterol giderme yeteneği göstermiştir. *Agregasyon değerleri değişen oranlarda (%80-%100) tespit edilmiştir.	(Li vd., 2019)
Geleneksel ekşi mayadan (khamir) izole edilen mikrobiyatanın gluten hidrolize etme yeteneği ve probiyotik potansiyeli	*Gluten degrade eden mikrobiyata izolasyonu ve tanımlanması *Gluten bozulmasının kantitatif tahlili *Otoagregasyon *Antimikrobiyal aktivite *Probiyotik karakterizasyonu (Düşük pH toleransı, hidrofobisite, kolesterol asimilasyonu)	* <i>E. mundtii</i> QAUSD01 gluten degradasyonunda en yüksek değeri göstermiştir. * Otoagregasyon, safra tuzu direnci ve hidrofobisite sonuçları değişkenlik göstermektedir. *Antibiyotik direncinde tüm suşların en yüksek duyarlılığı vankomisine karşı gözlemlenmiştir. *Patojen inhibisyonunda değişen değerler tespit edilmiştir. *pH 2,5'da <i>E. mundtii</i> QAUSD01, tüm bakteriyel suşlar arasında önemli ölçüde daha yüksek bir hayatta kalma yeteneği göstermiştir	(Sakandar vd., 2018).

Çizelge 2.4. Ekşi maya hamuru LAB florası ve probiyotik potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar (Devamı)

Buğday kepeği ekşi mayasından izole edilen 13 LAB suşunun karakterize edilmesi	*LAB izolasyonu *Teknolojik özellikler (Karbonhidrat metabolizması ve gaz üretimi değerlendirme, fitaz aktivitesi, ksilen aktivitesi, antifungal aktivite, ekzopolisakkaritler) tespit edilmiştir. *Antibiyotik direnci *Potansiyel probiyotik özellikler (asit toleransı, safra tuzuna direnç, adhezyon, anti-listeria aktivitesi).	*Ekşi mayadan <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Leu. citreum</i> ve <i>P. pentozaseus</i> izole edilmiştir. * Suşların 7'si, düşük pH ve safra tuzunun varlığında canlılık göstermiştir. * <i>L. plantarum</i> CE42, CE60, CE84 ve <i>P. pentosaceus</i> CE65, test edilen <i>Listeria</i> türlerine (<i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. Welshimeri</i>) inhibisyon göstermiştir. * Suşların 4'ü klindamisine dirençli bulunmuştur.	(Manini vd., 2016).
--	--	--	---------------------

2.4. Gluten Proteini ve Gluten Hassasiyeti

Gluten, Latince kökenli yapıştırıcı anlamına gelen “glue” kelimesinden türemiştir. Buğday, arpa, çavdar ve yulaf gibi tahılların ana proteini olan bu yapı endospermde nişasta ile birlikte depo edilmektedir. (Arya ve Gunashree, 2021; Ramadani vd., 2020). Nişasta tanecikleri ve suda çözünür bileşenlerin uzaklaştırılmasının ardından yapıda kalan gluten, suda veya tuzlu suda çözünmeyen protein bazlı, viskoelastik, kauçuksu bir yapıya sahiptir (Arya ve Gunashree, 2021; Ramadani vd., 2020).

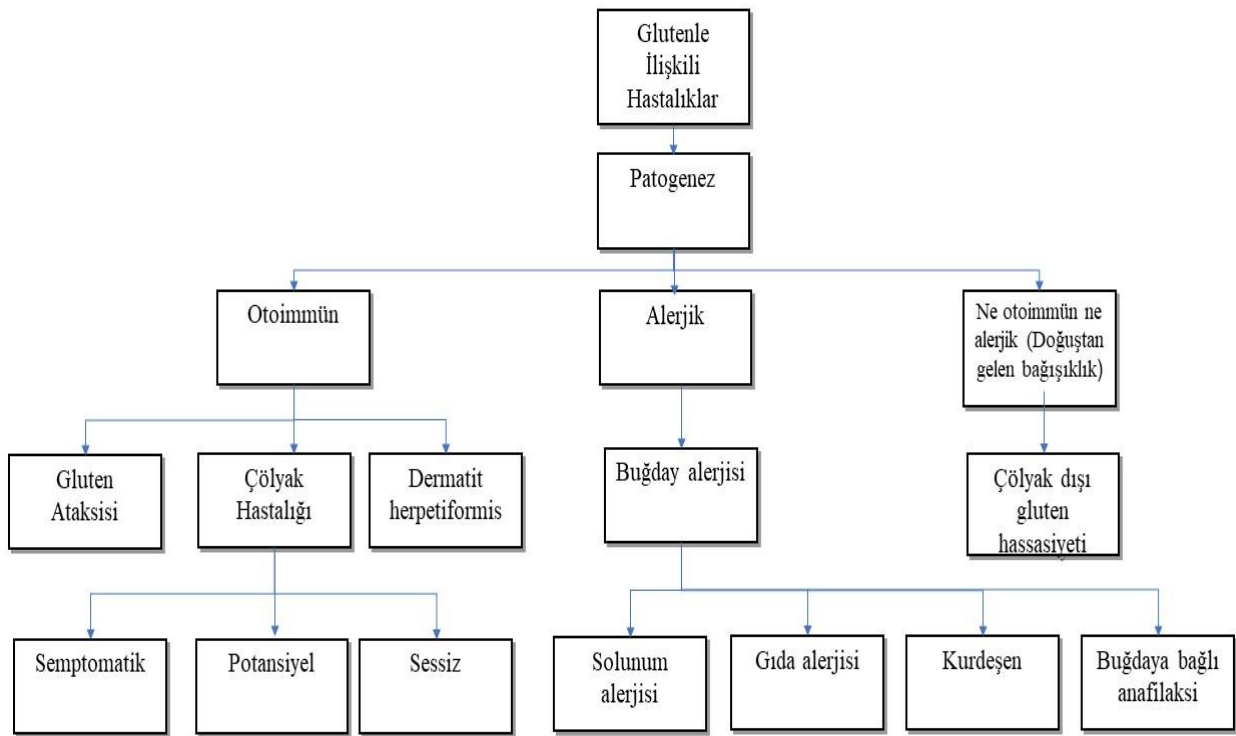
Gluten proteini, prolamin ve glutelin isimli iki proteinden meydana gelmekteyken prolamin ise prolin ve glutamin yönünden zengin aminoasitler tarafından oluşturulmaktadır. Çeşitli tahıllardaki prolaminler farklı isimlendirilse de benzer yapıya sahiptirler (Çizelge 2.5) ve bu nedenle tümü gluten olarak kabul edilmektedir (Kunduhoglu, 2020).

Çizelge 2.5. Tahıllarda bulunan prolaminler (Ramadani vd., 2020)

Tahıllar	Protein
Buğday	Gliadin
Arpa	Hordein
Çavdar	Sekalin
Yulaf	Avenin
Pirinç	Glutelin
Mısır	Zein

Buğday, arpa, yulaf ve çavdar gibi tahıllar işlendiği ürünlere sağladığı katkılar nedeniyle beslenmede büyük bir öneme sahiptir. Tüketildiğinde yüksek besin değeri sağlamaları, kolay yetiştirilebilmeleri ve lezzetli olmaları yönüyle yaygın olarak yetiştirilmektedir (Fasano vd.,2015; Arya ve Gunashree, 2021). Tahıllarda bulunan gluten, fırıncılık ürünlerine istenilen yapıyı ve tekstürü kazandırmaktadır. Bu da hamurun ekmek, makarna, kurabiye ve pizza gibi çok çeşitli gıda ürünlerine işlenmesine olanak tanımaktadır (Arya ve Gunashree, 2021). Ancak gluteni bu denli arzu edilir kılan bu özelliklerin yanı sıra gluten varlığı bazı hastalıklara da neden olmaktadır (Şekil 2.5). Buğday, arpa, çavdar ve yulafın tüketimi sonucunda yapılarında bulunan prolaminlerin sindirilmesi; bir emilim bozukluğu (malabsorbsiyon) olan çölyak, gluten duyarlılığı ve

gluten alerjisi gibi çeşitli hastalık ve rahatsızlıkları tetiklemektedir. Gastrointestinal sistemde prolaminler 13-, 19- veya 33-mer peptidlere parçalanmakta, bu yapılar bağırsak duvarından geçerek hastalıklara sebep olmaktadır. Glutensiz gıdalarda bulunan gluten miktarı için Codex standartının belirlediği 20 ppm sınırı mevcuttur. Günümüzde bu hastalıklar için uygulanan tek tedavi yöntemi ömür boyu glutensiz beslenmedir (Kunduhoglu, 2020).



Şekil 2.5. Glutenle İlişkili Rahatsızlıklar (Fasano vd.,2015)

2.5. Gıda Endüstrisinin Gluten İnflamasyonuna Sunduğu Yenilikçi Çözümler

Günümüzde gluten intoleransı olan bireylere uygulanan bir ilaç tedavisi bulunmamaktadır. Bilinen en etkili tedavi yöntemi, yaşam boyu takip edilecek glutensiz sıkı bir diyetdir ancak bu diyetin çeşitli dezavantajları mevcuttur. Bunlardan ilki, psikolojik problemlere ve glutensiz ürünlerin daha pahalı olmasından kaynaklı ekonomik sorunlara yol açarak bireylerin yaşam kalitesinin düşmesine neden olmasıdır. Glutensiz bir diyet takip eden tüketicilerin eksik gıda etiketlemesinden doğacak problemler, besin ve lezzet yönünden zayıf, düşük raf ömürlü ürünler tüketme ve çapraz bulaşı gibi tehlikelerle de karşılaşma riski mevcuttur. Bu sebeple glutenin çıkarabileceği

ya da azaltılabileceği stratejiler üzerine çalışmalar sürdürülmektedir (Caputo vd., 2010; Bradauskiene vd., 2021).

Bu hususta yapılan çalışmalardan biri glutende bulunan immünojenik bileşenleri hidrolize etme mekanizmalarına sahip probiyotiklerin kullanılmasıdır. Glutenle ilişkili patolojilerin seviyesi, bağırsaklarda bulunan mikrobiyal koloni ile bağlantılıdır. *Bifidobacteria* sayısının bağırsak mikrobiyotasındaki azalışı ile çölyak hastalığı arasında doğrudan bir ilişki olduğu bildirilmektedir (Cristofori vd., 2020; Kunduhoğlu 2020). Bu nedenle probiyotiklerin terapötik tedavi amaçlı kullanımı üzerinde araştırmalar yürütülmektedir (Cristofori vd., 2020).

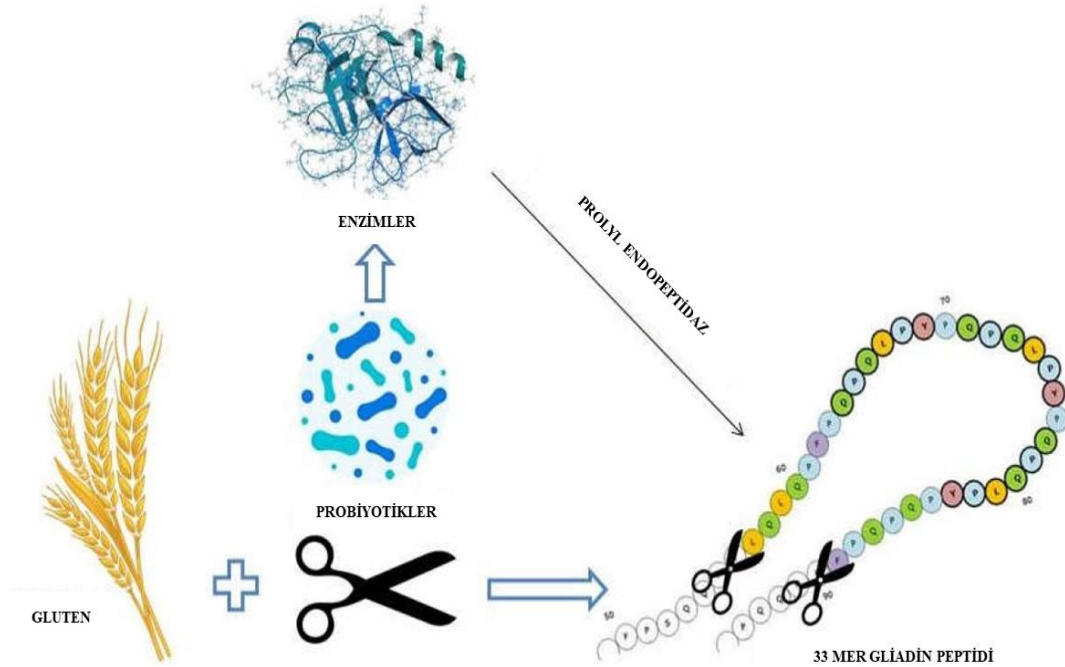
Probiyotik bakterilerin birçoğu laktik asit bakterisidir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* yararlı bağırsak bakterileri olup probiyotik ürünlerin geliştirilmesinde sıklıkla tercih edilmekte olan cinslerdir. Bu bakteriler gluteni hidroliz ederek toksisitelerini azaltmaktadır (Cristofori vd., 2020; Kunduhoğlu, 2020; Ramedani vd., 2020).

Tahılların yapılarında bulunan prolin ve glutamin peptitleri sindirim esnasında yeterli düzeyde parçalanamamaktadır; bu nedenle lenfatik dokuya ulaşp, çölyak hastalığı için özgül olan HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 antijenik hücrelerle etkileşime girerek bağırsak T hücrelerini uyarmaktadırlar (Bradauskiene vd., 2021). İnce bağırsakta gluten proteinleri degrade edilerek prolin, glutamin ve 33-mer içeren gliadin peptitlerine parçalanmaktadır. 33-mer peptiti sindirime dirençli ve glutenle ilgili hastalıklarla ilişkili bir peptittir. Probiyotikler, yapılarındaki endopeptidaz enzimi ile gliadin bağlarını hidrolize etmekte ve gluteni güvenli moleküllere ayırıp inflamasyonu azaltarak çölyak hastaları tarafından tolere edilmesini sağlamaktadırlar (Şekil 2.6). Probiyotikler aynı zamanda epitelyal iyileşmede rol oynar, bağırsak mukozasına ulaşmadan önce epitoplari yok eder ve patolojiye karşı bağışıklık reaksiyonu verirler. Yapılan çalışmalar, probiyotik suş kombinasyonunun tek bir probiyotik suştan daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır (Ramedani vd., 2020).

Laktobasil ve Bifidobakteri karışımları gluten ve peptitlerinin parçalanmasında görev alırlar bu bağlamda probiyotik takviye olarak birlikte kullanılmaktadırlar (Ramedani vd., 2020). *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *Lactobacillus sanfranciscensis* 7A ve *Lactobacillus hilgardii* 51B suşları ile oluşturulan probiyotik karışım iminopeptidaz, dipeptidil-peptidaz, prolil endopeptidaz, prolidaz, prolinaz ve aminopeptidaz P enzimatik mekanizmaları ile 33-mer peptitlerini ve A-

gliadinde bulunan 62-75 parçasını tamamen hidroliz etme potansiyeli göstermiştir. Probiyotik karışımla fermente edilmiş ekmeği tüketen çölyak hastaları gluten hassasiyeti ile ilişkili herhangi bir rahatsızlıkla karşılaşmamıştır (Cristofori vd., 2020). Fermentasyon bu bağlamda proteinlerin önceden parçalanmasını sağlayarak istenmeyen bileşikler azaltır ve gluten ile ilişkili hastalıklara sahip bireylerin tolere edebildiği ürünlerin üretimine olanak tanır (Fraberger vd.,2020).

Probiyotik (VSL#3) karışımı üzerine yapılan bir çalışmada probiyotik ve gliadinlerin yüksek oranda hidrolize olmasıyla gluten hassasiyetinin azaltıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada probiyotik karışım olarak 8 suş; *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* ve *Bifidobacterium longum* ekşi maya hamurunun fermentasyonunda kullanılmıştır (Bradauskiene vd., 2021; Ramedani vd., 2020). Aynı zamanda, probiyotik suşlardan oluşan mikroorganizmalar gıda ortamı dışında da gluten inflamasyonuna karşı tedaviye yönelik takviye olarak kullanılmaktadır (Ramedani vd., 2020). Bu amaçla kullanılan bazı probiyotik suş içeren takviyeler Çizelge 2.3’de sunulmuştur.



Şekil 2.6. Probiyotiklerin çölyak hastalığına karşı gösterdiği enzim reaksiyonu (Ramedani vd., 2020).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Ekşi Maya Hamuru Örnekleri

6 adet ekşi maya hamuru örneği Giresun ve Aydın illerinden temin edilmiştir (Çizelge 3.1.). Tüm örnekler ekşi maya starteri kullanılmadan sadece endüstriyel maya hücresi (*S. cerevisae*) ilavesinin yapıldığı ve spontan fermantasyonun gerçekleştiği üretimlere dayanmaktadır. Örnekler kapalı kavanozlarda temin edilmiştir ve buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. Ekşi maya hamur örnekleri

No	Un çeşidi	Kaynak/şehir	Örnek kodu
1	Kara Buğday	Giresun	S1
2	Buğday	Giresun	S2
3	Buğday	Giresun	S3
4	Buğday	Giresun	S4
5	Buğday	Aydın	S5
6	Buğday	Aydın	S6

3.1.2. Referans Mikroorganizmalar

Antimikrobiyal aktivite testinde mikroorganizmalar Gram negatif olarak *E. coli* ATCC 11229, Gram pozitif olarak *S. aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 19113, *Bacillus cereus* CCM 99 kullanılmıştır.

3.1.3. Besiyeri ve Kimyasallar

Ek 1’de sunulmuştur.

3.2.Yöntem

3.2.1. Ekşi Maya Hamurundan Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu

3.2.1.1. İzolasyon ve Saflaştırma

Ekşi hamur örneklerinden 10 gram alınarak %0,9'luk 90 mL izotonik su ile homojen olana dek karıştırıldı ve böylece 10^{-1} seyreltme faktörlü homojenat elde edilmiştir. Bu dilüsyondan 1 ml alınıp, 9 ml'lik izotonik tuzlu su sıvısına transfer edilerek 10^{-2} dilüsyon hazırlandı. Aynı işleme devam edilerek, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonları hazırlanmış olup dilüsyonlardan 1 mL alınarak boş steril petri kaplarına aktarılmıştır. İlk izolasyon çalışmalarında MRS agar besiyeri katı ortamı kullanılırken, sonraki çalışmalarda sikloheksimit ilave edilerek hazırlanmış MRS agar kullanımı ile mayaların inhibisyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla toz halindeki sikloheksimitten 90 mg tartılarak 90 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür 0,45 µm gözenek çaplı filtreden geçirildikten sonra 1,5 ml'lik hacimli tüplerde buzdolabında muhafaza edilmiştir. Otoklavlanmış MRS besi ortamına son konsantrasyonu 10 ppm (10 mg/L) olacak şekilde ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan besi yerleri içerisinde 1 ml dilüsyon örneği bulunduran petri kapları üzerlerine çift tabaka yöntemi tekniği kullanılarak ilave edilmiştir. Bu teknikte ilk tabaka olarak yaklaşık 15 ml'lik besiyeri petrilere dökülür ve katılaşması beklenmiştir. Ardından, yüzeyi kapatacak şekilde ikinci tabaka dökülmüştür. Hazırlanan petriler inkübatörde 37 °C'de 48 saat anaerobik koşullarda (hava almaz kapalı kaplar kullanılarak mum alevi yardımıyla) inkübe edilmiş ardından 30-300 koloni bulunduran petriler seçilerek mikrobiyal sayım yapılmıştır ve koloniler incelenmiştir. Morfolojik olarak farklı özelliklere sahip kolonilerden izolatlar seçilmiştir. MRS sıvı besiyeri ortamına aktararak 37 °C derecede 1 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı kültürlerin aktifleşmesi için 3 pasajlama yapılmıştır.

3.2.1.2.Saflaştırma

Saflaştırma işlemi için çizgi plaka yöntemi uygulanmıştır. Bu işleme petri üzerinde tek tip koloni morfolojisi elde edilene dek devam edilmiş olup; alınan tek tip koloniler 1 gece boyunca 37 °C'de büyütülmüştür. Petrilere saf izolat olarak gözlenen koloniler sıvı ortamda büyütülerek mikroskop ile incelenmiştir. Petri üzerinde çizgi

plakalardaki kolonilerde ve ışık mikroskopundaki görüntülerde tek tip morfoloji gözlemlenmesi saflaştırmanın tamamlandığını göstermiştir.

3.2.2. Hücre Morfolojisi İnceleme ve Ön Tanımlama

MRS sıvı besiyerinde gece boyunca büyütülen kültürlerden 1 mL alınarak santrifüj edilmiş üst faz atılarak 40 µL izotonik çözelti (%0,9'luk NaCl) ilave edilmiştir. Kısa bir vorteksleme (2-3 saniye) işlemi sonrasında elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µL alınarak mikroskop lamı üzerine alev yanında transfer edilmiştir. Lam üzerindeki örnek kuruduktan sonra bek alevi ile fikse edilmiştir. Ardından pastör pipeti yardımıyla üzerine metilen mavisi boyası damlatılmış ve 1 dakika boyunca bekletilmiştir. İşlem sonrasında, boyanın fazlası yıkanmış olup lamlar havlu peçete yardımıyla kurulanmış ve hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Hücre morfolojilerinin tek tip olup olmadığı çubuk, yuvarlak yönünden şekilleri büyüklükleri tespit edilmiştir.

3.2.1.3. Laktik Asit Bakterisi Ön Tanımlama

3.2.1.3.1. Katalaz Testi

LAB katalaz negatif özellikte bakterilerdir. Bu test için katalaz pozitif olarak bilinen *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Gece boyu MRS sıvı besiyerinde büyütülmüş taze bakteri kültürlerinden 20 µL lam üstüne alınarak, üzerine eş hacimde %3'lük hidrojen peroksit damlatılmıştır. Gaz çıkışı gözlenmeyen örnekler katalaz negatif (-) olarak kaydedilmiştir.

3.2.1.3.2. Gram Boyama

Gece boyu MRS sıvı besiyerinde büyütülmüş taze bakteri kültürlerinden 1 ml alınarak 4800 g 5 dakika santrifüj edilmiş ve ardından üst faz uzaklaştırılarak 40 µL izotonik çözelti (%0,9 NaCl) ilave edilmiştir. Kısa bir vorteksleme (2-3 saniye) işlemi sonrasında elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µL alınarak mikroskop lamı üzerine alev yanında transfer edilmiş ve sonrasında bek alevinde fikse edilmiştir. Gram boyama uygulamasında kullanılan solüsyonların hazırlama detayları Ek 1'de sunulmuştur. Sırasıyla, önce metilen mavisi ile boyanarak 1 dakika bekletilmiş ve ardından saf suyla fazla boya uzaklaştırılmıştır. İkinci aşamada, 40 saniye süreyle kristal viyole boyası ile

muamele edilmiş ve tekrar saf suyla yıkanıp kurulanmıştır. Daha sonra iyot damlatılarak 30 saniye boyanın kuruması beklenip %70'lik alkolle yıkanmış, son aşamada ise safranin ile 1 dakika süreyle boyanıp saf suyla yıkandıktan sonra mikroskopla incelemeleri yapılmıştır. Mavi mor renk Gram (+) özelliği gösterirken, pembe renk ise Gram (-) özelliğe sahip olanlar olarak değerlendirilmiştir. Gram pozitif (+), katalaz negatif (-) olanlara LAB şeklinde ön tanımlama yapılmıştır.

3.2.3. İzolatların Uzun Süreli Muhafazası

Gram pozitif (+), katalaz negatif (-) olduğu tespit edilen saflaştırılmış izolatların ileriki aşamalarda kullanılması için stok kültürleri hazırlanmıştır. Gece boyu MRS sıvı besiyerinde büyütülen hücre kültürlerinden 500 µl alınmış ve steril edilmiş endorf tüplere aktarılmıştır. Üzerine, %40 (H/H) gliserol bulunduran MRS sıvı besiyeri ilave edilip son gliserol konsantrasyonu %20 (H/H) olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan gliserol stoklar uzun süre kullanım için -20 °C ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Glutenli Besiyerinde LAB Suşlarının Gluten Hidroliz Etme Yetenekleri

İzolasyon sonunda elde edilen LAB'ların gluteni hidrolize etme yetenekleri Kunduhoğlu (2022) 'nın tarif ettiği yöntemler kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla Gluten Agar, Gluten Broth, Coomassie Blue boyası ve durulama çözeltisi hazırlanmıştır.

Gluten Agar içeriği; buğday gluteni (%9 a/h), glukoz %2 (a/h), KH₂PO₄ %1 (a/h), K₂HPO₄ %1 (a/h), Tween 80 %0,1 (v/v) ve agar %1,5 (w/v) kullanılarak hazırlanmış olup, pH 1 M HCl ile 6,2'ye ayarlanmıştır. Gluten Broth hazırlarken ise aynı içeriğe agar ilave edilmemiştir. Hazırlanan sıvı ve katı besiyeri karışımları ultrases cihazı kullanılarak homojenize edildikten sonra 116 °C'ta 10 dakika otoklavlanmıştır.

4 mL'lik MRS sıvı besiyerinde gece boyu 37 °C'de büyütülen izolatlardan 5 µL alınarak spot yöntemi ile Gluten Agar besiyeri üzerine aktarılmıştır. Sonrasında 37 °C'de 48 saat süre ile anaerobik koşullarda (hava almaz kapalı kaplar kullanılarak mum alevi yardımıyla) inkübe edilmiştir. Süre sonunda besiyerlerinde gelişme gözlenmiş olup, Coomassie Blue (5 g/L Coomassie Blue, 500 mL/L metanol, 92 mL/L asetik asit) ile 3 dakika muamele edilmiştir. Bu işlemden sonra fazla boya uzaklaştırılmış ve ardından (250 mL/L etanol, 50 mL/L asetik asit içeren) durulama suyu ile yıkanıp oda

sıcaklığında 1 gün bekletilmiştir. Petrilere spot uygulanan bölgelerde şeffaf görüntülerin gözlenmesi gluten hidrolizi göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Glutenli Besiyerinde LAB'ların Gelişme Yetenekleri

LAB'ların gluten içeren besi ortamlarında gelişme özellikleri Gerez vd. (2006)'e göre belirlenmiştir. Bu amaçla Gluten içeren sıvı besiyerleri hazırlanmış ve LAB bu ortama transfer edildikten 24 saat sonra sayılarını ne kadar arttırabildikleri analiz edilmiştir. Gece boyu MRS sıvı ortamında büyütülmüş izolatlardan %2 oranında alınarak Gluten sıvı besiyerine aktarılmıştır. Başlangıç (0. Saat) ve (24. Saat) analizleri için, Gluten sıvı besiyeri iyice vortekslenmiş ucu kesik pipet ucu ile pipetleme yapılarak 1 ml alınmış ve seri seyreltme işlemi ile uygun dilüsyonlardan 1 ml petrilere aktarılmıştır. MRS agar besiyeri kullanılarak dökme plaka yöntemi ile analizler gerçekleştirilmiştir. Sonrasında 37 °C'de 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve koloni sayıları tespit edilmiştir. Sonuçlar 0. Saat ve 24. Saat için kob/ml şeklinde ifade edilmiştir.

Glutenli ortamda en iyi şekilde gelişme özelliği gösteren 16 bakteri bu analizler sonucunda seçilmiştir.

3.2.6. Asit ve Safra Tuzu Toleransına Göre Ön Eleme

3.2.6.1. Aside Karşı Dayanıklılık Testi

İzolatların asit toleransı Manini vd. (2016)'ya göre küçük değişiklikler ile belirlenmiştir. Probiyotik seçiminde asit ortamını simüle eden pH'lardaki bakteri canlılığının korunması önemli kriterlerden birisidir. Bu amaçla, gluten hidrolizine göre seçilmiş izolatların pH 2,5 asit ortamında 37 °C'de 3 saat süre ile inkübe edildiğinde canlılık düzeyleri tespit edilmiştir. Gece boyu 3 mL'lik MRS sıvı besiyerinde büyütülmüş taze bakteri kültürleri santrifüj tüplerine aktarılmış ve ardından, 4800 x g koşullarında 8 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış; 7,2 pH'a ayarlanmış PBS ile 2 kez yıkama yapılmıştır. Sonrasında eşit hacimde 2 M HCl ile pH 2,5'a ayarlanmış PBS sıvısı içerisinde süspanse edilmiştir. 0. saat analizleri için 7. ve 8. dilüsyonlar seçilmiş olup, dökme plaka yöntemi ile petrilere aktarılmıştır. 3. saat sayımları için inkübatörde 3 saat 37 °C'de bekletilen süspansiyondan 6. dilüsyon

seçilmiş ve aynı işlemler uygulanmıştır. Petriler; mum alevi ile anaerobik koşula getirilen kutularda 48 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmış, süre sonunda sayımları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kob/ml olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Log Azalma} = \text{Log}(\text{kob/ml})_{t1} - \text{Log}(\text{kob/ml})_{t2} \quad (1)$$

Log (kob/ml)_{t1}: Başlangıçtaki logaritmik canlı sayısı

Log (kob/ml)_{t2}: 3 sa sonundaki logaritmik canlı sayısı

3.2.6.2. Safra Tuzuna Direnç

Safra tuzlarına karşı dirençlilik testi Vinderola ve Reinheimer (2003)’a göre tasarlanıp küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. MRS sıvı besiyerinde 2 kere pasajlanan hücrelerden 20 µL alınarak 96 kuyucuklu plakaya 2 paralelli olacak şekilde aktarılmış ve kodlamaları yapılmıştır. İki farklı kontrol deneylere dahil edilmiştir (hücre kültürü içermeyen MRS sıvı besiyeri ve hücre kültürü içeren safra tuzu bulundurmeyen MRS sıvı besiyeri). Safra tuzu konsantrasyonun izolatların gelişimine etkisini görmek için 180 µL 0,3 0,5 1 mg/mL safra tuzu içeren MRS sıvısı ilave edilmiş 4 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. 0. saat ve 4. Saatlerde 600 nm dalga boyunda optik yoğunlukları ölçülmüştür. Safra tuzu tolerans oranı Albayrak ve Duran (2021)’in çalışmalarında belirttiği şekilde hesaplanmıştır.

$$\text{Safra tuzu toleransı oranı} = (A_{\text{deneyssel}})/(A_{\text{kontrol}}) \quad (2)$$

A_{deneyssel}: Safra ilaveli MRS içerisinde 4 sa inkübe edilen izolatların 600 nm’de absorbens değeri

A_{kontrol}: Safra içermeyen MRS içerisinde 4 sa inkübe edilen izolatların 600 nm’de absorbens değeri

3.2.6.3. İzolatların Simüle Mide ve Pankreatik Sıvılarına Toleransı

İzolatların simüle mide ve pankreatik ortamına karşı toleransları Maria vd. (2019)’ya göre küçük değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Canlandırılıp 2 kez pasajlanan kültürler 10 ml MRS sıvı besiyerine %2 oranında inoküle edilerek 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İzolatlar, 4800 g’de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra

üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen pelet eşit hacimde PBS; pH 7,4 ile süspanse edilmiştir. Yıkama işlemi 2 kez tekrar edilmiştir.

Diğer taraftan, pH; 2,5'a ayarlanmış PBS ortamına pepsin enzimi (0,3 g/100 ml) ilavesi ile simüle mide ortamı hazırlanmış ve (0,22 µm gözenek çaplı) filtre yardımı ile steril edilmiştir. Bunun için önce pH 2,5'a ayarlanmış PBS otoklavlanarak steril edilmiş ardından steril pH 2,5 PBS'den bir miktar alınarak pepsin çözümü, filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Hazırlanan simüle mide ortamı 9'ar ml steril tüplere aktarılmıştır ve mide koşullarını temsil eden 37 °C'de 2,5 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 0. saat ve 2,5 saat süre sonundaki canlı bakteri sayıları tespit edilmiştir. PBS içerisinde süspanse edilmiş olan izolatlardan 1 ml alınarak 9 ml'lik simüle mide sıvısına aktarılmıştır. 0. saat sayımları için 7. ve 8. dilüsyonlar seçilmiş olup 1'er mL alınarak 1. dilüsyon hazırlanmış ardından 9,9 mL'lik tüplere 100 µL aktararak 3.,5. ve 7. seri seyreltme işlemi yapılmıştır. Petriler; mum alevi ile anaerobik koşula getirilen kutularda 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

37 °C 'de 2,5 saat boyunca inkübasyona bırakılan örneklerden 1 mL örnek alınarak 1.,3.,5. seri seyreltmeler yapılmıştır. Ekim için 5. ve 6. seyreltmeler seçilmiştir. Simüle mide ortamından geçen izolatların canlı sayımı için seri dilüsyonları petriler; mum alevi ile anaerobik koşula getirilen kutularda 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda sayımları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kob/ml olarak ifade edilmiştir.

Simüle bağırsak ortamı için, pankreatin (0,1 g/100 ml) enzimi ve safra tuzu (0,15 g/100 ml) tartılmış, üzerine otoklavda steril edilmiş 100 ml PBS (pH; 7,45)'den bir miktar eklenerek çözdürülmüş 0,45 µm gözenek çaplı filtreden geçirilerek diğer otoklav ile sterilize edilmiş PBS ile bir araya getirilmiştir. Ardından 9'ar ml steril tüplere aktarılmıştır. Mide sıvısında inkübe edilen izolatlardan 1 ml alınıp, 9 ml'lik simüle bağırsak ortamına aktararak 37 °C'de 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bağırsak ortamı geçişi sonrası canlı sayımı için 4. ve 5. dilüsyonlar seçilerek 1 mL alınıp 9 mL'lik tüpe aktarılmış ve ardından 9,9 ml'lik tüplere 100 µL aktararak seri seyreltmeler yapılmıştır. Simüle mide ve bağırsak ortamından geçen izolatların canlı sayımı için seri dilüsyonları MRS agar besiyerine ekilip (mum alevi ile anaerobik koşula getirilmiş) 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni sayımı yapılarak sonuçlar kob/ml olarak ifade edilmiştir.

3.2.7. Diğer Başlıca Probiyotik Özelliklerin Değerlendirilmesi

3.2.7.1. Otoagregasyon

İzolatların otoagregasyon yetenekleri Li vd. (2019)'nin belirttiği şekilde küçük modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Otoagregasyon deneyi için, gece boyu MRS sıvı besiyerinde büyütülmüş hücreler santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra PBS sıvısında (pH 7,4) süspanse edilmiş, süspansiyondan 3 mL alınmıştır. 37 °C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından hücre kültüründen 1 mL alınarak plastik küvetlere aktarılmış 600 nm dalga boyunda 0. ve 2. saat optik yoğunlukları ölçülmüştür. Otoagregasyon yüzdesi aşağıdaki denklem yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Otoagregasyon \%} = (1 - \frac{Abs_{t1}}{Abs_{t0}}) \times 100$$

Abs_{t0}: Hücre süspansiyonun başlangıç anındaki 600 nm'deki absorbans değeri

Abs_{t1}: Sulu fazın 1 saat inkübasyon sonrasında 600 nm'deki absorbans değeri

3.2.7.2. Koagregasyon

İzolatların koagregasyon özelliği Zuo vd. (2016)'nın tarif ettiği şekilde analiz edilmiştir. MRS sıvı besiyerinde gece boyu 37 °C'de büyütülen ve aynı koşullarda 2 kez pasajlanan hücreler 4800 g'de 7 dakika süresince santrifüjlenmiştir. Nutrient Broth sıvısında canlandırılıp pasajlanan *E. coli* ve *S. aureus* patojenleri ayrı ayrı 4800 g'de 7 dakika boyunca santrifüjlenmiş, üst fazları uzaklaştırılmıştır. Bakteri ve patojen kültürleri ayrı ayrı PBS sıvısı ile 2 kez yıkama ve santrifüjleme işlemi yapılmış, süpernatant uzaklaştırılmış ardından PBS sıvısında süspanse edilmiştir. Steril falkon tüplere 2 mL bakteri hücreleri, 2 mL patojen kültürler eklenmiş 0. saat optik yoğunluk değerleri 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. 37 °C'de 3 saat inkübasyonun ardından aynı koşullarda yoğunluk değerleri ölçülmüştür.

$$\% \text{ Koagregasyon} = \frac{(A_{\text{probiyotik}} + A_{\text{patojen}}) - 2 \times A_{\text{mix}}}{(A_{\text{probiyotik}} + A_{\text{patojen}})} \times 100$$

A_{probiyotik} = Sadece probiyotik örneğine ait 0. saat absorbans değerini,

A_{patojen} = Sadece patojen mikroorganizmalara ait 0. saat absorbans değerini,

$A_{mix}=4$ saat sonundaki probiyotik örneği ve patojen mikroorganizma karışımına ait absorbands değerini göstermektedir.

3.2.7.3. Hidrofobisite

Hidrofobisite analizi ksilen kullanılarak Sharma vd. (2018)'nın tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Stok kültürden canlandırılıp 3 kez pasajlanan izolatlar son aşamada 12 mL MRS sıvı besiyerlerinde büyütülmüştür. 4800 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş, sıvı faz uzaklaştırılmıştır. 2 kez PBS sıvısı ile yıkandıktan sonra hücreler PBS (7,2 pH) ile yeniden süspanse edilmiştir. Her izolat için deney 3 paralel ile gerçekleştirilmiş olup 3'er ml tüpler hazırlanmış ve 600 nm dalga boyunda 0. saat değerleri ölçülmüştür. Ardından tüplere 1 ml ksilen konulmuş 37 °C'de 1 saat inkübatörde bekletilmiştir. Üst fazdaki ksilen pipet ucu yardımıyla alınıp uzaklaştırıldıktan sonra 600 nm dalga boyunda optik yoğunluklar ölçülmüştür.

% Hidrofobisite değeri aşağıdaki denklemle hesaplanmıştır.

$$\% \text{Hidrofobisite} = \frac{x_0 - x_1}{x_0} * 100$$

X₀; t=0 anındaki hücre süspansiyonunun 600 nm' deki absorbands değeri

X₁; 1 saat sonundaki sulu fazdaki hücre süspansiyonunun 600 nm' deki absorbands değerini

3.2.7.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

İzolatların antimikrobiyal özellikleri kuyu difüzyon metodu kullanılarak Vinderola vd. (2008)'nın tarif ettiği şekilde belirlenmiştir. Deneyler 2 paralel olarak planlanmıştır. *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 29213, *Listeria* ATCC 19113, *Bacillus cereus* CCM 99 patojenlerine karşı izolatların antimikrobiyal yetenekleri incelenmiştir. Hazırlanan Mueller Hilton agarlara hücre yoğunluğu 10⁶ olacak şekilde ayarlanmış patojen kültürleri swaplar yardımıyla yayılmıştır. Uçları kesilmiş mavi steril pipet ucu yardımıyla 5 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. MRS sıvı besiyerinde gece boyu büyütülen izolatlardan yaklaşık 100 mikrolitre kuyulara aktarılmıştır. Her petride 3 bakteri ve paraleli olacak şekilde 6 örnekle çalışılmıştır. Ardından (mum alevi ile anaerobik koşula getirilmiş kutularda) 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon

sonunda kuyuların etrafındaki şeffaf zon varlığı incelenmiş ve antimikrobiyal aktivite göstergesi olarak zon çapları kaydedilmiştir.

3.2.7.5. Antibiyotik Direnci

İzolatların antibiyotik direnci, Sharma vd. (2018)'nın tarif ettiği şekilde agar disk difüzyon tekniği ile belirlenmiştir. Analiz için Mueller Hinton agar ve MRS agar besiyerleri hazırlanmıştır. Hücreler steril swaplar yardımıyla yüzeye yayılmış, her petriye 1 adet antibiyotik disk steril pens yardımıyla yerleştirilmiştir. LAB izolatlarının, vankomisin (30 µg / disk), gentamisin (10 µg / disk), penisilin (10 µg / disk), kloramfenikol (30 µg/disk), eritromisin (15 µg/disk), streptomisin (10 µg/disk) ve tetrasiklin (30 µg/disk) gibi antibiyotiklere karşı duyarlılıkları değerlendirilmiştir. Petriler (mum alevi ile anaerobik koşula getirilmiş) 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Oluşan şeffaf zonların çapları ölçülerek milimetre cinsinden kaydedilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1.İzolasyon ve Saflaştırma

İzole edilen 60 bakteri kültürü, petride tek tip koloni olana dek çizgi plaka yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatların, basit boyama ile hücre morfolojileri ışık mikroskopunda incelenmiş 16/60 izolat Gram (-) ve katalaz (+) olduğu için analizlere dahil edilmemiştir.

44 izolattan 16 tanesinin basil/çubuk şekline, 25 tanenin kok şekline, 3 tanesinin kokobasil şekline sahip olduğu bulgulanmıştır (Çizelge 4.1).

Resim 4.1’de MRS agar besi ortamında çizgi plaka yöntemi ile saflaştırılmış temsili koloni örneği görülmektedir.



Resim 4.1. Temsili izolatın MRS Agar besi ortamında çizgi plaka görünümü (L9).

4.2.Gram Boyama ve Katalaz Testi

6 ekşi maya örneğinden 60 bakteri kültürü izole edilip saflaştırılmıştır, içlerinden katalaz pozitif ve yeterince büyüme göstermeyenler elenmiştir. Gram boyama sonucunda 44 izolattan ışık mikroskopunda mavi-mor renkte olduğu tespit edilenler, Gram (+) olarak not edilmiş olup hücre morfolojilerinin kok çubuk ve kokobasil olduğu görülmüştür (Resim 4.2). Katalaz testinde gaz çıkışı olmayan örnekler katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin morfolojisi incelendiğinde izolatların çoğunun

(%36,36) kok olduğu bunu %34,09 oranla basil ve %6,81 oranla kokobasilin takip ettiği bulgulanmıştır.

En çok izolat elde edilen örnek (23 izolat) S2 kodlu ev yapımı geleneksel ekşi mayadır. LAB'ların %52'si S2 örneğinden; %15,9 S1 ve S3 örneklerinden, %6,81 S4 örneğinden, %4,54 S5 ve S6 ekşi maya hamur örneklerinden elde edilmiştir. İlk izolasyonlar esnasında maya inhibisyonunu engelleyen sikloheksimit kullanılmadığı için MRS besi ortamında çoğunlukla mayalar gelişmiştir. Bu nedenle, Aydın ilinden alınmış olan örneklerden az sayıda LAB izolatu elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. İzolat kaynakları ve mikroskop görüntüleri.

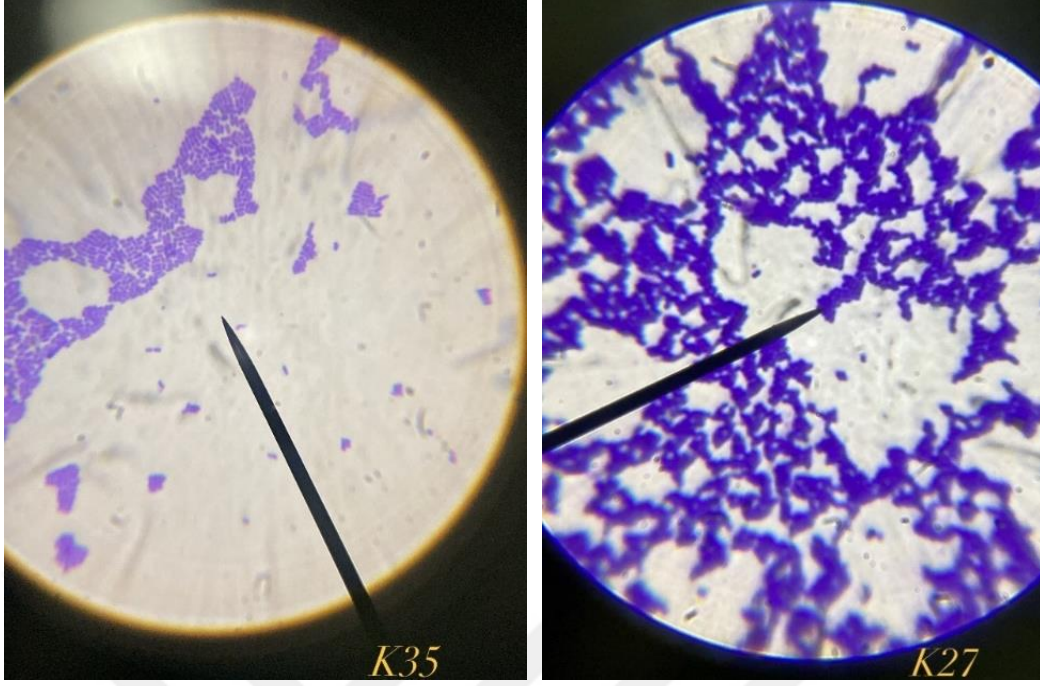
No	Kaynak	Örnek Kodu	İzolat Kodu	Mikroskop Görüntüsü
1	Giresun-Geleneksel kara buğday ekşi maya hamuru	S1	K3	Basil/Çubuk
2	Giresun-Geleneksel kara buğday ekşi maya hamuru	S1	K5	Basil/Çubuk
3	Giresun-Geleneksel kara buğday ekşi maya hamuru	S1	K15	Basil/Çubuk
4	Giresun-Geleneksel kara buğday ekşi maya hamuru	S1	K16	Basil/Çubuk
5	Giresun-Geleneksel kara buğday ekşi maya hamuru	S1	K18	Basil/Çubuk
6	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	K26	Basil/Çubuk
7	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	K27	Kok
8	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	K30	Kok
9	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	K31	Kok
10	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	K35	Kok
11	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	K37	Kok
12	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	K39	Kok

Çizelge 4.1. İzolat kaynakları ve mikroskop görüntüleri (Devamı)

No	Kaynak	Örnek Kodu	İzolat Kodu	Mikroskop Görüntüsü
13	Giresun- geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	T1	Kok (Kokobasil)
14	Giresun-geleneksel ekşi maya hamuru örneği	S3	T3	Basil/Çubuk
15	Giresun-geleneksel ekşi maya hamuru örneği	S3	T4	Basil/Çubuk
16	Giresun- geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	T7	Basil/Çubuk
17	Giresun- geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	T9	Basil/Çubuk
18	Giresun- geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	T10	Basil/Çubuk
19	Giresun-Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	T13	Basil/Çubuk
20	Giresun-Geleneksel ekşi maya hamuru	S4	T15	Kok
21	Giresun-Geleneksel ekşi maya hamuru	S4	T16	Basil/Çubuk
22	Giresun-Geleneksel ekşi maya hamuru	S4	T20	Kok
23	Giresun-Geleneksel kara buğday ekşi maya hamuru	S1	T22	Kok (Kokobasil)
24	Giresun-Geleneksel kara buğday ekşi maya hamuru	S1	T23	Kok (Kokobasil)
25	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L1	Kok
26	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L2	Kok
27	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L3	Kok
28	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L4	Kok
29	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L5	Kok
30	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L6	Kok

Çizelge 4.1. İzolat kaynakları ve mikroskop görüntüleri (Devamı)

No	Kaynak	Örnek Kodu	İzolat Kodu	Mikroskop Görüntüsü
31	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L7	Kok
32	Giresun-Geleneksel ekşi maya hamuru örneği	S3	L8	Kok
33	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L9	Kok
34	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L10	Kok
35	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L11	Kok
36	Giresun- Geleneksel ev yapımı ekşi maya hamuru	S2	L12	Kok
37	Giresun-Geleneksel ekşi maya hamuru örneği	S3	L13	Kok
38	Giresun-Geleneksel ekşi maya hamuru örneği	S3	L14	Kok
39	Giresun-Geleneksel ekşi maya hamuru örneği	S3	L15	Kok
40	Giresun-Geleneksel ekşi maya hamuru örneği	S3	L16	Kok
41	Aydın- Simit fırını ekşi maya hamuru	S5	GR 8	Kok
42	Aydın-Karadeniz fırını ekşi maya hamuru	S6	GR 11	Basil/Çubuk
43	Aydın-Simit fırını ekşi maya hamuru	S5	GR 12	Basil/Çubuk
44	Aydın-Karadeniz fırını ekşi maya hamuru	S6	GR 14	Basil/Çubuk



Resim 4.2. Gram boyama ile ışık mikroskobu görüntüsü (K27/K 35)

Lhomme vd. (2015), Fransa'nın 7 bölgesini temsil eden ve geleneksel Fransız ekmeklerinin yapımında kullanılmakta olan 16 ekşi maya hamuru örneğinden kok ve çubuk şeklinde 401 LAB izole etmişlerdir. 16S rRNA dizilimi sonucunda tüm örneklerde *L. sanfranciscensis* bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Dünya'nın değişik bölgelerindeki geleneksel ekşi maya LAB florası farklı araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Örneğin, Petkova vd. (2021), fırıncılık mayası kullanılmadan üretilmiş olan 12 geleneksel Bulgar ekşi maya hamuru örneğinden 167 LAB izole etmişlerdir. Örneklerden 11'i çeşitli bölgelerdeki fırınlardan alınmış olup 1 tanesi ev yapımı üretimidir. İzolat morfolojisi (%51,5) basil ve koklardan (%48,5) oluşmaktadır. Yine başka bir çalışmada, Pino vd. (2022), Sicilya bölgesindeki fırınlardan alınan 4 geleneksel Sicilya ekşi maya hamurundan 94 LAB izole etmişlerdir. Ülkemizde ise Sevgili vd. (2021), Gaziantep, Mardin ve Konya'dan alınan 36 ev yapımı geleneksel ekşi maya hamuru örneğinden 60 LAB izole etmişler ve bu izolatların %74,51'inin basil, geri kalanının kok şeklinde olduğunu bildirmişlerdir.

Tüm bu çalışmalar sonucunda, ekşi maya hamurunun LAB varlığı bakımından zengin bir ortam olduğu ve mikrobiyal çeşitlilikte kullanılan un çeşidi, üretim koşulları, coğrafi nedenler gibi faktörlerin etkili olabileceği anlaşılmaktadır.

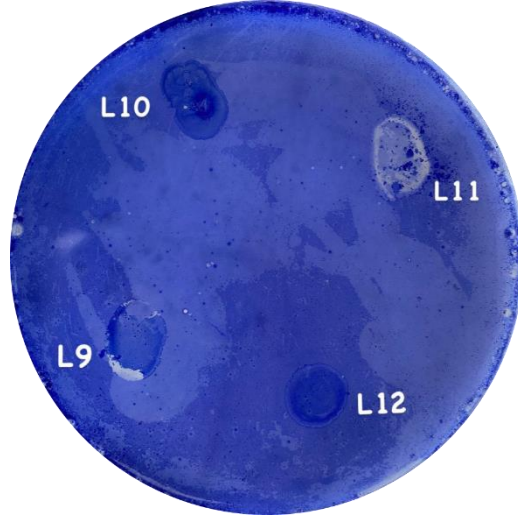
4.3. Glutenli Besiyerinde LAB Suşlarının Gluten Hidroliz Etme Yetenekleri

Ekşi maya hamurundan izole edilen 44 izolatın gluten hidroliz yeteneği hazırlanan glutenli besiyerinde gösterdikleri zonlar ile değerlendirilmiştir. LAB kolonisi etrafında gözlenen şeffaf zonlar (açık bölgeler) gluten hidrolizinin gerçekleştiğini göstermektedir. “Coomassie brilliant blue”, gluten agar plakalarındaki proteinleri boyamak için kullanılmış olup proteinlerle kimyasal tepkime göstermemektedir (Kunduhoglu ve Hacıoglu, 2021). İzole edilen 44 LAB’tan 13’ünün gluten hidroliz yeteneği sergilediği bulgulanmıştır (Çizelge 4.2). Hidroliz zonları Resim 4.3’te görülmektedir. Hidroliz zonları 1cm ve üstü olanlar “çok iyi”, 1 cm ve aşağısı olanlar ise “iyi” şeklinde sınıflandırılmıştır. Buna göre LAB’lardan 9 tanesinin çok iyi düzeyde, 4 tanesinin ise iyi düzeyde gluteni hidrolize ettiği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.2. 44 LAB suşunun glutenli besiyerinde gluten hidrolizi

No	Kod	Hidroliz	No	Kod	Hidroliz
1	K3	-	23	T22	-
2	K5	-	24	T23	-
3	K15	-	25	L1	+
4	K16	-	26	L2	++
5	K18	-	27	L3	++
6	K26	++	28	L4	++
7	K27	-	29	L5	-
8	K30	-	30	L6	-
9	K31	-	31	L7	-
10	K35	++	32	L8	-
11	K37	++	33	L9	++
12	K39	-	34	L10	-
13	T1	-	35	L11	++
14	T3	-	36	L12	-
15	T4	-	37	L13	-
16	T7	-	38	L14	-
17	T9	-	39	L15	-
18	T10	-	40	L16	-
19	T13	-	41	GR 8	+
20	T15	-	42	GR 11	+
21	T16	-	43	GR 12	+
22	T20	-	44	GR 14	++

+:İyi ++:Çok iyi -:hidroliz yok



Resim 4.3. Temsili LAB suşlarının gluten hidrolizi incelemeleri (L9/L10/L11/L12)

Kunduhoglu ve Hacıoglu (2021), kargı tulum peynirinden izole ettikleri *Lact. brevis* KT16-2 suşunun gluten hidroliz etme yeteneklerini gluten agar üzerinde uyguladıkları spot test ile coomassie blue boyası kullanarak değerlendirmişlerdir. Gluten agarda nitrojen kaynağı olarak yalnızca buğday gluteni kullanılmıştır. Gluten hidrolizinin göstergesi olarak *Lact. brevis* KT16-2-CS ve pozitif kontrol *Ps. aeruginosa* sırasıyla 15,6 mm ve 15,9 mm boyanmamış berrak zon göstermiştir.

Sharma ve Bhawanani (2018), 4 LAB'ın (*Lactobacillus paracasei* CD4, *Lactobacillus gastricus* BTM7, *Lactobacillus species* L90, LRGG- *Lactobacillus rhamnosus* GG) glutenle güçlendirilmiş MRS agar plakalarında gösterdikleri hidroliz zonu ile gluteni parçalama yeteneklerini araştırmıştır. Analiz sonucunda 4 bakterinin şeffaf zon gösterdiği tespit edilmiş olup gluten hidroliz yeteneklerinin bulunduğu bulgulanmıştır.

4.4. Glutenli Besiyerinde LAB'ların Gelişme Yetenekleri

Glutenli besiyerinde 16 izolatın gelişme yetenekleri 24 saat sonrası ve başlangıç canlı sayısı oranı (N_t/N_0) ile değerlendirilmiştir. İzolatların 24 saat sonunda canlı sayısı oranı (9,85-5700'den fazla) aralığında tespit edilmiştir. Buna göre bazı izolatların gluten varlığında daha fazla geliştiği ve sayısını arttırdığı anlaşılmaktadır.

Glutenli besiyerinde canlı sayısını en fazla artıran geleneksel yöntemlerle üretilmiş ev yapımı ekşi maya hamurundan izole edilmiş L11 kodlu izolatdır. Bu izolat,

başlangıç sayısını yaklaşık olarak 5700 katın üzerinde arttırmıştır. Ayrıca gluten hidrolizi çalışmasında da aynı izolatın öne çıkmış olduğu görülmüştür (Resim 4.3, Çizelge 4.3). L11'den sonra en fazla glutenli besiyerinde canlılığını arttıran diğer 4 izolat sırasıyla T15 (Nt/N0:159,57), L12 (Nt/N0:139,5), K16 (Nt/N0:70,59), L15 (Nt/N0:53,44) olmuştur. 24 saat inkübasyonun ardından izolatlar (0,77-3,75) log birimi artış göstermiştir. En yüksek hücre büyümesini L11 (3,75 Δ log kob/ml), en düşük hücre büyümesini L3 (0,77 Δ log kob/ml) izolatı göstermiştir.

Buna benzer ilk çalışmalardan birinde, Gerez vd. (2006) 42 LAB'tan tek azot kaynağı olarak gluten bulunduran besiyerinde 13 tanesinin iyi gelişim gösterdiğini ve 24 saatlik inkübasyon sonunda bu izolatların 3-4 log birim kadar artış gösterdiğini bulgulamışlardır. Bu çalışmalarla gluteni daha fazla kullanabilme potansiyeline sahip LAB'ların seçilmesi mümkün olmaktadır.

Çizelge 4.3. Glutenli besiyerinde en yüksek canlılık gösteren izolatlar

No	Kod	Nt/N0	Δ log kob/ml 24 h
1	L2	13,99	0,92
2	L3	9,85	0,77
3	L4	12,00	0,90
4	L5	18,68	1,04
5	L6	58,73	1,59
6	L9	23,35	1,14
7	L11	>5700 (**)	>3,75 (*)
8	L12	139,5	1,96
9	L15	53,44	1,55
10	L16	42,32	1,45
11	T15	159,57	2,02
12	K16	70,59	1,67
13	K18	16,11	1,03
14	K26	23,56	1,53
15	K27	20,36	1,13
16	K35	47,62	1,45

(**): başlangıç zamanında 5. ve 6. dilüsyonlarda koloni sayımı yapılamamıştır. Başlangıç anında 10^5 'den daha az mikroorganizma varlığı; (*): Başlangıç anında 10^5 'den daha az mikroorganizma varlığı (log $N_0 < 5$)

4.5. Asit ve Safra Tuzu Toleransına Göre Ön Eleme

4.5.1. Aside Karşı Dayanıklılık Testi

LAB'ların probiyotik kriterini sağlaması için sindirim sisteminin düşük pH ortamını tolere edebilmeleri gerekmektedir. Bu kriter yalnızca kendi büyümeleri için değil, aynı zamanda probiyotik ürünlerin fermentasyonu için de önemli bir rol

oynamaktadır (Wang vd., 2018). Bu doğrultuda, ekşi maya hamurundan izole edilen LAB izolatlarının, mide asitliğini simüle eden pH 2,5 değerindeki canlı sayısı log (kob/ml) olarak bulgulanmıştır. Tüm izolatlar probiyotiklik kriteri olan 10^6 kob/ml üzerinde canlılık göstermiştir. Asidik koşula en yüksek dayanıklılığı gösteren LAB, geleneksel ev yapımı ekşi maya hamurundan izole edilen K26 (635×10^6 kob/ml) izolatı olmuştur. Yüksek canlılık gösteren 8 izolat (L2, L4, L11, L15, K16, K26, K27, K35) ilerleyen analizlerde değerlendirilmek üzere seçilmiştir (Çizelge 4.4).

Güncel bir çalışmada, İran geleneksel ekşi mayasından izole edilmiş olan LAB'lardan 3 suş seçilerek (*Enterococcus faecium* AR-L02, *Pediococcus pentosaceus* AR-L04, *Leuconostoc citreum* AR-L04) düşük aside (pH 2) toleransları değerlendirilmiştir (Fekri vd., 2020). Suşların hepsinin düşük asit koşulunda %90'nın üzerinde yüksek canlılık gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Bir başka çalışmada ise, Bartkiene vd. (2019), çavdar ekşi maya hamurundan izole edilen 13 LAB'ın düşük asit koşulundaki (pH 2,5'da 2 saat) canlılıklarını araştırmıştır. Çalışma sonunda izolatların çoğunun (7/13), 7 log (kob/ml)'den yüksek canlılık gösterdiğini bildirmişlerdir. *L. casei* No. 210, *L. brevis* No. 173 ve *L. farraginis* No. 206 en yüksek canlılık gösteren 3 izolat olmuştur.

Çeşitli çalışmalarda düşük asit ortamına tolerans sonuçlarındaki farklılıklar inkübasyon süresi, asitlik düzeyi, izolat kaynağı ve çeşidi gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Çizelge 4.4. İzolatların mide asidine toleransı (pH 2,5).

No	Kod	t=0 sa Log canlı sayısı	t=3 sa Log canlı sayısı	Log Azalma	3 sa sonunda canlı sayısı	% canlılık oranı
1	L2	10,24	8,55	1,69	360×10^6	83,50
2	L4	10,26	**		**	**
3	L5	9,11	8	1,11	100×10^6	87,82
4	L6	9,85	7,90	1,95	81×10^6	80,20
5	L11	10,23	**	*	**	**
6	L12	10,27	7,74	2,53	55×10^6	75,37
7	L15	9,72	8,57	1,15	373×10^6	88,17
8	L16	9	8,18	1,18	154×10^6	90,89
9	K16	10,36	8,54	1,82	350×10^6	82,43
10	K18	9,43	7,04	2,39	11×10^6	74,66
11	K26	9,53	8,80	0,73	635×10^6	92,34
12	K27	10,56	8,57	1,99	374×10^6	81,16
13	K35	10,34	8,48	1,86	309×10^6	82,01
14	K37	9,38	7,20	2,18	16×10^6	76,76
15	T15	10,53	8,46	2,07	289×10^6	80,34

** : 6. dilüsyonda sayılamayacak kadar çok koloni varlığı

4.5.2. Safra Tuzuna Direnç

Probiyotik bakterilerin sindirim sisteminde canlılığını sürdürebilmesi ve etkili olabilmesi için safra tuzlarına dayanıklı olmaları gerekmektedir; bu nedenle, bu özellik probiyotiklerin etkinliği açısından önemli bir kriterdir. Literatür taramalarında insanlarda bulunan safra tuzu değerinin %0,3 ve %0,5 değerleri arasında değiştiği bildirilmiştir (Kaya vd., 2022). Bu doğrultuda safra tuzu toleransı için %0,3 %0,5 ve %1 safra tuzu oranları ile çalışılmıştır.

İzolatların tümünün, 4 saat sonunda tüm safra tuzu oranlarında büyümelerinin 0. saat değerleri ile birebir karşılaştırıldığında arttığı bulgulanmıştır (Çizelge 4.5). L11 izolatı 0,3% safra tuzu ortamında en yüksek optik yoğunluk (1,42) değerini gösterirken; 0,5% safra tuzu ortamında K35 (0,84); 1% safra tuzu ortamında ise K26 izolatının (0,78) yüksek optik yoğunluk değeri gösterdiği saptanmıştır. K27 izolatı, inkübasyon sonunda kontrol örneğinde 0,85 optik yoğunluk değerini gösterirken %0,3 safra tuzu ortamında 0,50'lik bir artış göstererek 1,35 optik yoğunluk değerine ulaşmıştır. Tüm izolatlar 4 saat inkübasyon süresi sonunda kontrolle kıyaslandığında %0,3'lük safra tuzunda optik yoğunluk değerlerini artırırken %0,5 safra tuzu oranında değerler azalmış, %1 safra tuzu ortamında ise en düşük optik yoğunluk değerlerine ulaşmıştır. Sonuç olarak, %0,3 safra tuzu oranında izolatların büyümelerinin teşvik edildiği bulgulanmıştır.

Çizelge 4.5. İzolatların safra tuzuna toleransı.

No	Kod	Kontrolün Absorbansı	0. saat			Kontrolün Absorbansı	4. saat		
			%0,3 Safra Tuzu Ortamında Absorbans Değeri	%0,5 Safra Tuzu Ortamında Absorbans Değeri	%1 Safra Tuzu Ortamında Absorbans Değeri		%0,3 Safra Tuzu Ortamında Absorbans Değeri	%0,5 Safra Tuzu Ortamında Absorbans Değeri	%1 Safra Tuzu Ortamında Absorbans Değeri
1	L2	0,68±0,06	1,16±0,01	0,67±0,06	0,58±0,01	1,03±0,07	1,36± 0,02	0,77±0,04	0,68±0,03
2	L4	0,79±0,06	1,16±0,00	0,66±0,00	0,58±0,01	0,97±0,06	1,36±0,04	0,77±0,02	0,67±0,01
3	L11	0,78±0,43	1,13±0,01	0,61±0,03	0,57±0,06	1,10±0,41	1,42±0,03	0,74±0,02	0,70±0,07
4	L15	0,66±0,05	1,13±0,00	0,58±0,00	0,53±0,05	0,94±0,01	1,39±0,03	0,71±0,03	0,68±0,07
5	K16	0,72±0,05	1,24±0,04	0,61±0,0	0,57±0,00	0,92±0,07	1,41±0,12	0,76±0,01	0,71±0,04
6	K26	0,69±0,01	1,20±0,02	0,70±0,03	0,63±0,04	1,13±0,01	1,35±0,13	0,82±0,07	0,78±0,03
7	K27	0,66±0,01	1,18±0,05	0,61±0,01	0,59±0,05	0,85±0,01	1,35±0,03	0,70±0,01	0,66±0,07
8	K35	0,67±0,02	1,18±0,04	0,63±0,07	0,59±0,02	1,14±0,01	1,40±0,01	0,84±0,07	0,76±0,06

Çizelge 4.6. İzolatların safra tuzu tolerans oranları.

No	İzolat Kodu	Kontrolün Absorbans Değeri	%0,3 Safra Tuzu Ortamında Tolerans Oranı	%0,5 Safra Tuzu Tolerans Oranı	%1 Safra Tuzuna Tolerans Oranı
1	L2	1,03±0,07	1,33±0,07	0,74±0,01	0,67±0,07
2	L4	0,97±0,06	1,39±0,04	0,79±0,07	0,68±0,03
3	L11	1,10±0,41	1,38±0,53	0,72±0,25	0,67±0,19
4	L15	0,94±0,01	1,47±0,04	0,75±0,04	0,72±0,07
5	K16	0,92±0,07	1,54±0,01	0,83±0,07	0,77±0,01
6	K26	1,13±0,01	1,19±0,10	0,73±0,05	0,69±0,03
7	K27	0,85±0,01	1,58±0,05	0,82±0,00	0,77±0,07
8	K35	1,14±0,01	1,22±0,02	0,73±0,06	0,66±0,06

İzolatların safra tuzu varlığındaki gelişimlerdeki değişimler veya safra tuzuna karşı gösterdikleri direnç safra tuzu tolerans oranı $A_{deneyisel}/A_{kontrol}$ ile ifade edilmiştir (Albayrak ve Duran 2021). Buna göre, %0,3 safra tuzu oranında izolatların büyük ölçüde yüksek oranda safra tuzu toleransına sahip olduğu ve K27 izolatının %0,3 safra tuzunda en yüksek tolerans oranı ile (1,58) dikkat çekerken, %0,5 safra tuzu oranında K16 (0,83), %1 safra tuzunda K16 ve K27 (0,77) en yüksek tolerans oranını gösterdiği anlaşılmıştır (Çizelge 4.6). Tüm izolatların artan safra tuzu oranlarında (%0,5 ve %1) safra tuzuna toleransları azalmıştır.

Çakır vd. (2020), kabuksuz arpa ekşi maya hamurundan izole ettikleri 19 LAB'ın %0,3 safra tuzu oranında %89 ile %99 arasında değişen değerlerde canlılık oranına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Suşların çoğu (9/19) %95'den yüksek canlılık göstermiş, *Lactobacillus brevis* SAB34, *Lactobacillus plantarum* SAB15 ve *Lactobacillus curvatus* SAB35'in en yüksek safra direncini gösterdiği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada Kumar ve Kumar (2015) ise, süt ürünlerinden izole ettikleri 12 *Lactobacillus* suşunun 96 kuyucuklu plaka yöntemi ile (LBS 1- LBS 12) farklı safra tuzu oranlarına (%0,15, %0,30, %0,45) toleransını incelemiş ve %0,3 safra tuzu oranında izolatların çoğunun (8/12) %50'nin üzerinde safra tuzuna tolerans gösterdiğini bildirmişlerdir. En yüksek safra tuzu toleransını, tüm artan oranlar için LBS 2 suşu (%76,88, %72,36%, % 68,62) göstermiştir.

4.6. İzolatların Simüle Mide ve Pankreatik Sıvılarına Toleransı

Probiyotiklerin faydalı etkileri, gastrointestinal sistemde hayatta kalma, geçiş yapma ve kolonize olma yetenekleriyle doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle düşük pH ve yüksek safra tuzu ve sindirim enzimleri içeren GI sisteme gösterdikleri tolerans probiyotiklerin seçiminde oldukça önemli bir kriterdir (Nami vd., 2024). İzolatların mide geçişi sonrası canlılıklarının 7,57-8,21 log (kob/ml) değerleri arasında; bağırsak geçişi sonrası canlılıklarının ise 6,77-7,84 log (kob/ml) değerleri arasında olduğu bulgulanmış olup bu doğrultuda tüm izolatların simüle mide ve bağırsak geçişine dayalı sindirim deneylerinin sonunda yüksek canlılık gösterdikleri sonucuna ulaşılmıştır (Çizelge 4.7).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, geleneksel Çin ekşi maya hamurundan izole edilen 88 LAB suşunun potansiyel probiyotik özellikleri analiz edilmiştir. Analiz için seçilen 5 suştan ikisinin pH 2 koşulunda canlılıklarını tamamen kaybettiği tespit edilmiş ancak pH 2,5 ve 3 değerlerinde suşların hayatta kalma oranları artış göstermiştir, ek olarak suşlar arasında pH 3'te hiçbir canlılık kaybı tespit edilmemiştir. İzolatların pankreatik sıvılarda canlılık oranlarının ise yüksek olduğu (%77-%89) bildirilmiştir (Li vd., 2019).

Bu doğrultuda yapılan çalışmalardan bir diğerinde (Sharma vd., 2018), geleneksel olarak fermente edilmiş buğday unu hamurundan izole edilen 8 LAB'ın simüle mide ve pankreatik sıvılara toleransı değerlendirilmiştir. İzolatların simüle mide ve pankreatin sıvılarındaki canlılığı pH 2,3,8 değerlerinde tespit edilmiştir. Seçilen izolatların tümünün 6 log kob/ml değerinden yüksek oranda sindirim sıvılarında canlılık gösterdiği bulgulanmıştır.

Çizelge 4.7. İzolatların simüle mide bağırsak ortamında canlılığı.

No	Kod	t=0 Canlılık (kob/ml)	Anında log	Mide Sonrası Canlılık log (kob/ml)	Geçiş Bağırsak Sonrası Canlılık log (kob/ml)	Geçiş
1	L2	8,50		8,21	7,84	
2	L4	8,62		8,21	7,16	
3	L11	7,90		7,91	7,27	
4	L15	8,17		8,10	6,90	
5	K16	8,38		7,57	6,77	
6	K26	8,68		7,96	7,58	
7	K27	8,55		7,71	7,00	
8	K35	8,44		7,76	7,10	

4.7. Diğer Başlıca Probiyotik Özelliklerin Değerlendirilmesi

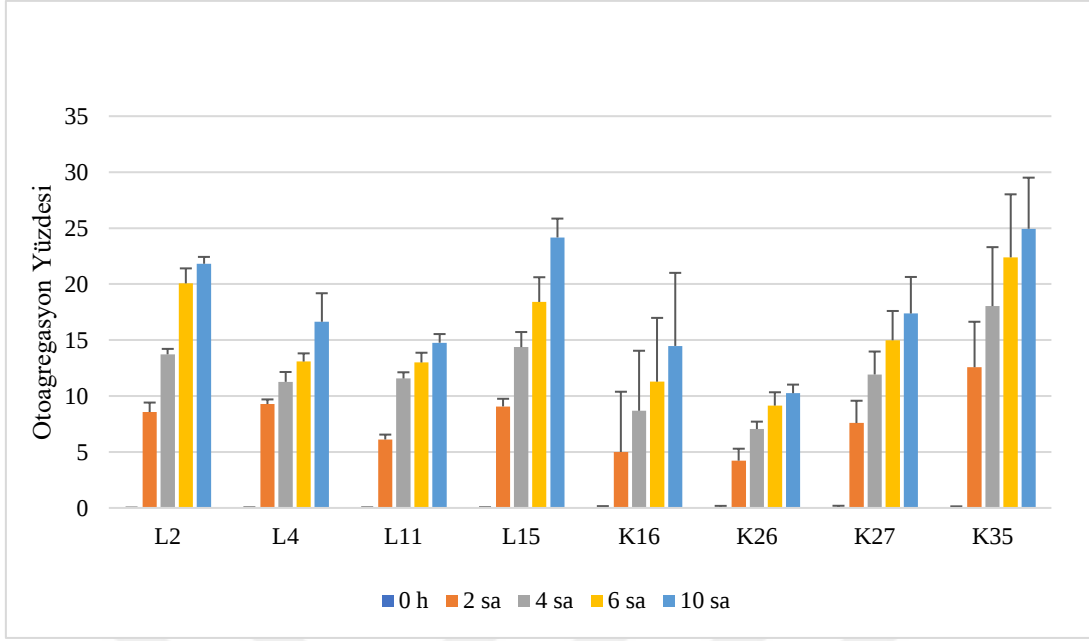
4.7.1. Otoagregasyon

İzolatların otoagregasyon değerleri, 0. Saat, 2.saat, 4.saat, 6.saat ve 10. saat sonundaki değerler esas alınarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.8). Tüm süreler karşılaştırıldığında izolatların en yüksek otoagregasyon yeteneğini 10. saatte (%10,25-%24,94) gösterdikleri tespit edilmiştir. Her saat aralığında bakterilerin otoagregasyon değerleri bir önceki zamana göre artış göstermekte olup 6. saat ve 10. saat arasında en çok artışı gösteren izolat ise L15 olmuştur. K35 bakterisi her ölçüm sonunda tüm izolatlar arasında en yüksek otoagregasyon düzeyini (%12,57, %18,03, %22,39, %24,94) göstermiştir (Şekil 4.1). Otoagregasyon, probiyotik bakterilerin epitel hücrelerine bağlanma kapasitesinde belirleyici bir analizdir. Farklı parametrelere (suş çeşidi, zaman vb.) bağlı olarak değişebilmektedir (Mohammed vd., 2024).

Li vd. (2019), Çin geleneksel ekşi mayasından 88 LAB izole etmişler ve seçtikleri 5 suşun başlıca probiyotik özelliklerini incelemişlerdir. Bu doğrultuda 5 suşun seçilen zaman aralıklarındaki (4, 8, 18, 24. saat) otoagregasyon yeteneklerini değerlendirmişlerdir. İlk ölçüm sonunda (4. Saat), suşlar arasında anlamlı bir fark mevcut değilken 18. saat sonunda 3 suş %98'in üzerinde yüksek otoagregasyon yeteneği göstermiş, 24. saatin sonunda ise tüm suşlar %80-%100 değer aralığında birbirine yakın otoagregasyon yeteneği göstermiştir. Genel olarak çalışmamızla karşılaştırıldığında daha yüksek otoagregasyon yetenekleri elde edilmiştir.

Çizelge 4.8. İzolatların 6. Saat/10.saat % otoagregasyon değerleri.

No	Kod	6. saat	10. saat
1	L2	20,06±1,34	21,81±0,61
2	L4	13,08±0,73	16,63±2,55
3	L11	13,00±0,87	14,76±0,78
4	L15	18,40±2,21	24,16±1,69
5	K16	11,28±5,70	14,48±6,53
6	K26	9,14±1,19	10,25±0,77
7	K27	14,98±2,62	17,37±3,27
8	K35	22,39±5,63	24,94±4,56



Şekil 4.1. İzolatların seçilen sürelerde gösterdikleri otoagregasyon değerleri.

4.7.2. Koagregasyon

Suışların koagregasyon yeteneği göstermesi, gastrointestinal sistemde patojen kolonizasyonuna engel olunması için önleyici bir bariyer oluşturmalarını sağlamaktadır (Vasice vd., 2020; Yücel Şengün vd., 2023). İzolatların *E. coli*'ye karşı gösterdikleri koagregasyon düzeyinin değişen düzeylerde (% 21,12- %30,26) *S. aureus*'a karşı ise %24,39-%33,04 aralığında olduğu bulgulanmıştır. *E. coli*'ye karşı en yüksek değeri K16 (%30,26) izolatı gösterirken *S. aureus*'a karşı en yüksek koagregasyon yeteneğini K27 (%33,04) sergilemiştir (Çizelge 4.9).

Bu konuda yapılmış güncel çalışmalardan birinde Manovina vd. (2022), fermente darı lapası ve jalebi hamurundan izole ettikleri LAB'ların *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı koagregasyon düzeylerini araştırmışlar, yalnızca 3 izolatın *E. coli*'ye karşı %50'nin üzerinde *S.aureus*'a karşı ise tüm izolatların %50'nin altında koagregasyon yeteneği gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bir başka çalışmada Li vd. (2019), Çin geleneksel ekşi maya hamurundan izole edip seçtikleri 5 bakteriden *L. plantarum* ZJUFT32'nin *S. aureus*'a karşı %60'ın üzerinde, *L. monocytogenes*'e karşı %40'dan daha yüksek koagregasyon gösterdiğini ek olarak aynı izolatın *Salmonella* Typhimurium'a karşı en yüksek gösteren izolat olduğunu bildirmiştir.

Çizelge 4.9 İzolatların koagregasyon değerleri.

No	Kod	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	L2	26,13	27,79
2	L4	25,43	25,78
3	L11	25,40	26,16
4	L15	24,95	28,59
5	K16	30,26	32,30
6	K26	21,12	24,39
7	K27	27,22	33,04
8	K35	27,70	32,93

4.7.3. Hidrofobisite

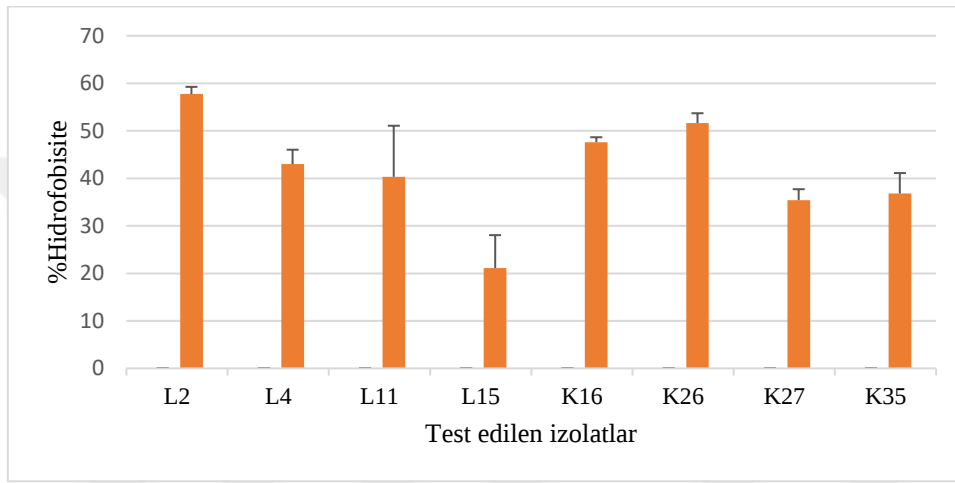
Hidrofobisite, polar olmayan yüzeylere bağlanma kapasitesi ile doğrudan ilişkilidir. Hücre yüzeyi hidrofobisitesi, hücrelerin dış zarında bulunan hidrofobik bileşenler tarafından sağlanır. Hidrofobisite, bakterilerin epitelyal hücrelere yapışmasında, otoagregasyon değerleri üzerinde etkili olan bir özelliktir. Bu değer attıkça kolonizasyon ve bağlanma kapasitesi de o kadar yüksek olur (Mohammed vd., 2024). Değerlendirme ksilene karşı yapılmış ve değişen düzeylerde (%21,11-57,73) hidrofobisite değerleri bulgulanmıştır (Çizelge 4.10). İki izolat; L2 (%57,73) ve K26 (%52,62) %50'nin üzerinde hidrofobisite değeri göstermiştir. L15, K27, K35 ise en düşük yüzde hidrofobisite değerlerine (%21,11, %35,41, %36,82) sahip izolatlardır.

Vasiee vd. (2020), İran tahıl-süt fermente ürününden izole ettikleri Pediokoklardan ksilene karşı *P. acidilactici* IAH-5 (%40,3) en yüksek hidrofobisite değerlerini gösterdiklerini bildirmiştir.

Güncel bir başka çalışmada, hücre yüzey hidrofobisitesi ksilene karşı analiz edilmiş ve LAB suşları %7-%65,1 değerleri arasında hidrofobisite göstermiştir. En yüksek değer *L. coryniformis* subsp. *torquens* S232 ardından ise *E. faecium* S017 (%58,2) olduğu bildirilmiştir (Mohammed vd., 2024).

Çizelge 4.10. Seçili izolatların Hücre yüzey hidrofobisite özellikleri.

No	Kod	Ksilene Tutunma (%)
1	L2	57,73±0,03
2	L4	42,98±0,05
3	L11	40,31±0,17
4	L15	21,11±0,09
5	K16	47,61±0,02
6	K26	51,62±0,04
7	K27	35,41±0,04
8	K35	36,82±0,07



Şekil 4.2. İzolatların ksilene karşı % hidrofobisite grafiği.

4.7.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

LAB'lar fermente gıdaların doğal biyokorunumunu sağlayan organik asitler, H₂O₂ ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal bileşikler üretebilir. Patojen bakteriler başta ishal olmak üzere çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Bağırsak florasının düzenlenmesi, gıda güvenliği ve probiyotik kriterlerin sağlanması için probiyotik LAB'ların antimikrobiyal aktivite göstermesi önem taşımaktadır (Manini vd., 2016).

İzolatlar en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *Bacillus cereus* (CCM 99) patojenine karşı göstermiştir. En yüksek inhibisyon zonunu L2 izolatı *Bacillus cereus* (CCM 99)'a karşı 14 mm zon ile göstermiştir. En düşük inhibisyon zonu ise K16 izolatı tarafından *Listeria monocytogenes* (ATCC 19113)'e karşı (11 mm) gözlenmiştir. Patojenlere karşı en yüksek inhibisyon zonları L2 (ortalama 12,62 mm) ve K35 (ortalama 12,62 mm) izolatları göstermiştir (Çizelge 4.11).

Çeşitli kaynaklardan izole edilen LAB'ların patojenlere karşı antimikrobiyal etkileri olduğuna dair birçok çalışma bulunmaktadır. Fekri vd., 2020, İran geleneksel ekşi maya hamurundan izole ettikleri 3 LAB'ın, *E. faecalis*, *K. pneumonia* ve *Sh. dysenteriae* üzerinde önemli düzeylerde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

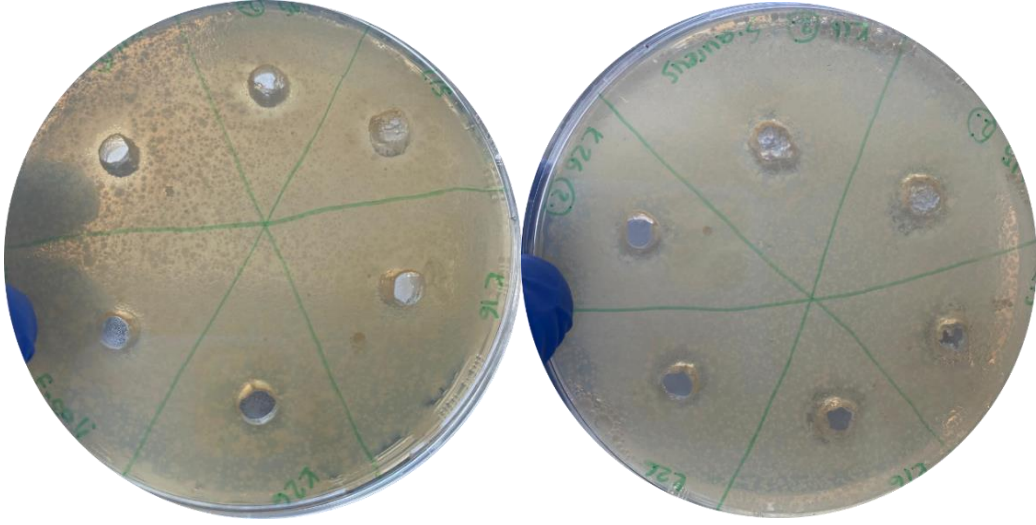
Bir başka çalışmada ise, Ayala vd. (2019), sığır dışkısı ve çeşitli gıdalardan izole ettikleri 37 LAB suşunun *L. monocytogenes*'e karşı değişen aralıkta (8.5-24 mm) şeffaf/berrak zon oluşturduğunu, 20 suşun *E. coli* O157:H7'ye (maksimum 12 mm) ve 15 suşun ise *Salmonella*'ya karşı (maksimum 11,5 mm) berrak zon oluşturarak antagonistik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Manini vd. (2016) ise, buğday kepeği ekşi mayasından izole ettikleri 13 LAB'ın *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *L. welshimeri*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmiştir. İzolatlar arasından *L. plantarum* CE42, CE60, CE84 ve *P. pentosaceus* CE65 3 patojene de karşı yüksek inhibisyon göstermiştir.

İzolatların antimikrobiyal aktivite göstermeleri sadece probiyotik olarak vücutta patojen bakterilerin gelişmesini engellemesi dışında gıda ortamında starter kültür olarak da kullanımlarıyla gıda güvenliğine katkı sağlar. Bu nedenle, kontamine sebepli bozulmayı önleyen veya patojenik bakterileri engelleyebilen ekşi maya starter kültürlerinin kullanımı, ekşi maya ürünlerinin kalitesini ve güvenliğini sağlamak için kritik bir stratejidir (Petkova vd., 2021).

Çizelge 4.11. Seçili izolatların antimikrobiyal özellikleri (mm).

No	Kod	<i>E. coli</i> (ATCC 11229)	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> (CCM 99)	<i>S.aureus</i> (ATCC 29213)	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> (ATCC 19113)
1	L2	12	14	12,5	12
2	L4	12,5	13	12,5	12
3	L11	12,5	12,5	13	11,5
4	L15	12,5	14,5	12,5	12,5
5	K16	13	13	12	11
6	K26	12,5	12,5	12	13
7	K27	12,5	15	11,5	13
8	K35	13,5	13	12	12



Resim 4.4. Temsili izolatların *E. coli* (ATCC 11229) ve *S. aureus* (ATCC 29213) patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi (L 15, K 16, K 26).

4.7.5. Antibiyotik Direnci

Antibiyotiklerin yol açtığı disbiyozu düzeltebilen probiyotikler, biyolojik tedavi amacıyla kullanılabilir. Bununla birlikte, direnç genlerine sahip probiyotik bakteriler, bu genleri hem patojenlere hem de kommensal bakterilere aktarabilmektedir. Probiyotik bakterilerin antibiyotik direnç mekanizmaları, vücut içinde hayatta kalmalarını sağlar. Bu özellik, probiyotiklerin antibiyotik tedavisi sırasında veya sonrasında konak gastrointestinal sistemine yeniden yerleşmesini kolaylaştıran bir özellik olup probiyotik bakterilerde istenilen kriterlerden biridir (Kefyalew vd., 2021).

Antibiyotik direnç testi tetrasiklin, vankomisin, gentamisin, streptomisin, eritromisin, kloramfenikol, penisilin antibiyotiklerine karşı değerlendirilmiştir (Çizelge 4.12, Resim 4.5). Tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, penisilin antibiyotiklerine karşı tüm LAB'lar duyarlılık (S) göstermiştir. Eritromisine en fazla duyarlı bulunan bakteri L15 ve K35; tetrasikline L11 ve K26; kloramfenikole K16; penisiline ise K26 ve K35 olmuştur. Az sayıda izolat (3/8) streptomisine duyarlı iken; çok sayıda izolatın gentomisine (6/8) duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İzolatların tamamına yakınının (7/8) vankomisine dirençli olduğu bulgulanmıştır. Antibiyotiklere karşı en hassas izolatlar sırasıyla K26 ve L11 olmuştur. En dirençli izolat ise L2'dir. Tüm izolatlar en fazla eritromisin ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı duyarlı bulunmuştur.

Farklı fermente gıdalardan izole edilmiş bakterilerin antibiyotik direnci bilimsel çalışmalarla bulgulanmıştır. Örneğin Ayala vd. (2019), çalışmalarında sığır dışkısı ve çeşitli gıdalardan (et, meyve, sebze) izole edilmiş 44 LAB'ın antibiyotik direncini araştırmıştır. Tüm suşların ampisilin, penisilin, linezolid karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, geleneksel fermente ekşi mayadan izole edilmiş 5 LAB'ın antibiyotik dirençleri araştırılmıştır. Tüm izolatların vankomisine duyarlı olduğu, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 suşunun özellikle siprofloksasine olmak üzere (45 mm inhibisyon zonu) tüm diğer antibiyotiklere yüksek duyarlı olduğu bildirilmiştir (Sakandar vd., 2018).

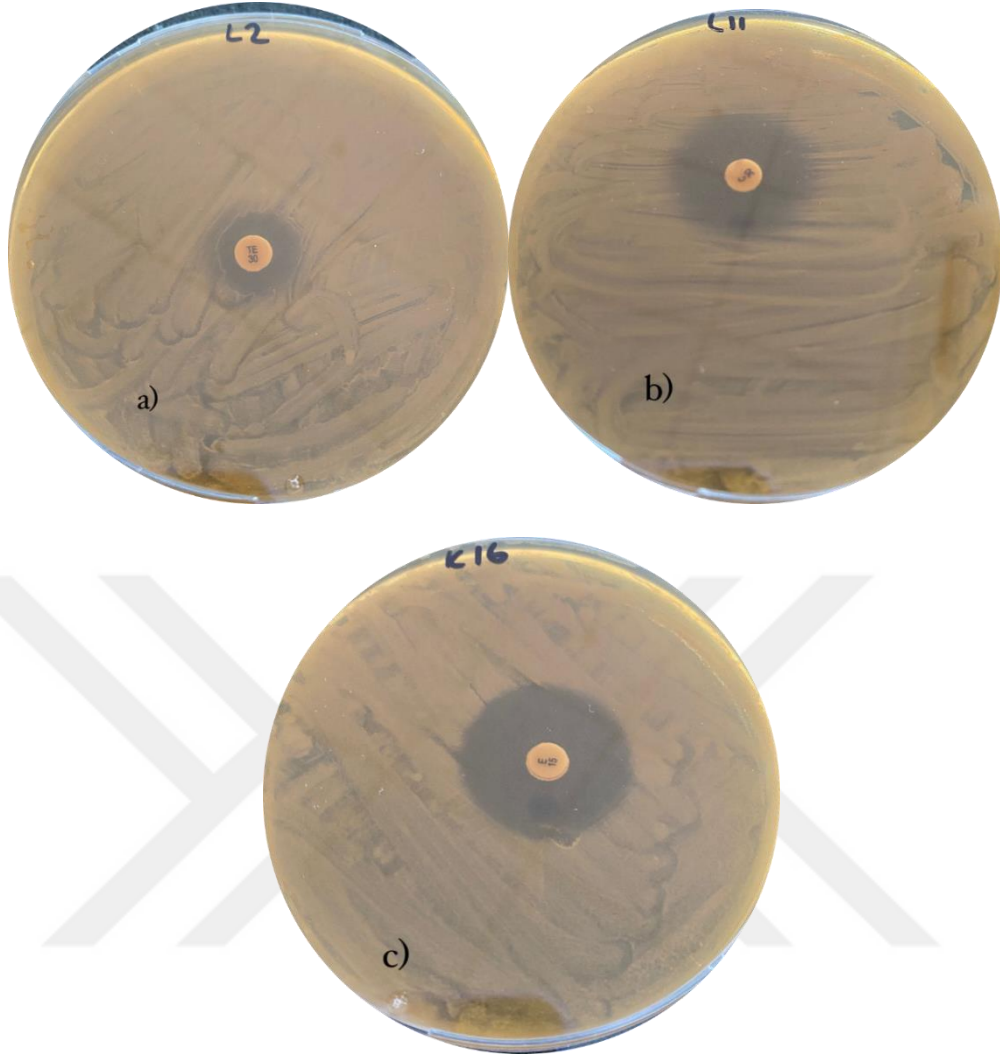
Benzer bir çalışmada Rodriguez vd. (2016), kinoa ekşi maya hamurundan izole ettikleri 15 LAB'tan *Lc. lactis* CRL1895, *Leuc. mesenteroides* CRL1907, *Lact. plantarum* CRL1906 ve *Lact. plantarum* CRL1905'in tüm antibiyotiklere duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. İzolatlardan ikisi (*Ent. hermannienseis* CRL1894 ve CRL1958) klindamisin ve tetrasikline dirençlidir.

Bazı kaynaklarda EFSA'nın bildirdiğine göre *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* türlerinin vankomisine doğal olarak dirençli olduğu belirtilmektedir (Rodriguez vd., 2016).

Çizelge 4.12. İzolatların antibiyotik direnci.

No	Kod	TE30	VA30	CN10	S10	E15	C30	P10
1	L2	18(S)	-(R)	-(R)	-(R)	25(S)	29(S)	18(S)
2	L4	18(S)	-(R)	12(S)	10(S)	26(S)	23(S)	17(S)
3	L11	21(S)	-(R)	-(R)	-(R)	27(S)	25(S)	17(S)
4	L15	19(S)	10(S)	10(S)	-(R)	28(S)	26(S)	20(S)
5	K16	19(S)	-(R)	12(S)	-(R)	27(S)	32(S)	20(S)
6	K26	21(S)	-(R)	13(S)	-(R)	27(S)	26(S)	27(S)
7	K27	19(S)	-(R)	10(S)	10(S)	26(S)	26(S)	18(S)
8	K35	20(S)	-(R)	12(S)	12(S)	28(S)	28(S)	27(S)

Kloramfenikol (30 µg/disk), Eritromisin (15 µg/disk), Vankomisin (30 µg/disk), Gentamisin (10 µg/disk), Penisilin (10 IU/ disk), Streptomisin (10 µg/disk), ;Tetrasiklin (30 µg/disk) Değerler, inhibisyon bölgesinin çapını (mm) temsil etmektedir. İnhibisyon zonu yok: dirençli (R), < 10 mm: orta düzeyde duyarlı(I), 10-35 mm: hassas(S) (Kazancıgil vd., 2019)



Resim 4.5 Temsili izolatların (L2, L11, K16) antibiyotik duyarlılığı (a: Tetrasiklin, b: Kloramfenikol, c: Eritromisin).

4.8. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması

Sekiz izolat, gluteni hidroliz etme yetenekleri ve probiyotik potansiyellerine göre seçilmiştir ve moleküler tanımlamaları 16S rRNA dizi analizi ile Aquatayf Biyoteknoloji Arge San. ve Tic. LTD. Şti. tarafından gerçekleştirilmiştir ve Bakteri isimleri ve erişim numaraları sırasıyla; L2 kodlu *Enterococcus durans* MH605354.1, L4 kodlu izolat *Enterococcus faecium* MF369860.1, L11 *Enterococcus faecium* OM618093.1, L15 *Enterococcus durans* MH605354.1, K16 *Levilactobacillus brevis* MG551215.1, K26 *Levilactobacillus spicheri* KT757243.1, K27 *Enterococcus durans* MH605354.1, K35 *Lactiplantibacillus plantarum* ON506138.1 olarak bulgulanmıştır.. Ek 1'de izolatların kodları, nükleotid dizilimleri, tür isimleri ve erişim numaraları

listelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre izolatların *Enterococcus*, *Levilactobacillus* ve *Lactiplantibacillus* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

Enterococcus türleri pek çok geleneksel fermente gıdada (ekşi maya, sofralık zeytin, beyaz peynir) doğal olarak bulunmakla beraber istenilen pek çok fonksiyonun ürüne kazandırılmasında rol oynayabilmektedir (Albayrak ve Duran, 2021; Dikbaş vd., 2023). L11 kodlu *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmış olan izolat yüksek gluten hidrolizi yanında mide asidi ve safra tuzuna karşı direnç özellikleri ile dikkat çekmektedir. Enterokok türleri doğal olarak bağırsak ortamında bulunmaları nedeniyle bu ortamlarda daha fazla direnç gösterebilmektedirler. Sakandar vd. (2018), geleneksel ekşi maya hamurundan izole ettikleri bakterilerin çoğunun (4/7) *Enterococcus faecalis*, bir tanesinin *Enterococcus mundtii* olduğunu bulgulamıştır.

Levilactobacillus brevis olarak tanımlanmış K16 kodlu izolat kloramfenikol antibiyotikine karşı en yüksek duyarlılık gösteren bakteridir. Aynı zamanda yüksek gluten hidrolizi, *E. coli* patojenine karşı yüksek koagregasyon yeteneği ve %0,5 safra tuzu ortamında yüksek tolerans oranı göstermesi ile öne çıkmaktadır. Daha önce *Lactobacillus brevis* olarak bilinen bu bakteri çeşitli fermente ürünlerden izole edilmiştir (Marinova Yordanova vd., 2024; Makambai vd., 2024; Falah vd., 2021). *Levilactobacillus brevis* bakterisi Gram pozitif, katalaz negatif, heterofermantatif bir tür olarak tarif edilmekte ve tip I ekşi maya hamurlarında kabartma ajanı olma özelliğiyle de tercih edilmektedir (Zheng vd., 2020). Ekşi maya hamurundan ve fermente sebze ürünlerinden izole edilmektedirler ve aside toleranslıdır (Zheng vd., 2020).

Levilactobacillus spicheri olduğu tanımlanan K26 izolatu mide asidinde (%92,34) ve simüle mide bağırsak ortamında yüksek canlılık göstermiş, %1 safra tuzu oranında en yüksek optik yoğunluk değerine ulaşan izolat olmuştur. Ayrıca yüksek gluten hidrolizi, tetrasiklin ve penisilin antibiyotiklerine yüksek duyarlılık göstermesiyle dikkat çekmektedir.

Levilactobacillus spicheri türünün buğday ve pirinç ekşi maya hamurundan ve fermente sebze ürünlerinden izole edildiği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Priyodip vd., 2024; Tang vd., 2024). Eski adı *Lactobacillus spicheri* olan bakteri tek ya da çift olarak çubuk şeklinde bulunmakta ve Gram pozitif, katalaz negatif heterofermantatif bakteriler olarak rapor edilmektedir.

K35 izolatu ise *Lactiplantibacillus plantarum* olarak tanımlanmış olup, yüksek gluten hidrolizi ve otoagregasyon yeteneği, mide asidi ve safra tuzuna (%0,5) tolerans özellikleri, patojenlere karşı yüksek inhibisyon zonları, penisilin ve eritromisin antibiyotiklerine duyarlı olması ile ön plana çıkmaktadır. Eski adı *Lactobacillus plantarum* olan bakteri homofermantatif, Gram pozitif, hareketsiz çubuk şeklindedir. Spontan sebze, zeytin, ekşi maya, süt fermentasyonları ve fermente etlerde bulunmaktadır (Zheng vd., 2020).

Güncel bir çalışmada Urshev vd. (2024), 7 farklı un türünden izole ettikleri LAB'ların *Lv. brevis*, *Lp. plantarum* ssp. *plantarum* ve *Lp. paraplantarum* türleri olduğunu ve ekşi mayadaki laktobasillerin suş çeşitliliğinin yüksek olduğunu bildirmiştir.

Yakın tarihli bir başka çalışmada EL Boujamaai vd. (2023), Fas ekşi maya hamurundan benzer bir şekilde *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*'un yanı sıra *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ve *Companilactobacillus paralimentarius* türlerini izole etmişlerdir.

Gänzle ve Zheng (2019) ise, çeşitli ülkelerdeki tip I ekşi maya hamurundan izole edilmiş bakterilerden sık tanımlanan türlerin *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. alimentarius* grubu türleri (*L. paralimentarius*, *L. crustorum*, *L. mindensis* ve *L. nantensis*), *Leuconostoc* spp. ve *Weissella* spp. olduğunu, tip II ekşi maya hamurunda ise *L. reuteri* grubuna ait türler, özellikle *L. pontis*, *L. panis*, *L. frumenti* ve *L. reuteri* ile *L. delbrueckii* grubuna ait organizmalar *L. amylovorus*, *L. crispatus* ve *L. acidophilus* türlerinin olduğunu raporlamıştır. Ek olarak, spontan ekşi maya hamurlarının genellikle enterokok, laktokok ve pediokok gibi organizmaları içermesine karşın; ekşi maya hamurlarındaki geri alma işlemi yapıldığında laktobasiller tarafından hızla yer değiştirdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmalar ekşi maya hamurunun, LAB'ların çeşitlilik yönünden zenginliği ile önemli bir kaynak olduğunu ortaya koymakta ve bu yönüyle ekşi maya hamuru araştırmacılar ve tüketicilerin dikkatini çekmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, ekşi maya hamurundan izole edilen LAB'ların gluten hidrolize etme ve probiyotik potansiyelini kapsamlı bir şekilde değerlendirmeyi amaçlamıştır. Süreç boyunca 6 farklı ekşi maya hamur örneğinden 60 izolat çizgi plaka yöntemi ile saflaştırılmış 44 tanesinin Gram (+), katalaz (-) olduğu anlaşılmış uzun süreli kullanım için stok kültürleri hazırlanmıştır.

İzolatlardan 16'sının glutenli besi ortamında yüksek gelişme potansiyeli gösterdiği belirlenmiştir. Bu 16 izolat arasından 10 izolatın yüksek gluten hidrolizi potansiyeli gösterdiği, izolatların çoğunun (11/15) ise mide asidine 10^7 kob/ml düzeyinin üzerinde direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Analiz sonucunda mide asidine en yüksek direnç gösteren 8 izolat ilerleyen analizler için seçilmiştir. İzolatların safra tuzuna tolerans ve gastrointestinal sistem koşullarına dayanıklılık gibi probiyotik özellikleri sergilediği saptanmıştır. %0,3 safra tuzu ortamında izolatların, en yüksek safra tuzu tolerans oranlarını gösterdiği ve aynı safra tuzu oranında sayılarını arttırdıkları sonucuna ulaşılmıştır. Simüle mide (10^7 kob/ml üzerinde) ve pankreatik sularında (10^6 kob/ml üzerinde) yüksek canlılık gösterdikleri belirlenmiştir. Epitel hücrelere bağlanma kapasitelerinin tespiti için otoagregasyon ve hidrofobisite analizleri gerçekleştirilmiştir. Probiyotiklerin değişen düzeylerdeki koagregasyon yeteneği, patojen bakterilere karşı kolonizasyonları hakkında bilgi vermiştir. İstenilen probiyotik özelliklerden bir diğeri, izolatların patojen bakterileri inhibe etmesidir en yüksek inhibisyon zonunu *Bacillus cereus* CCM 99 patojenine karşı gösterdikleri bulgulanmıştır.

Antibiyotik direnç testleri sonucunda, izolatların çoğunun vankomisin antibiyotiğine dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu durum, izolatların potansiyel probiyotik olarak kullanımında dikkat edilmesi gereken bir faktördür. Probiyotik suşların seçiminde antibiyotik duyarlılığı önemli bir kriter olup tüm izolatlar birden çok antibiyotiğe karşı duyarlı olması yönüyle dikkat çekmektedir.

İzolatların 16S rRNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlanması sonucunda *Enterococcus*, *Levilactobacillus* ve *Lactiplantibacillus* cinslerinin varlığı genetik yöntemlerle tespit edilmiştir. 8 izolat için 3 farklı cins ve 5 farklı LAB türünün

tanımlanmış olması ekşi maya hamuru florasının zenginliğini ve bu mikroorganizmaların gıda endüstrisindeki potansiyelini vurgulamaktadır.

Bu bakteriler, özellikle gluten hassasiyeti yaşayan bireyler için yenilikçi gıda ürünlerinin geliştirilmesinde büyük bir potansiyele sahiptir. Aynı zamanda fermantasyon süresinin kısaltılması, nihai ürünün kalitesinin standardize edilmesi gibi etkilerle ürüne önemli teknolojik faydalar sağlamaktadır.

Sonuç olarak, ekşi maya hamurundan izole edilen LAB'lar, probiyotik potansiyeli yüksek ve gluten degrade eden LAB'ları içermektedir. Çalışma sonucunda belirlenen bakterilerin, hem gluten intoleransı olan bireyler için yeni gıda ürünlerinin geliştirilmesi adına çözümler sunacağı hem de genel olarak sağlıklı beslenme trendlerine katkı sağlayacağı düşünülmekte ve gelecekte kullanılabilmesi beklenmektedir.

Tüm bulgular ışığında, ekşi maya hamurundan izole edilen LAB'ların probiyotik özelliklerinin ve gluten hidroliz kapasitelerinin, fonksiyonel gıda ürünleri geliştirmede önemli bir rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

L11 kodlu *Enterococcus faecium*, K26 kodlu *Levilactobacillus spicheri* ve K35 kodlu *Lactiplantibacillus plantarum* bakterileri izolatlar arasında yüksek gluten hidrolizi, mide asidi ve simüle mide bağırsak ortamında yüksek canlılık göstermeleri ile probiyotik olarak öne çıkan izolatlar olmuştur. İleride gluten hassasiyetine karşı probiyotik takviye tabletlerin üretilmesinde veya tahıl bazlı probiyotik gıdaların geliştirilmesinde kültür olarak kullanılması önerilmektedir.

Gluteni hidrolize eden bakterilerin çeşitli gıda ürünlerinde kullanılması gluten hassasiyeti yaşayan bireyler için farklı fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde çözüm olarak önerilmektedir.

Ayrıca çalışmada elde edilen bazı probiyotik özellikler bakımından zayıf olan LAB'ların da starter kültür ve tat aroma geliştirme özellikleri araştırılarak ekşi maya starterleri geliştirilebilir. Bununla birlikte, yüksek gluten hidrolizine sahip izolatlar gluteni azaltılmış ekmek ve tahıl ürünleri üretiminde değerlendirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Akamine, I. T., Mansoldo, F.R.P., Vermelho, A. B. (2023). Probiotics in the Sourdough Bread Fermentation: Current Status. *Probiotics in the Sourdough Bread Fermentation: Current Status. Fermentation*, 9, 90. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020090>
- Albayrak, Ç. B., Duran, M. (2021). Isolation and characterization of aroma producing lactic acid bacteria from artisanal white cheese for multifunctional properties. *LWT*, 150, 112053.
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G. ve Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 71-83.
- Arslan-Tontul, S., Çetin-Babaoğlu, H., Aslan, M., Tontul, İ. (2024). Evaluation of refractance window-dried type 3 sourdough as an alternative to liquid sourdough in bread production. *Journal of Cereal Science* 116 (2024) 103882. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2024.103882>
- Arya, R., Gunashree, B.S. (2021). Screening of gluten hydrolyzing strains for food applications. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(5), e15464. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15464>
- Bulut Albayrak, C., Duran, M. (2022). Worldwide research tendencies on probiotics in food science: 1993 to 2021. *British Food Journal*, 124(3), 679-700.
- Bartkiene, E., Lele, V., Ruzauskas, M., Domig, K.J., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Klupsaite, D., Juodeikiene, G., Mickiene, R., Rocha, J.M. (2019). Lactic Acid Bacteria Isolation from Spontaneous Sourdough and Their Characterization Including Antimicrobial and Antifungal Properties Evaluation. *Microorganisms*, 8, 64; doi:10.3390/microorganisms8010064
- Bircan, D., Güray, C. T. ve Bostan, K. (2017). Farklı Yöntemlerle Ekşitilmiş Hamurlardan Ekmek Yapımı Üzerine Çalışmalar. *Aydın Gastronomy*, 1(1), 1-8.

- Bradauskiene, V., Vaiciulyte-Funk,, L., Shah, B.R., Cernauskas1 , D., Tita, M.A. (2021). Recent Advances in Biotechnological Methods for Wheat Gluten Immunotoxicity Abolishment – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 71(1), 5-20.
- Çakır, E., Arıcı, M., Durak, M.Z. (2020). Biodiversity and techno-functional properties of lactic acid bacteria in fermented hull-less barley sourdough. *Journal of bioscience and bioengineering*, 130(5), 450-456. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.05.002>
- Calasso, M., Ressa, A., Calabrese, F.A., Minervini, F., De Angelis, M. (2023). Microbial ecology, biochemical and nutritional features in sprouted composite type I sourdough made of wheat and blend flours. *LWT- Food Science and Technology* 187, 115285. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115285>
- Caputo, I., Lepretti, M., Martucciello, S., Esposito, C. (2010). Enzymatic strategies to detoxify gluten: implications for celiac disease. *Enzyme research*, 2010(1), 174354. <https://doi.org/10.4061/2010/174354>
- Carrizo, S.L., de Moreno de LeBlanc, A., LeBlanc, J.G., Rollan, G.C. (2020). Quinoa pasta fermented with lactic acid bacteria prevents nutritional deficiencies in mice. *Food Research International* 127:108735. DOI: [10.1016/j.foodres.2019.108735](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108735)
- Comasio, A., Van Kerrebroeck, S., De Vuyst, L. (2021). Lemon juice and apple juice used as source of citrate and malate, respectively, enhance the formation of buttery aroma compounds and/or organic acids during Type 2 and Type 3 sourdough productions performed with *Companilactobacillus crustorum* LMG 23699. *International Journal of Food Microbiology*, 339, 109020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109020>
- Coda, R., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Edema, M.O., Gobbetti, M. (2011). Utilization of African grains for sourdough bread making. *Journal of Food Science* 76 (6):M329–M335. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02240.x
- Corsetti, A., Settanni, L., Valmorri, S., Mastrangelo, M., Suzzi, G. (2007). Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory-scale fermentations. *Food Microbiology* 24 (2007) 592–600. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.002>

- Cosme, F., Ines, A., Vilela, A. (2022). Consumer's acceptability and health consciousness of probiotic and prebiotic of non-dairy products. *Food Research International* 151: 110842. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110842>
- Cristofori, F., Francavilla, R., Capobianco, D., Dargenio, V.N., Filardo, S., Mastromarino, P. (2020). Bacterial-Based Strategies to Hydrolyze Gluten Peptides and Protect Intestinal Mucosa. *Frontiers in Immunology* 11:567801. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567801>
- Dan, H., Gu, Z., Li, C., Fang, Z., Hu, B., Wang, C., Chen, S., Tang, X., Ren, Y., Wu, W., Zeng, Z., Liu, Y. (2022). Effect of fermentation time and addition amount of rice sourdoughs with different microbial compositions on the physicochemical properties of three gluten-free rice breads. *Food Research International* 161, 111889. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111889>
- Das, T. K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K. C. ve Ghosh, K. (2022). Current status of probiotic and related health benefits. *Applied Food Research*, 2(2), 100185.
- De Angelis, M., Damiano, N., Rizzello, C.G., Cassone, A., Di Cagno, R., Gobbetti, M. (2009). Sourdough fermentation as a tool for the manufacture of low-glycemic index white wheat bread enriched in dietary fibre. *European Food Research and Technology* 229 (4):593–601.
- Demir, Y. (2021). Geleneksel Ekşi Mayanın Sağlık ve Ekmek Üzerindeki Etkileri. *Aydın Gastronomy*, 5(1), 63-70.
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M.T., Sağdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT - Food Science and Technology* 71 (2016) 116-124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.030>
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology* 37, 11-29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002>
- De Vuyst, L., Comasio, A., Van Kerrebroeck, S. (2021). Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients.

- Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(15), 2447–2479. DOI: 10.1080/10408398.2021.1976100
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S. (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology*, 26, 666–675. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.012>
- Dikbaş, N., Orman, Y.C., Alım, Ş., Uçar, S., Tülek, A. (2023). Evaluating *Enterococcus faecium* 9 N-2 as a probiotic candidate from traditional village white cheese. *Food Sci & Nutrition*, 12(3), 1847-1856.; 12: 1847–1856. DOI: 10.1002/fsn3.3878
- Erdem, N., Gökmen, S. (2022). Zonguldak İli Çaycuma İlçesinin Geleneksel Cızlama Ekmeği Üzerine Bir Araştırma. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (38), 218-228.
- EL Boujamaai, M., Mannani, N., Aloui, A., Errachidi, F., Salah-Abbes, J.B., Riba, A., Abbes, S., Rocha, J.M., Bartkiene, E., Brabet, C., Zinedine, A. (2023). Biodiversity and biotechnological properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Moroccan sourdoughs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39:331 <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03784-0>
- Falah, F., Vasiee, A., Tabatabaee Yazdi, F. ve Alizadeh Behbahani, B. (2021). Preparation and Functional Properties of Synbiotic Yogurt Fermented with *Lactobacillus brevis* PML1 Derived from a Fermented Cereal-Dairy Product. *BioMed Research International* 2021, 9. <https://doi.org/10.1155/2021/1057531>
- Fasano, A., Sapone, A., Zevallos, V., Schuppan, D. (2015). *Gastroenterology*; 148:1195–1204. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.12.049>
- Fekri, A., Abedinzadeh, S., Torbati, M., Azadmard-Damirchi, S. (2024). Considering sourdough from a biochemical, organoleptic, and nutritional perspective. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105853. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105853>
- Fekri, A., Torbati, M., Khosrowshahi, A.Y., Shamloo, H.B., Azadmard-Damirchi, S. (2020). Functional effects of phytate-degrading, probiotic lactic acid bacteria and yeast strains isolated from Iranian traditional sourdough on the

- technological and nutritional properties of whole wheat bread. *Food Chemistry* 306,125620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125620>
- Fernández-Peláez, J., Paesani, C., Gómez, M. (2020). Sourdough Technology as a Tool for the Development of Healthier Grain-Based Products: An Update. *Agronomy*, 10, 1962; doi:10.3390/agronomy10121962
- Fraberger, V., Ladurner, M., Nemec, A., Grunwald-Gruber, C., Call, L.M., Hochegger, R., Domig, K.J., D'Amico, S. (2020). Insights into the Potential of Sourdough-Related Lactic Acid Bacteria to Degrade Proteins in Wheat. *Microorganisms*, 8(11), 1689; <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111689>
- Fraberger, V., Ammer, C., Domig, K. J. (2020). Functional properties and sustainability improvement of sourdough bread by lactic acid bacteria. *Microorganisms* 8 (12), 1895. doi: 10.3390/microorganisms8121895.
- Gänzle, M. G., Zheng, J. (2019). Lifestyles of sourdough lactobacilli–Do they matter for microbial ecology and bread quality? *International Journal of Food Microbiology*, 302, 15-23.
- Gänzle, M., Ripari, V. (2016). Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. *International Journal of Food Microbiology* 239, 19–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004>
- Gänzle, M. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- Gerez, C.L., Rollan, G.C., Valdez, G., F. (2006). Gluten breakdown by lactobacilli and pediococci strains isolated from sourdough. *Letters in Applied Microbiology*, 42(5), 459-464.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Archetti, G., Rizzello, C.G. (2019). Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 302, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.018>
- Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., De Angelis, M. (2016). Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria

- biota. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.022>.
- Gül, H., Acun, S., Hayıt, F., Şirikçi, B. S. (2021). Geleneksel Ekşi Mayalı Isparta Ekmeğinin Bazı Kalite Karakteristikleri Açısından Değerlendirilmesi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16(1), 34-45.
- Kahraman, M., Arıcı, M. (2020). Ekşi Hamur Fermentasyonu ile Üretilmiş Kek Hamurunun Laktik Asit Bakterileri Çeşitliliği. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (19), 32-42. DOI: 10.31590/ejosat.732009
- Kaseleth, K., Paalme, T., Mihhalevski, A., Sarand, I. (2011). Analysis of volatile compounds produced by different species of lactobacilli in rye sourdough using multiple headspace extraction. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1940–1946. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02705.x
- Kaya, Y., Erten, T., Vurmaz, M., İspirli, H., Şimşek, Ö., Dertli, E. (2022). Comparison of the probiotic characteristics of Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from sourdough and infant feces. *Food Bioscience*, 47, 101722. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101722>
- Kazancıgil, E., Demirci, T., Öztürk-Nemiş, H. İ. ve Akın, N. (2019). Isolation, technological characterization and in vitro probiotic evaluation of Lactococcus strains from traditional Turkish skin bag Tulum cheeses. *Annals of Microbiology*, 69(12), 1275–1287. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01512-4>
- Kunduhoglu, B. (2022). Laktik Asit Bakterilerinin Gluten Degradasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi. *Euroasia Journal of Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences*, 9(25), 97-108. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7474692>
- Kunduhoglu, B., Hacıoglu, S. (2021). Probiotic Potential and Gluten Hydrolysis Activity of Lactobacillus brevis KT16-2. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13:720–733. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09723-x>
- Kunduhoglu, B. (2020). Çölyak hastalığında probiyotik kullanımı. *Recent Advances in Science and Technology* (ss. 73-85). Gece Kitaplığı.
- Lappi, J., Selinheimo, E., U Schwab, U., Katina, K., Lehtinen, P., Mykkanen, H., Kolehmainen, M., Poutanen, K. (2010). Sourdough fermentation of wholemeal wheat bread increases solubility of arabinoxylan and protein and decreases

- postprandial glucose and insulin responses. *Journal of Cereal Science* 51 (1):152–158. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.11.006>
- Lau, S.W., Chong, A.Q., Chin, N.L.; Talib, R.A.; Basha, R.K. (2021). Sourdough Microbiome Comparison and Benefits. *Microorganisms*, 9, 1355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071355>
- Liu, X., Zhou, M, Jiabin, C., Luo, Y., Ye, F., Jiao, S., Hu, X., Zhang, J., Lü, X. (2018). Bacterial diversity in traditional sourdough from different regions in China. *LWT Food Science and Technology*, 96, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.023>
- Li, Y., Liu, T., Zhao, M., Zhong, H., Luo, W., Feng, F. (2019). In vitro and in vivo investigations of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese traditional sourdough. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103:1893–1903. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9554-8>
- Loponen, J., Ganzle, M.G. (2018). Use of sourdough in low FODMAP baking. *Foods* 7 (7):96. DOI: [10.3390/foods7070096](https://doi.org/10.3390/foods7070096)
- Makambai, A., Mazhitova, A., Altıntaş, A. K. ve Kuleasan, H. (2024). Application of selected lactic acid bacteria isolates for bread production without baker's yeast. *Food Science and Biotechnology*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10068-024-01571-7>
- Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., Plumed-Ferrer, C. (2016). Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT- Food Science and Technology* 66 (2016) 275-283. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.045>
- Manovina, M., Thamarai Selvi, B., Prathiviraj, R., Selvin, J. (2022). Potential probiotic properties and molecular identification of lactic acid Bacteria isolated from fermented millet porridge or ragi koozh and jalebi batter. *Animal Gene* 26, 200134. <https://doi.org/10.1016/j.angen.2022.200134>
- Maria, B., Souza, S. De, Borgonovi, T. F., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., Lúcia, A. ve Penna, B. (2019). Mariarameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. 382–396.

- Marinova, V. Y., Kizheva, Y. K., Rasheva, I. K., Hristova, P. K. (2024). Traditional Bulgarian fermented foods as a source of beneficial lactic acid bacteria. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)*, 16(1), 7. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1601007>
- Makambai, A., Mazhitova, A., Altıntaş, A. K., Kuleasan, H. (2024). Application of selected lactic acid bacteria isolates for bread production without baker's yeast. *Food Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10068-024-01571-7>
- Mohammed, S., Özdemir, N., Çon, A.H. (2024). Evaluation of functional properties of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese. *Measurement: Food* 14 (2024) 100171. <https://doi.org/10.1016/j.meafao.2024.100171>
- Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., López-Gómez, J. P. (2020). Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>
- Nami, Y., Panahi, Y., Jalaly, H.M., Rostampour, M., Hejazi, M.A. (2024). Probiotic Characterization of LAB isolated from Sourdough and Different Traditional Dairy Products Using Biochemical, Molecular and Computational Approaches. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10234-2>
- Nielsen, M. M., Damstrup, M.L., Thomsen, A.D., Rasmussen, S.K., Hansen, Å. (2007). Phytase activity and degradation of phytic acid during rye bread making.” *European Food Research and Technology* 225 (2):173–181.
- Nuobariene, L., Cizeikiene, D., Gradzeviciute, E., Hansen, A., Rasmussen, S.K., Juodeikiene, G., Vogensen, F. (2015). Phytase-active lactic acid bacteria from sourdoughs: Isolation and identification. *LWT: Food Science and Technology* 63(1):766–772. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.018>
- Oshiro, M., Zendo, T., Nakayama, J. (2021). Diversity and dynamics of sourdough lactic acid bacteriota created by a slow food fermentation system. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 131, 4: 333-340. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.11.007>

- Ostman, Elin. 2003. *Fermentation as a Means of Optimizing the Glycaemic Index-food Mechanisms and Metabolic Merits with Emphasis on Lactic Acid in Cereal Products*. [Doctoral dissertation, Lund University]. <https://portal.research.lu.se/en/publications/fermentation-as-a-means-of-optimizing-the-glycaemic-index-food-me>
- Örü, F. ve Ertop, M. H. (2021). Siyez ve Ekmeklik Buğday Kepeğinin Ekşi Hamur Üretiminde Kullanım Olanığının Değerlendirilmesi. *Gıda*, 46(2), 396-407. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20087>
- Pacularu-Burada, B., Turturica, M., Rocha, J. M., Bahrim, G.E. (2021). Statistical Approach to Potentially Enhance the Postbiotication of Gluten-Free Sourdough. *Applied Sciences*, 11 (11), 5306. <https://doi.org/10.3390/app11115306>
- Pacularu-Burada, B., Georgescu, L.A., Vasile, M.A., Rocha, J. M., Bahrim, G.E. (2020). Selection of Wild Lactic Acid Bacteria Strains as Promoters of Postbiotics in Gluten-Free Sourdoughs. *Microorganisms*, 8(5), 643; <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050643>
- Pérez-Alvarado, O., Zepeda-Hernández, A., Garcia-Amezquita, L.E., Requena, T., Vinderola, G., García-Cayuela, T. (2022). Role of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough fermentation during breadmaking: Evaluation of postbiotic-like components and health benefits. *Frontiers in Microbiology* 13:969460. doi: 10.3389/fmicb.2022.969460
- Poutanen, K., Flander, L. ve Katina, K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food microbiology*, 26(7), 693-699. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.011>
- Ramedani N, Sharifan A, Gholam-Mostafaei FS, Rostami-Nejad M, Yadegar A, Moham Ehsani-Ardakani MJ. (2020). The potentials of probiotics on gluten hydrolysis; a review study. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 13(Suppl1), S1.
- Ribet, L., Dessalles, R., Lesens, C., Brusselaers, N., Durand-Dubief, M. (2023). Nutritional benefits of sourdoughs: A systematic review. *Advances in Nutrition* 14, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2022.10.003>

- Rizzello, C.G., Cassone, A., Di Cagno, R., Gobbetti, M. (2008). Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (16):6936–6943.
- Rizzello, C. G., Tagliazucchi, D., Babini, E., Rutella, G.S., Taneyo Saa, D.L., Gianotti, A. (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods* 27:549–569.
- Sakandar, H.A., Usman, K., Imran, M. (2018). Isolation and characterization of gluten-degrading *Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir). *Lwt*, 91, 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.023>
- Sharma, A., Lavania, M., Singh, R. ve Lal, B. (2021). Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. *Saudi journal of biological sciences*, 28(3), 1622-1632.
- Sharma, K., Attri, S., Goel, G. (2018). Selection and Evaluation of Probiotic and Functional Characteristics of Autochthonous Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Wheat Flour Dough Babroo. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 774–784. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9466-z>
- Syrokou, M.K., Tziompra, S., Psychogiou, E.-E., Mpisti, S.-D., Paramithiotis, S., Bosnea, L., Mataragas, M., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H. (2021). Technological and Safety Attributes of Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from Spontaneously Fermented Greek Wheat Sourdoughs. *Microorganisms*, 9 (4), 671. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040671>
- Tang, H., Ma, J.K., Chen, L., Jiang, L.-W., Kang, L.-Z., Guo, Y.-Y., Men, G.-Y., Nie, D.-X. ve Zhong, R.-M. (2024). Characterization of key flavor substances and their microbial sources in traditional sour bamboo shoots. *Food Chemistry*, 437, 137858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137858>
- Tsafirakidou, P., Michaelidou, A.M., Biliaderis, C. G. (2020). Fermented Cereal-based Products: Nutritional Aspects, Possible Impact on Gut Microbiota and Health Implications. *Foods*, 9(6), 734. <https://doi.org/10.3390/foods9060734>

- Urshev, Z., Doynova, D., Prasev, I., Denkova-Kostova, R., Koleva, A., Denkova, Z., Goranov, B., Kostov, G. (2024). Identification of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Sourdoughs Prepared with Different Flour Types. *Appl. Sci.*, 14, 2093. <https://doi.org/10.3390/app14052093>
- Vasiee, A., Falah, F., Behbahani, B., A., Tabatabaee-yazdi, F. (2020). Probiotic characterization of *Pediococcus* strains isolated from Iranian cereal-dairy fermented product: Interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line Caco-2. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 130(5), 471-479.
- Vasiee, A., Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.Y., Noorbakhsh, H. (2018). Diversity and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Horreh, a Traditional Iranian Fermented Food. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10, 258-268. DOI 10.1007/s12602-017-9282-x
- Vinderola, C. G. ve Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria : a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X)
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., Reinheimer, J. (2008). Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9), 1678-1688.doi: 10.1016/J.LWT.2007.10.008
- Villegas, J.M., Brown, L., Savoy de Giori, G., Hebert, E.H. (2016). Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 67, 22-26.<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.027>
- Wang, Z., Wang, L. (2024). Impact of sourdough fermentation on nutrient transformations in cereal-based foods: Mechanisms, practical applications, and health implications. *Grain & Oil Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2024.03.001>
- Wang, C., Cui, Y., Qu, X. (2018). Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of microbiology*, 200, 195-201. DOI 10.1007/s00203-017-1446-2

- Xi, J., Xu, D., Wu, F., Jin, Z., Yin, Y., Xu, X. (2020). The aroma compounds of Chinese steamed bread fermented with sourdough and instant dry yeast. *Food Bioscience* 38, 100775. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100775>
- Xu, Y., Zhou, T., Tang, H., Li, X., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, J. (2020). Probiotic potential and amylolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods. *Food Control*, 111, 107057. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107057>
- Yılmaz, E., Yüksel, Z. (2023). Ekşi maya ve ekşi mayalı ekmeğin bazı teknolojik özellikleri ile sağlık üzerine etkileri. *Gıda*, 48(4), 750-771. Doi: 10.15237/gida.GD23062
- Zuo, F., Yu, R., Feng, X., Chen, L., Zeng, Z., Khaskheli, G.B., Ma, H., Chen, S. (2016) Characterization and in vitro properties of potential probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-fed infant feces. *Annals of Microbiology*, 66, 1027-1037. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1187-x>
- Zhao, X., Ganzle, M.G. (2018). Genetic and phenotypic analysis of carbohydrate metabolism and transport in *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology* 272, 12–21. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.021](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.021)

7. EKLER

EK 1. Çalışmada kullanılan kimyasallar, besiyerleri ve ürün kodları

	Kimyasal Adı	Kimyasal Kodu
1	Agar	Liofilchem 611001
2	Asetik Asit	Sigma 27225
3	Coomassie Blue Radiant	Sigma 6104-59-2
4	Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4)	Emprove Essential 1.05101.1000
5	Glukoz	Applichem A3666
6	Gluten	Tellioğlu Vital Buğday Gluteni
7	Hidrojen Peroksit	Merck-A6383
8	Hidroklorik Asit	Sigma33520
9	Kalsiyum Klorür Monohidrat ($CaCl_2 \cdot H_2O$)	Merck 102018927
10	Kristal viyole	Fluka 548-62-9
11	Ksilen	Sigma 16446
12	Kolestrol	Applichem A0985
13	Maya ekstraktı	Applichem -A3732
14	Metanol	Merck 1.06007.2500
15	Metilen mavi	Fluka-66720-100
16	MRS Broth	Neogen 114395B
17	Nutrient Broth	Merck 1.05443
18	Pankreatin	Applichem A0807
19	PBS tablet	Biomatik A3602
20	Pepsin	Merck 1.07185
21	Pepton	Oxoid-LP0037
22	Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Merck 1.4873.1000
23	Safra Tuzu	Oxoid LP00SS
24	Sikloheksimit	Cayman 14126
25	Sitrik Asit	Merck 101502549
26	Sodyum hidroksit	Merck-1064981000
27	Tripton	Sigma 11326R500
28	Tween 80	Applichem A1390



Ek 2. Gluten hidrolizi deneylerinde kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışı

A) Coomassie Blue Çözeltisi

	g/ ml
Coomassie brilliant blue R-250	5
Asetik asit	9
Metanol	2
Distile su	5
	00
	1
	000

Tüm malzemeler karıştırılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

B) Boya Durulama Çözeltisi

	g/ml
Metanol	250
Asetik asit	50
Distile su	1000

Tüm malzemeler karıştırılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.



Ek 3. Bakteri boyamalarında kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışı

C) Metilen Mavisi Çözeltisi

	g/ml
Metilen Mavisi	0,3
Etanol (%95'lik)	30
Distile su	70

Metilen mavisi etanol içerisinde çözündürüldükten sonra distile su eklenir.

D) Kristal Viyole Çözeltisi

	g/ml
Kristal viyole	2
%95'lik Etil alkol (etanol)	20ml
	(cc)
Amonyum oksalat	0,8
Distile su	80

Kristal viyole etil alkol içinde karıştırılarak çözündürülmüştür. Amonyum oksalat saf su ile hazırlanan solüsyonun üzerine ilave edilmiştir.

E) Gram İyot Çözeltisi (Lugol)

	g/ml
İyod	1
Potasyum iyodür	2
Distile su	300

Tartılan malzemeler 20 ml distile suda çözündürülmüş ardından balon jöjeye alınıp kalan su ile 300 ml'ye tamamlanmıştır.

F) Safranin Çözeltisi

	g/ ml
Safranin	0,5
%95'lik Etil alkol (etanol)	10
Distile su	10
	0

Safranin tartılarak etil alkolde (%95'lik) çözündürülmüş ve 100 ml distile su ilave edilerek karıştırılmıştır.



Ek 4. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması

İzolat Kodu	Nükleotit Dizilimi	Tür İsmi	Erişim Numarası
L2	GGGTTTGCTACATACTAGTACATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGG AAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACT TGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCG GGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCA CGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTAC GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGA AGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACCTGTTTCATCC CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA ATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG GTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA AGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTG ACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGTGGTGCATGCTGTGTCAGCTCG TGTCGTGAGATGTGGGTAGTCCCGCACGAGCGCAACCTATGTAGTGCATCATCAGTGGCACTCTAG CCAGACTGCGTGACAACGAAGTAGTGGGTATGACGTCAATCATCATGCCGTTATGACCTTGGCTAA ACACGTGCCTAACAAATGGAGTAC	<i>Enterococcus durans</i>	MH6053 54.1
L4	AGCAGTGCGCAGCTATAATGCAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAA GAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAA ACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGT CGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATG CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG GTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACCTGTTTCATCCCTTGA CGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC CGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTG TAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG TAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAC	<i>Enterococcus faecium</i>	MF3698 60.1

Ek 4. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması (Devamı)

L11	TCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACT CTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTCAGTTG GGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTA AGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAA TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT CACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGT GGATGAACTCG CGGGACTGCGTGTGCTATACATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGA AAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTT GGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGG GTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACG GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA GAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACCTGTTTCATCCC TTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG CCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG TCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAC ACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGTGCATGTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTGGGTAGTCCCGCACGAGCGCACCCCTTATTGTAGTGCATCATCAGTGGGCCCTCTAG CAGACTGCGTGACAAACGAGAGGTGGATGACGTCAATCATCATGCCCTTATGACTGGCTACACACG TGCTCATGGGAGTACACACGAGTTGCGAGTGCCGAGGCTAGCTATTCTTCTTTTAACTCCTTTGACA CTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGTGCATGTGTCGTCAGCTCGTGT GTGAGATGTGGGTAGTCCCGCACGAGCGCACCCCTTATTGTAGTGCATCATCAGTGGGCCCTCTAGC AGACTGCGTGACAAACGAGAGGTGGATGACGTCAATCATCATGCCCTTATGACTGGCTACACACGT GCTCATGGGAGTACACACGAGTTGCGAGTGCCGAGGCTAGCTATTCTTCTTTTA	<i>Enterococcus faecium</i> OM6180 93.1
L15	GGGTTTGCTACATACTAGTACATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGG AAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACT TGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCG	<i>Enterococcus durans</i> MH6053 54.1

Ek 4. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması (Devamı)

K16

GGTGTCTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCA
CGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
AGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACGTTCATCC
CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA
ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG
GTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
AGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTG
ACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGTGGTGCATGCTGTCTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTGGGTAGTCCCGCACGAGCGCAACCTATGTAGTGCATCATCAGTGGCACTCTAG
CCAGACTGCGTGACAACGAAGTAGTGGGTATGACGTCAATCATCATGCCGTTATGACCTTGGCTAA
ACACGTGCCTAACAAATGGAGTAC
GGGGGGGGCATGCTATACATGCAGTCAACGAGCTTCCGTTGAATGACGTGCTTGCACTGATTTCA
ACAATGAAGCGAGTGGCGAAGTGGTGAGTAACACGTGGGAAATCTGCCAGAAAGCAGGGGATAACA
CTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGTTGAAAGGTGGCTT
CGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCCCAACAGAC
GATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGT
GAAGAAGGGTTTTCCGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACGTTCAA
GGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTG
GAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTC
TAGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT
TAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTCT
GCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCTTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAG
CTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT
TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA
TCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCGT
GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA
GTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC

Levilactobacillus brevis

MG5512

15.1

Ek 4. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması (Devamı)

K26	CGCCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTCGGGAGTCAGCCGTCTAAGGTGATCAC ATACATGCAAGTCGAACGAGTTCCCGTTGATTGACGTGCTTGCACTGATTTCAACATTGGAACGAGTGGCGAAGTGGTGAGTAACACGTGGGAAATCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGTTGAAAGGTGGTTTCGGCTATCACTTC TGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCTTACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACCTGTTGACATCGTGACGGTAT TCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACC CTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACCTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTCGGGAGTCAGCC	<i>Levilactobacillus spicheri</i>	3.1	KT75724
K27	GGGTTTGCTACATACTAGTACATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACCTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG	<i>Enterococcus durans</i>	54.1	MH6053

Ek 4. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması (Devamı)

	GTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA AGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAA GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTG ACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGTGGTGCATGCTGTCGTCAGCTCG TGTCGTGAGATGTGGGTAGTCCCGCACGAGCGCAACCTATGTAGTGCATCATCAGTGGCACTCTAG CCAGACTGCGTGACAACGAAGTAGTGGGTATGACGTCAATCATCATGCCGTTATGACCTTGGCTAA ACACGTGCCTAACAATGGAGTAC		
K35	CGCGAGCGGGGTCTATAATGCAGTCGACGAGCTCTGGTATGATTGGTGCTTGCATCATGAATTACA TTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCT GGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGG CTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAAT GATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACG GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACGTTCAGGTA TTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGG CAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAG CCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAA CTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGG TCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAT ACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA GCATTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAG CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCA AATCTAAGAGATTAGACGTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGGTGGTGCATGATTGTCGTCAGC TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTTATCAGTTGCCAGCAT TAAGTTGGGCACTCTGATGAGACTGGCACTGACAACCGGCAGAAAGTGGGATGACGTCAATTCATCA TG CCCCTTTATTGAACCTGGGGGCCT	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	ON5061 38.1



ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Ad : Gönül, Rana

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi (Yıl)
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı	...
Lisans	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği	2021

BURSLAR ve ÖDÜLLER

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2023-2024	Şok Marketler Ticaret A.Ş., Aydın	Kalite ve Ürün Güvenliği Uzmanı
2022-2023	Natura Kuru Meyve San.ve Tic. A.Ş., Aydın	Kalite Kontrol Uzmanı

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

2. PROJELER

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler