

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI KAYNAKLARDAN *Bacillus* ssp. İZOLASYONU,
PROBİYOTİK KARAKTERİZASYONU ve FONKSİYONEL
JELLY ŞEKERLEME ÜRETİMİNDE KULLANIMI**

Burcu KAHRAMAN

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Prof. Dr. Muhammet ARICI

Aralık, 2023

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI KAYNAKLARDAN *Bacillus* ssp. İZOLASYONU,
PROBİYOTİK KARAKTERİZASYONU ve FONKSİYONEL
JELLY ŞEKERLEME ÜRETİMİNDE KULLANIMI**

Burcu KAHRAMAN tarafından hazırlanan tez çalışması 13.12.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muhammet ARICI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Muhammet ARICI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

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

Doç. Dr. İbrahim PALABIYIK, Üye
Namık Kemal Üniversitesi

Prof. Dr. Enes DERTLİ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğretim Üyesi Nevruz Berna TATLISU, Üye
İstanbul Gelişim Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Muhammet ARICI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan ‘‘Farklı Kaynaklardan *Bacillus* ssp. İzolasyonu, Probiyotik Karakterizasyonu ve Fonksiyonel Jelly Şekerleme Üretiminde Kullanımı’’ başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Burcu KAHRAMAN

İmza



Bu alışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun (TÜBİTAK) 5190060 numaralı TEYDEB, 1505 niversite-Sanayi İř birliği Destek Programı ile desteklenmiştir. Burcu KAHRAMAN, YK 100/2000 Doktora Burs Programı ve TÜBİTAK 2211/A Yurtiçi Genel Doktora Burs Programları tarafından desteklenmiştir



Kıymetli Ailem

ve

Biricik Yahya Aslan'ıma

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince engin bilgisi, tecrübesi ve önerileri ile bana her zaman yol gösteren, desteğini her daim hissettiğim, kıymetli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Muhammet ARICI'ya saygılarımı ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarımın çeşitli aşamalarında yardımları ve fikirleri ile çalışmalarımın gelişmesine katkı sağlayan, bilgilerini benimle paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Ömer Said TOKER ve Prof. Dr. Enes DERTLİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK-TEYDEB 1505 Üniversite Sanayi İş birliği Destek Programı ve 2211/A Yurtiçi Genel Doktora Burs Programı kapsamında tezime ve bana destek sağlayan TÜBİTAK'a ve 100/2000 Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında destek sağlayan YÖK'e teşekkür ederim.

Üniversite Sanayi İş birliği Destek Programı (1505) kapsamında yürüttüğümüz proje ile tez çalışmalarına destek veren Kervan Gıda'ya teşekkürü borç bilirim.

Proje kapsamında beraber çalıştığım değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Burcu Mine ŞENOL ve Arş. Gör. Kader KORKMAZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca her türlü altyapısından yararlandığım Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümüne ve bölümümüzün değerli öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince desteği, teşviki ve anlayışını bir an bile esirgemeyen değerli eşim Dr. Yusuf KAHRAMAN'a en içten teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Beni bu yola teşvik eden, hayatım boyunca maddi, manevi desteklerini, sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim kıymetli aileme; canım annem Gülşen YAŞAR'a, babam Kenan YAŞAR'a ablam Büşra YARGICI'ya ve kardeşim Yuşa YAŞAR'a özel teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Son olarak bu uzun, zorlu, meşakkatli ama bir kadar da keyif dolu yolculukta, başından sonuna kadar, sevgisiyle bana en büyük motivasyon kaynağı olan, biriciğim, Yahya Aslan KAHRAMAN'ım, bu tez senin için...

Burcu KAHRAMAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ	18
1.1 Literatür Özeti	18
1.2 Tezin Amacı	19
1.3 Hipotez	20
2 LİTERATÜR TARAMASI	22
2.1 Şekerleme	22
2.2 Şekerleme Üretiminde Kullanılan Hammaddeler	22
2.2.1 Glikoz ve Fruktoz	22
2.2.2 Sakkaroz	24
2.2.3 Glikoz (Mısır) Şurubu	25
2.2.4 Kıvam Verici Bileşenler	25
2.2.5 Asitlik Düzenleyiciler	26
2.2.6 Aroma Vericiler	27
2.2.7 Renklendiriciler	27
2.2.8 Parlatma Ajanları	27
2.2.9 Su	28
2.3 Şekerleme Türleri	28
2.3.1 Sert Şekerleme	28
2.3.2 Yumuşak Şekerleme	29
2.4 Fonksiyonel Şekerleme Üretimi	30
2.5 Probiyotikler	32
2.6 <i>Bacillus</i>	32
2.6.1 Habitat, Çeşitlilik, Metabolizma ve Taksonomi	33
2.6.2 <i>Bacillus</i> Türlerinin Probiyotik Olarak Kullanılması	35
3 MATERYAL VE YÖNTEM	38

3.1	Balık ve Toprak Örneklerinin Temini ve Bakteri İzolasyonu.....	38
3.2	Muhtemel <i>Bacillus</i> İzolatlarının Tespit Edilmesi	39
3.2.1	Gram Boyama.....	40
3.2.2	Spor Boyama	40
3.2.3	Katalaz Testi	40
3.3	Genomik DNA İzolasyonu, İzolatların Moleküler Yöntemlerle Gruplandırılması ve Tanımlanması.....	40
3.4	İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi	42
3.4.1	Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme	42
3.4.2	Farklı Sıcaklık Derecelerinde Gelişme.....	42
3.4.3	Farklı pH Derecelerinde Gelişme	42
3.4.4	Lesitin Hidroliz Testi.....	43
3.4.5	Hemoliz Testi	43
3.4.6	Nişasta Hidroliz Testi	43
3.4.7	Glukozdan Gaz Oluşumu	43
3.5	<i>Bacillus</i> İzolatlarının Probiyotik Potansiyeli İçin <i>in-vitro</i> Testler	43
3.5.1	Safra Toleransı.....	43
3.5.2	Hücre Yüzeyi Hidrofobikliği Analizi	44
3.5.3	Otoagregasyon Analizi	44
3.5.4	Antibiyotik Duyarlılık Testi	44
3.6	<i>Bacillus</i> Sporulasyonu.....	45
3.7	Probiyotik Yumuşak Şekerleme Üretimi	46
3.8	Reolojik Analiz	47
3.9	Yumuşak Şekerlemelerde Probiyotik Sayımı	48
3.10	Yumuşak Şekerlemelerde <i>in-vitro</i> Gastrointestinal Sistem Dayanıklılık Analizi	49
3.11	Yumuşak Şekerlemelerin Fizikokimyasal Analizleri	50
3.12	Yumuşak Şekerlemelerin Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi	51
3.13	Yumuşak Şekerlemelerin Tekstürel Özelliklerinin Belirlenmesi	52
3.14	Yumuşak Şekerlemelerin Duyusal Özelliklerinin Belirlenmesi	53
3.15	İstatistiksel Analiz.....	54
4	BULGULAR VE TARTIŞMA	55
4.1	İzole Edilen Bakterilerin Özellikleri	55
4.2	İzolatların 16S rRNA Dizin Analizi Sonuçları	64
4.3	Bakteri İzolatlarının Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	68
4.4	<i>Bacillus</i> İzolatların Probiyotik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	73

4.4.1 Safra Toleransı.....	73
4.4.2 Hücre Yüzeyi Hidrofobikliği.....	75
4.4.3 Otoagregasyon.....	76
4.4.4 Antibiyotik Duyarlılık	77
4.5 Probiyotik Yumuşak Jelly Şekerlemelerin Özellikleri.....	81
4.5.1 Yumuşak Şekerlemelerin Reolojik Özellikleri.....	81
4.5.2 Yumuşak Şekerlemelerin Mikrobiyolojik Özellikleri	83
4.5.3 Yumuşak Şekerlemelerin <i>in-vitro</i> Gastrointestinal Sisteme Dayanıklılığı	85
4.5.4 Yumuşak Şekerlemelerin Fizikokimyasal Özellikleri.....	86
4.5.5 Yumuşak Şekerlemelerin Biyoaktif Özellikleri	89
4.5.6 Yumuşak Şekerlemelerin Tekstürel Özellikleri	90
4.5.7 Yumuşak Şekerlemelerin Duyusal Özellikleri	94
5 SONUÇ	97
KAYNAKÇA	100
A İZOLATLARIN 16S rRNA GEN DİZİMLERİ	107
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	116

SİMGE LİSTESİ

±	Artı Eksi İşareti
g	Gram
a*	Kırmızılık
kg	Kilogram
L	Litre
log	Logaritma
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
L*	Parlaklık
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
b*	Sarılık
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz Çifti
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNTP	Deoxynucleotide Triphosphates
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
Kob	Koloni Oluşturan Birim
L.	<i>Lactobacillus</i>
LAB	Laktik Asit Bakterileri
N	Azot
NA	Nutrient Agar
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NB	Nutrient Broth
NCCLS	The National Committee for Clinical Laboratory Standards
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Asitlik veya Bazlık Derecesini Gösteren Ölçü Birimi
RAPD	Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
S.	<i>Staphylococcus</i>
sa	Saat
sn	Saniye
ssp.	Subspecies
Taq	Thermus Aquaticus

TBE	Tris Base, Boric Acid and EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UV	Ultraviyole
WHO	World Health Organization



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 <i>Bacillus</i> cinsi taksonomi.....	35
Şekil 3.1 Balık ve toprak örnekleri.....	38
Şekil 3.2 Probiyotik <i>Bacillus</i> içeren takviye edici gıda örnekleri	39
Şekil 3.3 Tek koloni düşürülen çeşitli kodlardaki numuneler	39
Şekil 3.4 Bakteri sporülasyon medyaları	45
Şekil 3.5 Bakteri sporlarının toplanması	45
Şekil 3.6 Probiyotik yumuşak şekerleme üretim çalışmaları	47
Şekil 3.7 Reometre cihazı	48
Şekil 3.8 Yumuşak şekerlemelerde bakteri ekimleri	49
Şekil 3.9 Fizikokimyasal analizler.....	51
Şekil 3.10 Tekstür cihazı ve şekerleme tutucu tablası.....	53
Şekil 3.11 Duyusal analiz için yumuşak şekerleme örnekleme.....	54
Şekil 4.1 Gram boyama testi, (Gram pozitif)	55
Şekil 4.1 Gram boyama testi, (Gram pozitif) (devamı)	56
Şekil 4.2 Katalaz testi (pozitif)	56
Şekil 4.3 Spor boyama (pozitif).....	57
Şekil 4.4 <i>Bacillus</i> türlerine özgü primer kullanılarak çalışılan PCR analizinden elde edilen elektroforez jel görüntüleri	65
Şekil 4.5 Farklı DNA parmak izine (fingerprint) sahip izolatların agaroz jel görüntüleri	66
Şekil 4.6 <i>Bacillus</i> izolatlarının safra toleransları.....	74
Şekil 4.7 Safra ortamına maruz kalan <i>Bacillus</i> türünün mikroskop görüntüsü	75
Şekil 4.8 <i>Bacillus</i> izolatlarına ait hidrofobisite değerleri	76
Şekil 4.9 <i>Bacillus</i> izolatlarına ait otoagregasyon değerleri	77
Şekil 4.10 Probiyotik yumuşak şekerlemelere ait shear rate-viskozite grafiği.....	82
Şekil 4.11 Üretilen yumuşak şekerlemelerin duyusal özellikleri	96

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 PCR karışım bileşenleri	41
Tablo 3.2 PCR program şartları	41
Tablo 3.3 Yumuşak şekerleme bileşenleri	47
Tablo 4.1 Toprak numunelerine ait bilgiler ve elde edilen izolatların özellikleri.	58
Tablo 4.1 Toprak numunelerine ait bilgiler ve elde edilen izolatların özellikleri (devamı).....	59
Tablo 4.1 Toprak numunelerine ait bilgiler ve elde edilen izolatların özellikleri (devamı).....	60
Tablo 4.1 Toprak numunelerine ait bilgiler ve elde edilen izolatların özellikleri (devamı).....	61
Tablo 4.2 Balık numuneleri ve elde edilen izolatların özellikleri.....	62
Tablo 4.2 Balık numuneleri ve elde edilen izolatların özellikleri (devamı)	63
Tablo 4.3 Çeşitli takviye edici gıdalardan elde edilen izolatların özellikleri.....	64
Tablo 4.4 İzolatların 16S rRNA dizin analizi sonuçları.....	67
Tablo 4.5 Bakteri izolatlarının fizyolojik özellikleri.....	68
Tablo 4.5 Bakteri izolatlarının fizyolojik özellikleri (devamı)	69
Tablo 4.6 Bakteri İzolatlarının çeşitli biyokimyasal özellikleri.....	71
Tablo 4.6 Bakteri İzolatlarının çeşitli biyokimyasal özellikleri (devamı)	72
Tablo 4.7 <i>Bacillus</i> suşlarının antibiyotiklere karşı dirençleri (cm).....	79
Tablo 4.7 <i>Bacillus</i> suşlarının antibiyotiklere karşı dirençleri (cm) (devamı)	80
Tablo 4.8 Herschel–Bulkley model parametreleri	83
Tablo 4.9 Üretilen yumuşak şekerlemelerde bakteri canlılığının tespiti.....	84
Tablo 4.10 Üretilen yumuşak şekerlemelerdeki probiyotiklerin gastrointestinal sistem içerisindeki canlı kalım yüzdeleri	86
Tablo 4.11 Üretilen yumuşak şekerlemelerin pH ve su aktivitesi değerleri	87
Tablo 4.12 Üretilen yumuşak şekerlemelerin renk özellikleri	88
Tablo 4.13 Üretilen yumuşak şekerlemelerin protein ve toplam şeker miktarları.	88
Tablo 4.13 Üretilen yumuşak şekerlemelerin protein ve toplam şeker miktarları devamı	89
Tablo 4.14 Yumuşak şekerlemelerin biyoaktif özellikleri.....	90
Tablo 4.15 Yumuşak şekerlemelerin sertlik özellikleri	91
Tablo 4.16 Yumuşak şekerlemelerin iç yapışkanlık özellikleri	92
Tablo 4.17 Yumuşak şekerlemelerin sakızimsılık özellikleri	93
Tablo 4.18 Yumuşak şekerlemelerin esneklik özellikleri	94
Tablo 4.19 Yumuşak şekerlemelerin duysal özellikleri.....	95

Farklı Kaynaklardan *Bacillus* Ssp. İzolasyonu, Probiyotik Karakterizasyonu ve Fonksiyonel Jelly Şekerleme Üretiminde Kullanımı

Burcu KAHRAMAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Yumuşak (jelly) şekerlemeler, yetişkinler ve özellikle çocuklar tarafından sevilerek tüketilen, jelatin ve gamsı maddelerin çeşitli işlem aşamalarından geçirilmesiyle elde edilen, farklı şekillere ve aromalara sahip şekerlemelerdir. Son yıllarda, fonksiyonel gıdalara yönelik talebin artması, şekerleme endüstrisinde bu talebi karşılayabilecek ürünlerin üretilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla, tez kapsamında farklı kaynaklardan (toprak, balık vd.) izole edilen probiyotik *Bacillus* türleri fonksiyonel yumuşak şekerleme üretiminde kullanılmıştır. Çalışmanın ilk basamağında; çeşitli kaynaklardan izole edilen muhtemel *Bacillus* izolatlarına Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi uygulanmış ve 16S rRNA genleri üzerinden tanımlama işlemi gerçekleştirilmiştir. *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenen izolatların teknolojik ve probiyotik özellikleri tespit edilmiştir. Bulgulara göre, izole edilen çeşitli *Bacillus* türleri 30°C ve 40°C'de iyi gelişme göstermiştir. Yüksek tuz (%10) konsantrasyonunda gelişme, bu türlerin yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere edebildiğini göstermiştir. İzolatlar en iyi gelişmeyi pH 6 ile 8 arasında göstermiştir. İzolatların glikozdan gaz üretmediği ancak tüm bakteri

suşlarının eskulin ve nişastayı hidrolize edebildiği ve katalaz kullanabildiği bulunmuştur. Tüm *B. subtilis* izolatları nitrati indirgeyebilirken, *B. coagulans* izolatları genellikle nitrati nitrite indirgeyememiştir. *Bacillus* suşlarının safra tuzlarındaki en iyi gelişmeleri %0,3 ve %0,5 safra tuzu içeren ortamlarda olduğu görülmüştür. İzolatlar test edilen antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur. Çalışmanın devamında ise seçilen probiyotik *Bacillus* türleri ve ticari *Bacillus* izolatları (*Bacillus coagulans*, *Bacillus clausii* ve *Bacillus subtilis*) kullanılarak probiyotik (8,09-6,52 log kob/g) yumuşak jelly şekerleme geliştirilmiştir. Yumuşak şekerlerin fizikokimyasal özelliklerinde probiyotik kullanımı ile kontrol örneklerine göre herhangi bir değişiklik bulunamamıştır ($p > 0,05$). Yumuşak şekerlerin akış davranış özellikleri probiyotik ilavesi ile değişmemiş ve benzer viskozite değerleri göstermiştir. *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* ve *Bacillus clausii* suşlarını içeren yumuşak jelly şekerlemelerin (P1, P2, EG ve BB2), probiyotik özellikleri; 90. gün sonuna kadar korunmuştur. Çalışma bulguları, istenilen kalitede; fiziksel, tekstürel ve duyuşal özelliklere sahip *Bacillus* ilaveli probiyotik yumuşak jelly şekerlemelerin üretilebileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, PCR, probiyotikler, yumuşak jelly şekerleme, *in-vitro* gastrointestinal sistem dayanıklılığı.

Isolation of *Bacillus* spp. from Different Sources, Probiotic Characterization and Use in Functional Jelly Candy Production

Burcu KAHRAMAN

Department of Food Engineering

Food Engineering Programme

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Soft (jelly) candies are foods with different shapes and flavors, which are consumed by adults and especially children, obtained through the process of gelatin and gum-like substances. Recently, increasing demand for functional foods has revealed the need for products that can meet expectations. Hence probiotic *Bacillus* species isolated from different sources (soil, fish etc.) were used in the production of soft jelly candy. Firstly, Polymerase chain reaction (PCR) test was applied to *Bacillus* isolates and identification process was conducted through 16S rRNA genes. Afterwards technological and probiotic properties of isolates were determined.

The findings showed that isolated *Bacillus* species exhibit good growth properties at 30 and 40°C. Growth at 10% salt concentration showed that they can tolerate high salt concentrations. Isolates showed best growth properties between pH 6-8. It was found that the isolates do not produce gas from glucose, but all the bacterial strains could hydrolyze esculin and starch and utilize catalase. While all *B. subtilis* isolates were able to reduce nitrate, *B. coagulans* isolates were generally unable to reduce nitrate. It is observed that the best developments in bile salts of *Bacillus* strains are in media containing 0.3% and 0.5% bile salts. Isolates found to be

sensitive to the tested antibiotics. In the following stages of the study, probiotic (8,09-6,52 log cfu/g) soft jelly candy was developed by using selected species (*Bacillus coagulans*, *Bacillus clausii* and *Bacillus subtilis*). No change in their physicochemical properties observed with the use of probiotics ($p>0.05$) in comparison to the control samples. Their rheological properties did not change with probiotics addition. Jelly candies (P1, P2, EG and BB2) containing strains of *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* and *Bacillus clausii* preserved their probiotic properties for 90 days storage. These results showed that the use of probiotic *Bacillus* strains is excellent alternative for functional confectionery production.

Keywords: *Bacillus*, PCR, probiotics, soft jelly candy, *in-vitro* gastrointestinal tract durability.



1.1 Literatür Özeti

Şekerleme sektörü gelişen teknoloji ile geçmişten günümüze büyük ilerleme kaydetmiş, sanayi ölçeğinde üretim ile şekerleme ticareti ve tüketiminde büyük bir artış gözlenmiştir. Küresel şekerleme pazarı büyüklüğü 2021 yılında 298,23 milyar ABD doları olarak değerlendirilmiştir ve 2022'den 2028'e kadar %4,3' lük bir yıllık büyüme oranı sergileyerek pazarın büyümesi beklenmektedir. Jelly ve gummy şekerlemeler, şekerleme pazarında popüler ve dikkat çekici ölçüde büyüyen bir kategoridir. (Le vd., 2022). Şekerleme endüstrisi sert şekerleme, fondan, karamel, fudge, toffee, jelly, sakız gibi geniş bir ürün yelpazesine sahiptir. Yumuşak jelly şekerlemeler şekerleme sektöründe belirgin bir paya sahiptir ve yetişkinler ve özellikle çocuklar tarafından sıklıkla tüketildiği için fonksiyonel bileşenler taşıyabilmesi açısından önemli bir ürün grubudur (Hartel vd., 2018). Yumuşak jelly şekerlemeler ve sakızlar; vitamin, antioksidan, lif ve probiyotik mikroorganizmalar gibi fonksiyonel bileşenlerin taşınması için uygun gıda matrisleridir (Miranda vd., 2020; Sessler vd., 2013; Talebzadeh ve Sharifan, 2017).

Yapılan araştırmalar, tüketicilerin sağlık ve beslenme arasındaki ilişkiye daha fazla önem vermesiyle birlikte, şekerleme ürünlerinde daha sağlıklı ve fonksiyonel ürünlere yönelmenin arttığını göstermiştir (Konar vd., 2022). Fonksiyonel bileşenler arasında probiyotikler gıda sistemlerinde önemli bir yere sahiptir ve şekerleme endüstrisinde de popülerlik kazanmıştır (Bartkiene vd., 2018; Chen vd., 2008; Konar vd., 2022)

Probiyotikler, bağırsak bariyerini güçlendiren ve sindirim sisteminin ve bağışıklığın korunmasını destekleyen faydalı bakterilerdir, bu nedenle çikolata, sakız ve sakızlı şeker gibi birçok şekerleme ürününde zenginleştirici olarak kullanılmaktadır (Bartkiene vd., 2018; Chen vd., 2008; Erdem vd., 2014). Bununla birlikte, işleme ve üretim sırasında probiyotiklerin yüksek hayatta kalma oranı sergilemesi ve bilinen sağlık yararlarını elde etmek için önemli bir kriterdir. Ürünün nihai raf ömrü, tüketim sırasında yeterli sayıda canlı mikroorganizma içerecek şekilde olmalıdır.

Jelly şekerlemeler genellikle yüksek sıcaklık (>100°C) uygulamalarıyla üretilir ve jelly şekerlemelerin asitliği de yüksek seviyelerdedir. Dolayısıyla bu ürünlerde probiyotiklerin doğrudan kullanımı uygun değildir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi yaygın olarak kullanılan probiyotik bakterilerin yaşayabilirliği, üretim yöntemi ve depolama koşulları gibi çeşitli proses adımlarından olumsuz etkilenebilir (Endres vd., 2009; Mutlu vd., 2018). Ek olarak, bu bakteriler midenin yüksek asidik ortamı ve safra tuzları gibi normal fizyolojik koşullara karşı çok hassastır ve bu koşullar altında hayatta kalma oranları yaklaşık %20-40 gibi düşük değerlere sahiptir (Bezkorovainy, 2001). Bununla birlikte, *Bacillus* türleri kullanıldığında, sert koşullara dayanıklı sporları sayesinde enkapsülleme işlemine gerek kalmaz. *Bacillus* türleri arasında önemli bir grup, sağlık üzerinde yararlı etkileri olan probiyotiklerdir ve en çok çalışılanlar *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus laterosporus*'tur. Zorlu çevre koşullarına karşı dayanıklılıklarının yanı sıra gastrointestinal sistem dayanıklılıklarının yüksek olması nedeniyle son yıllarda *Bacillus* probiyotiklerinin kullanım eğilimi artmış ve alternatif üretimler için farklı gıda matrislerinde uygulamaları önerilmiştir (Cutting, 2011).

Literatür incelendiğinde, çeşitli probiyotiklerin, biyoaktif bileşenlerin, vitaminlerin vb. bugüne kadar fonksiyonel jelly şekerleme üretiminde kullanıldığı görülmektedir (Bartkiene vd., 2018; Chen vd., 2008; Miranda vd., 2020; Rivero vd., 2020; Yan vd., 2021). Bununla birlikte, yumuşak jelly şekerleme üretimine farklı türlerdeki probiyotik *Bacillus* türü sporların eklenmesini araştıran çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Şekerleme endüstrisinde fonksiyonel ürünlere olan talebi karşılamak için, probiyotik *Bacillus* içeren jelly şekerlemeleri, probiyotik taşımanın etkili bir yolu olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Özellikle son yıllarda gıda trendlerinde ve tüketicilerin gıda talebinde değişiklikler yaşanmakta ve daha sağlıklı gıdalara yönelmeler gözlemlenmektedir. Bu yönelimlerden etkilenen gıda gruplarından biri de şekerlemeler olmuştur. Yumuşak şekerlerin içerik ve üretim metotlarının geliştirilmesine yönelik çalışmaların yapılması önem arz etmektedir. Söz konusu tez çalışması yumuşak şekerleme endüstrisindeki fonksiyonel ürün arayışlarına cevap verecek niteliktedir. Bu

çerçevede gerçekleştirilen tezde, probiyotik özellikteki, sert sindirim ve çevre koşullarına dayanabilen *Bacillus* bakterileri kullanılarak, yumuşak şekerleme üretiminin gerçekleştirilmesi ve üretilen fonksiyonel yumuşak şekerlerin reolojik, fizikokimyasal, dokusal, duyusal ve mikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda bu çalışmada *Bacillus* bakterileri kullanılarak probiyotik yumuşak şekerlerin üretilmesi ile probiyotik yumuşak şekerlemelerin ticarileşmesine imkân sağlanarak fonksiyonel şekerleme üretiminde sektöre öncülük edilmesi amaçlanmıştır. Ülkemizde bu anlamda ticarileşmiş bir ürünün olmaması, üretilecek şekerlemenin sektör için bir örnek teşkil ederek ticarileşmesi durumunda ulusal ekonomiye katkı sağlayacak olması ve ayrıca çalışmanın literatürü zenginleştirecek veri sunması bu tez çalışmasının diğer önemli başlatılma amaçlarını oluşturmaktadır.

1.3 Hipotez

Tüketicilerin severek tüketebileceği, fonksiyonel besin içeriğine sahip alternatif yumuşak şekerlemelerin geliştirilmesi için probiyotik *Bacillus* türlerinin kullanılmasının fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Sert çevre koşullarına dayanıklı spor oluşturan *Bacillus* türleri kullanılarak, jelly şekerleme üretim koşullarından ve jelly gıda matrisinden (özellikle yüksek sıcaklık, yüksek asitlik gibi) etkilenmeden, raf ömrü boyunca probiyotik özelliğini koruyan, fonksiyonel özelliğe sahip, farklı formülasyonda probiyotik yumuşak şekerleme üretimi yapılabilir.

Bu tez çalışmasının, sonrasında yapılacak fonksiyonel özellikte yumuşak şekerleme üretimi çalışmalarına ışık tutması beklenmektedir. Tez çalışması sayesinde elde edilen veriler ve çıktıların, ülkemizde ticari olarak probiyotik jelly yumuşak şekerleme üretimi için yol göstermesi beklenmektedir.

Bu çalışmanın, 1505 Üniversite Sanayi İş birliği Projesi kapsamında sanayiye yönelik bir çalışma olmasından kaynaklı, probiyotik jelly üretiminin endüstriyel boyutta üretime entegrasyonu açısından ipuçları sunması beklenmektedir.

Probiyotik jelly şekerlemeler, yurt dışında gıda takviyesi anlamında değerlendirilen ürünler arasında yer almaktadır. Tez çalışması kapsamında üretilen probiyotik jelly şekerlemelerin Türk gıda endüstrisi tarafından değerlendirilip, ticarileşmesi

durumunda, ürünün ihracat potansiyeli de düşünöldüğünde, ulusal ekonomiye getiri sağlayacak olması muhtemeldir.



2 LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Şekerleme

Şekerleme, birincil bileşen olarak şeker içeren gıda ürünleri kategorisini tanımlayan genel bir terim olmakla birlikte, geniş bir tanımlama ile; glikoz ile şekerin ya da sadece şekerin pişirilme işlemi sonrası sitrik asit, tartarik asit veya potasyum bitartarat gibi maddeler eklenerek kestirme işlemine tabi tutulması sonucu elde edilen şeker hamuruna, hedef ürün çeşidine göre çeşitli hammaddeler (süt, jelatin, aromalar, kıvam arttırıcılar, yağ, renklendiriciler vd.) ilave edilerek, şekil verme işlemi sonrası elde edilen gıda maddelerine verilen isimdir (Hartel vd., 2018). Şekerlemeler için Kuzey Amerika'da "candy" terimi kullanılırken Birleşik Krallık'ta "sweet" terimi kullanılmaktadır.

2.2 Şekerleme Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

2.2.1 Glikoz ve Fruktoz

Sakkaritler üç temel yapı taşından, bir karbon zincirinden (-C-C-C), hidroksil gruplarından (-OH) ve bir aldehit (-CHO) veya keton (-CH₂COCH₂-) grubundan oluşmaktadır. Monosakkaritler için zincir uzunluğu, en basit şekerdeki üç karbondan yediye kadar değişebilmektedir.

Şekerleme endüstrisi için en önemli monosakkaritler, altı karbon (glikoz, fruktoz) içerenlerdir. Glikoz ve fruktozda bir aldehit veya keton grubunun varlığı, aldoz ve ketoz şekerleri olarak bilinen iki kategoriye ayrılmasına sebep olur. Bu iki altı karbonlu şeker arasındaki yapısal fark, glikozun bir aldehit grubu içermesi ve fruktozun bir keton grubu içermesidir.

Şekerlerdeki en önemli üç monosakkarit glikoz, fruktoz ve galatozdur, çünkü serbest aldehit grupları onların indirgen şeker olmasını sağlar ve bu nedenle esmerleşme reaksiyonlarına katılabilirler. Eski literatürde, glikoz ve fruktoz sırasıyla dekstroz ve levuloz olarak adlandırılır. Bu terimler, şeker çözeltilerinin polarize ışık düzleminde geçerken döndürüldüğü yönden kaynaklanır: glikoz ışık düzlemini sağa (dekstro) döndürür ve fruktoz ışık düzlemini sola (levulo) döndürür.

Dekstroz kelimesi, nişasta hidrolizat şuruplarının indirgenme kapasitesini tanımlayan önemli bir özellik olan dekstroz eşdeğerini (DE) tanımlamada kullanılmaktadır. Şekerleme endüstrisi, saf glikoz kullanıldığında dekstroz terimini kullanır. "Glikoz" terimi genellikle nişastanın hidrolizat ürününü tanımlamak için kullanılır, daha doğru bir şekilde nişasta hidrolizatı veya glikoz şurubu olarak adlandırılır (Stephen vd., 2006).

2.2.1.1 Glikoz / Dekstroz

Glikoz, canlıların kanı ve bitkilerin özü de dahil olmak üzere doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda en önemli polisakkaritlerden biri olan nişastada baz üniteyi oluşturur ve şekerleme tatlandırıcılarının önemli bir bileşenidir. Glikoz, dört farklı ikame grubuna bağlı asimetrik karbonlar içerir, bu da D veya L glikoz olarak adlandırılan iki izomere yol açar.

Glikoz, şekerlemelerde özellikle sakkaroz veya glikoz şuruplarının kullanılmasıyla bulunur. Bununla birlikte, zaman zaman, saf glikoz / dekstroz kullanılabilir. Ticari dekstroz, tamamen hidrolize nişasta şurubunun saflaştırılması, ardından kristalizasyon ve rafine edilmesi yoluyla elde edilir. Dekstroz farklı formlarda kristalleşir, monohidrat en yaygın kullanılanıdır. Kuruduktan sonra, kristalin dekstroz monohidrat çeşitli şekerlemelerde kullanılır. Örneğin, sıkıştırma özellikleri nedeniyle doğrudan preslenmiş tablet şekerlemelerinde sıklıkla kullanılır (Hartel vd., 2018).

2.2.1.2 Fruktoz

Şekerlemelerde en çok yer alan ketoz şekeri fruktozdur. Fruktoz, birçok meyve ve sebzede bol miktarda bulunur ve balın bir bileşenidir. İnvert şeker ve yüksek fruktozlu glikoz (mısır) şurubunun bir bileşenidir. Yakın zamana kadar, fruktoz sadece sıvı halde mevcuttu; Son yıllarda, kristalin fruktoz üretimi için süreçler geliştirilmiştir. Bununla birlikte, kristalin fruktoz çok higroskopiktir ve nem alımını önlemek için kullanımda dikkatli olunmalıdır. Fruktozun tatlandırma gücü sakarozdan 1.3 ila 1.7 kat daha fazladır ve bu nedenle aynı tatlılığı elde etmek için daha az fruktoz kullanımı yeterli olmaktadır. Ayrıca, metabolizması insülin gerektirmediğinden, fruktoz genellikle diyabetik gıdalarda uygulama alanı bulmaktadır (Uusitupa, 1994).

2.2.2 Sakkaroz

Şekerlemelerde bir dizi disakkarit kullanılır, ancak sakkaroz en yaygın olanıdır. Diğer disakkaritler ise maltoz ve laktozdur.

Sakkaroz, glikozun bir karbonu ile fruktozun iki karbonu arasındaki glikozidik bağlantı ile α -D-glikoz ve β -D-fruktoz olmak üzere iki monosakaritten oluşur. Bu bağlantı, sakkarozu indirgeyici olmayan bir şeker yapar, çünkü her bir monosakaritin indirgeyici gruplarını içerir. Bu nedenle mutarotasyon mümkün değildir; Bu nedenle, sakkaroz, ilk önce glikoz ve fruktoza hidrolize edilmedikçe (örneğin, ısı veya düşük pH ile) esmerleşme reaksiyonlarına katılamaz.

Şekerleme ürünlerinin esas tatlandırıcı hammaddesi olarak başta sakkaroz gelmektedir. Dünyadaki sakkaroz üretiminin çoğu şeker kamışı (*Saccharum officinarum*) veya şeker pancarından (*Beta vulgaris*) sağlanmaktadır. Şeker kamışı dünyanın subtropikal ve tropikal bölgelerinde yetiştirilmekteyken, şeker pancarı ılıman ve karasal iklimlerde yetiştirilmektedir. Şekerlemelerin şeker konsantrasyonunun yüksek olması mikrobiyolojik aktiviteyi engellemeleri açısından önem taşımaktadır. Standart şekerlemelerde şurup oranı %76'yı geçmektedir ve bu oranlarda şeker içeriğine sahip şekerlemelerin raf ömrü 1 yıl kadar olmaktadır. Sıcaklık yükseldikçe sakkarozun suda çözünürlük kabiliyeti artmaktadır. 20°C'de %66 oranında bir çözelti oluştururken sıcaklık 85°C'ye yükseldiğinde bu oran %80'e çıkmaktadır. Suda çözünen şeker oranının artmasına bağlı olarak kaynama noktası artmaktadır. Bu sebeple kaynama noktası şekerleme üretiminde şekerlemelerin katı madde oranının ölçüsü olarak da değerlendirilmektedir. Suda çözünen katı maddenin, şekerlemelerin nem oranının azalmasına sebep olmakta ve bu da son üründe sertlik, stabilite ve raf ömrünü arttırmaktadır. İnvert şeker ise, sakkaroz hidrolizi sonucu elde edilir ve sakkarozun 1,3 katı kadar daha tatlıdır. Sakkarozun ivertleşmesi sonucunda fruktoz ve glikozun suda çözünürlükleri sakkarozun çözünürlüğünden fazla olmaktadır. Bu nedenle sakkaroz invert şekere dönüştüğünde, miktar olarak azalırken çözünürlük arttığından, kristalizasyon azalmaktadır (Di Monaco vd., 2018; Hartel ve Hartel, 2014; Hartel vd., 2018).

2.2.3 Glikoz (Mısır) Şurubu

Şekerlemelerde kullanılan diğer önemli bir bileşen glikoz şurubudur. Çeşitli bitkilerden nişasta hidrolizi ile oluşturulan glikoz şurupları ilk olarak 1811'de Rusya'da keşfedilmiştir ve bu şuruplarda dekstrozun varlığı 1814'te doğrulanmıştır (Hull 2010). Hidrolizin derecesine bağlı olarak tatlılığa sahip nişasta hidrolizi ürünleri olan glikoz şurupları, asit, enzim veya asit ve enzim hidrolizinin bir kombinasyonu ile üretilir. Tatlandırıcılar için kimlik standardına göre, resmi adı glikoz şurubudur. Bununla birlikte, şurup belirli bir bitkinin nişastasından elde edilirse, isim nişastanın kaynağını gösterebilir, bu nedenle bazı durumlarda mısır şurubu terimi kullanılır. Hull'a (2010) göre, endüstri bir şurubu belirtmek için "glikoz" terimini kullanırken, dekstroz kristalin ürünü (yani, dekstroz monohidrat veya susuz dekstroz) belirtmek için kullanılmaktadır (Hartel vd., 2018).

Şekerlemeye, sakkarozun kristalleşme ve topaklaşmasını engellemek, nemi çekmesini azaltmak ve şekerde tatlılık ve dokuya etki etmesi amacı ile kullanılmaktadır (Hull, 2010). Glikoz şurubunun kristallenme eğilimi daha azdır ve şekerlemede kullanıldığı takdirde yumuşaklığı sağlamaktadır. Çiğnenebilir formda olan şekerleme ürünlerinde kurumayı ve kırılganlığı önlemeleri sebebi ile tercih edilirler.

Fruktoz şurubu ise daha tatlı olup glukozun enzimatik kataliz izomerasyona uğratılması ile üretilir. Yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS), mısır nişastasının ısı, kostik soda ve / veya hidroklorik asit ile işlenmesinden ve HFCS ürünleri elde etmek için enzimatik aktivite (alfa-amilaz, glukoamilaz ve glikoz izomeraz) ile dönüştürülmesinden elde edilen şekerleme sektöründe kullanılan bileşenlerdendir (Olsen, 1995). Bu izomerasyon ürünü Avrupa Birliği tarafından izoglikoz olarak adlandırılırken, Amerika'da yüksek fruktozlu mısır şurubu olarak adlandırılmaktadır. Türk Gıda Kodeksi, içeriğinde yer alan şeker oranına bağlı olarak fruktoz-glikoz şurubu ya da glikoz-fruktoz şurubu olarak adlandırmaktadır.

2.2.4 Kıvam Verici Bileşenler

Kıvam verici bileşenler yumuşak şekerlemelerde istenilen tekstürel özelliklerin elde edilmesi için oldukça önemli olan polisakkaritler ve proteinlerdir. Kıvam verici maddeler, çözeltinin jelleşme özelliklerinden sorumludur, ayrıca köpük, emülsiyon ve dispersiyon stabilitesi, şeker kristalizasyonunun oluşumunun engellenmesi gibi etkilere

sahiptir. Ayrıca bu hammaddeler koku ve tadın kontrollü salınımında da görev almaktadır. Jelly tipi şekerlemelerde en çok kullanılan hidrokolloidler jelatin, nişasta, pektin olmaktadır, ayrıca gum arabic ve agarlarda kullanılabilmektedir. Jelatin, kemiklerde, derilerde, bağ dokusunda ve hayvan derilerinde bulunan bir protein olan kollajenin ekstraksiyonu ve kısmi hidrolizi ile elde edilen bir proteindir. İki ekstraksiyon işlemi vardır: asit ekstraksiyonu Tip A jelatin üretirken, Tip B jelatin alkali ekstraksiyonu yoluyla üretilir (Erge ve Zorba, 2018; Hartel vd., 2018; Imeson, 2011).

Jelatin, Bloom derecesi olarak bilinen değerle derecelendirilir. Bloom derecesi, 17 saat boyunca 10°C'de dengelenen %6,67'lik bir jelatin çözeltisinin sertliğidir. Genel olarak, daha yüksek ortalama moleküler ağırlığa sahip jelatinler daha sıkı jeller oluşturur (daha yüksek Bloom derecesi). Jel sertliğini ifade eden bloom değeri, jel seçiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bloom değeri jelatinin mukavemetinin ve sertliğinin bir ölçüsüdür ve bileşenlerinin ortalama moleküler ağırlığını göstermektedir. Genellikle 30 ile 300 arasında değişir. <150, düşük bir bloom olarak kabul edilirken, 150–220 orta bloom derecesi ve 220–300 yüksek bloom derecesi olarak nitelendirilir. Jelatin çözeltilerinin özellikleri sıcaklık, pH, kül içeriği ve konsantrasyondan etkilenir (Hartel vd., 2018)

2.2.5 Asitlik Düzenleyiciler

Asitlik düzenleyiciler, jelly şekerlemelerde pH'ı kontrol etmek için de kullanılırlar. Şekerleme ürünlerinde en yaygın olarak kullanılan organik asitler, sitrik asit, malik asit, tartarik asit ve fumarik asitlerdir. Yumuşak şekerlemelerde en çok kullanılan asit ise sitrik asittir. Asitler şekerlemelerde, birçok işlevi yerine getirmekten sorumludur. Asitler damağı tazeler ve asit olmayan tatların donuklaşmasını önler. Şekerlemelerde lezzet etkisinin artırılmasında rol oynarlar. Çoğu ürünün lezzet profili, bir asitlendirici karışımı kullanılarak önemli ölçüde iyileştirilebilir. Karışık asitlendiriciler daha doğal bir lezzet profili oluştururlar. Asitlerin şekerlemelerdeki kullanım miktarı istenen lezzet profili ve istenen ekşilik derecesine göre değişmektedir. Asitler ayrıca kısmen pH'a atfedilebilen koruyucu bir etkiye sahiptir. Özellikle, asetik asit ve sorbik asit önemli bir koruyucu etkiye sahiptir (Hartel vd., 2018).

2.2.6 Aroma Vericiler

Hangi gıdayı tüketirsek tüketelim, gıdalar temelde renk, lezzet ve tekstür olmak üzere üç kalite özelliği ile değerlendirilir. Kullanılabilirlik ve maliyetten etkilenebilecek seçim sınırları dahilinde, tüketici en çok zevk veren ürünleri tercih etmektedir. Tüketicinin çekici görünmeyen, kötü bir kokuya sahip veya istenmeyen bir tada sahip bir ürünü seçmesi olası değildir. Tüketicinin seçim yapmasında bu üç kalite özelliğinden hangisinin en önemli olduğunu belirlemek zordur, ancak lezzetin ürün seçimi üzerinde kesinlikle önemli bir etkisi vardır.

Şekerleme sektöründe aroma vericilerin lezzete doğrudan etki etmesi sebebi ile çok önemli bir etkisi vardır. Jelly, yumuşak şekerlemelerdeki aroma maddelerinin kullanım amacı; tat algısının sağlanması ve tüketicideki gıdayı tükettiğindeki haz algısının artırılmasıdır. Aroma maddeleri genel itibarı ile uçucu bileşenler olması ve yüksek sıcaklardan etkilenmesi sebebi ile şekerleme üretimine son aşamada; hedef brikse ulaşıldıktan sonra ilave edilmektedir.

2.2.7 Renklendiriciler

Renk, tüketici tarafından algılanan kalite özellikleri arasında en önemlilerindendir. Bir gıda besleyici, güvenli ve ekonomik olabilir, ancak görsel olarak da çekici değilse, satmaz. Renklendiriciler, gıdanın çekiciliğini artırırlar. Renklendiriciler; kimyasal, doğal veya sentetik olabilmektedirler. Gıdalar boyalar veya pigmentlerle renklendirilir. Renklendiriciler, suda çözünen ve şekerlemeye renk veren kimyasallardır. Renklendiriciler, belirli dalga boylarındaki ışığı emer ve yalnızca belirli dalga boylarındaki ışığın çözeltiden geçmesine izin verir ve bu da benzersiz renkle sonuçlanır. Pigmentler, ışığın belirli dalga boylarını seçici olarak emerek ve kalan dalga boylarını yansıtarak renk veren çözünmez maddelerdir. Lake pigmenti, şekerlemelerde izin verilen tek pigment türüdür (Hartel vd., 2018).

2.2.8 Parlatma Ajanları

Parlatma ajanları gıdanın görünümünün iyileştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Buna ek olarak nem bariyeri oluşturmaktadırlar. Ayrıca şekerlemenin raf ömrünün uzatılmasına katkı sağlama ve yapışkanlığının önlenmesinde görev almaktadırlar. Şekerleme ürünlerinde en sık kullanılan parlatma ajanları karnauba vaksı ve balmumu vaksıdır (Hartel vd., 2018).

2.2.9 Su

Su, şekerleme üretiminde başlıca; şekerlerin iyi çözünme sağlaması ve tüm bileşenlerin homojen olarak karışım sağlaması amacıyla kullanılmaktadır. Su jel yapıcı maddelerle (protein ve polisakkaritler) etkileşime girerek, kıvam arttırıcı mekanizma oluşumunda da görev almaktadır. Su varlığı her gıdada olduğu gibi şekerleme üretiminde de raf ömrüne etkisi olan bir kritik maddedir. Su son ürünün nem ve su aktivitesi değerleri göz önünde bulundurularak kullanılmaktadır (Burey vd., 2009).

2.3 Şekerleme Türleri

Şekerleme ürünleri çok çeşitli olup boyut, şekil, tat, renk ve sertlik bakımından değişmektedir. Şekerleme ürünlerinin bazı tanınmış temsilcileri arasında sert şekerler, baston şeker, pamuk şekeri, sakız, gummy, lolipop, fondan, marshmallow, kaya şekeri ve tofi bulunur. Ek olarak, kakao bazlı veya çikolatalı şekerlemelerde oldukça yaygındır.

Türk Gıda Kodeksi (TGK) ise şekerleme ürünlerini; sert, yumuşak, jöle, draje, tablet, fondan, krokan, meyve, badem ezmesi ve benzeri, koz helva, nuga ve benzeri ve dolgulu şekerleme ürünleri olarak sınıflandırmıştır.

Şekerleme türleri en genel itibarı ile 2 ye ayrılır; Sert Şekerlemeler ve Yumuşak Şekerlemeler

2.3.1 Sert Şekerleme

Sert şekerlemeler, suyun büyük bir kısmının uzaklaştırıldığı (nihai nem içeriği yaklaşık %1-3) ve yeterince hızlı bir şekilde camsı geçiş sıcaklığının altına soğutulmuş konsantre bir karbonhidrat çözeltisi olarak tanımlanabilir. Sert şekerler çok çeşitli şekil, boyut ve özelliklere sahiptir. Mevcut tat çeşitliliğinin yanı sıra, sert şekerlerdeki farklılıklar, kullanılan bileşenlerden (formülasyon) veya ürünü şekillendirmek ve biçimlendirmek için kullanılan işleme adımlarından kaynaklanır. Sert şekerler çok çeşitli formlarda ve şekillerde bulunsa da, hepsi temelde aynı şekilde yapılır. Sert şeker yapmak için şeker şurubu, sıcaklık "sert çatlak" (146–154°C) durumuna ulaşana kadar suyu çıkarmak için kaynatılır. Bu sıcaklıklarda su içeriği düşüktür (%1-3) ve şeker şurubunun viskozitesi oldukça yüksektir. Bu sıcaklıktaki şurup soğuk suya atıldığında hemen katılaşarak sert ve kırılgan bir

camsı yapıya dönüşür. Vakumlu pişirme olmadığında 146°C'yi aşan sıcaklıklar kullanılmalıdır. Vakumlu pişirme, pişirilmiş şeker kütlelerinde istenen özellikleri koruyabilen (daha az renk oluşumu ve süktroz inversiyonu) düşük sıcaklıklarda istenen su içeriğini verir. Renkler, tatlar ve asitler dahil olmak üzere uçucu, hassas veya reaktif bileşenler, sakaroz inversiyonunu veya tat bozulmasını ve kaybını en aza indirmek için pişirmeden sonra eklenir. Pişmiş şeker kütlesi, bitmiş şekle soğuması için doğrudan bir kalıba bırakılabilir veya sert bir duruma ulaştığı bir ara sıcaklığa soğutulabilir. Bu durumda, şeker kütlesi, istenen şekli oluşturmak için kolayca işlenebilir. Viskozite uygun şekilde yüksekse, şeker kütlesi istenen şekli oda sıcaklığına soğutulabilecek kadar yeterince uzun süre korur (Hartel vd., 2018).

2.3.2 Yumuşak Şekerleme

Yumuşak şekerlemeler, şekerleme sektöründe önemli bir paya sahiptir. Yumuşak şekerlemelerin başlıca özelliği kendilerine özgü yapı özelliklerini sağlamaları için, üretimlerinde kıvamlaştırıcı ve jelleştirici ajanların kullanılmasıdır. Yumuşak şekerlemeler nispeten yüksek nem içerikli, şeker şurubu tutmak için ağ sağlayan bir hidrokolloide (bazen stabilizatör olarak adlandırılır) dayanan bir şekerleme sınıfıdır. Hidrokolloid jel ayrıca görünümü, lezzet salınımını ve tekstürel özellikleri de etkiler.

Fudge, karamel, toffee, fondan ve jelly tipi şekerlemelerde yumuşak şekerlemeler sınıfı içerisinde yer almaktadır.

- **Fudge**

Fudge, yüksek tanecik içerikli karamel olarak tanımlanan yaklaşık %25 %30 şeker kristali içeriğine sahip şekerleme türüdür. Aşırı doymuş şeker çözeltisi kristallendirilerek fudge elde edilmektedir.

- **Karamel**

Karamel, süt ve süt bileşenleri kullanılarak elde edilen şekerleme türüdür. Karamel üretiminde süt içeriği %4 ile %18 arasında değişmekle birlikte bu oranlara bağlı olarak değişik tekstürlerde şekerlemeler elde edilmektedir.

- **Fondan**

Fondan, çok sayıda küçük kristal şeker ve doymuş şeker şurubu içeren, kısmen katı bir yapıya sahip bir şekerleme ürünüdür.

- **Toffee**

Temel olarak sakkaroz ve tereyağı içeren şekerleme türüdür.

- **Jelly tipi şekerleme**

Jelleştirici ajan olarak genellikle jelatin kullanılmakla birlikte, pektin veya nişasta kullanılarak elde edilen şekerlemelerdir. İçeriğinde ayrıca şeker, glikoz (mısır) şurubu, asitlendiriciler, aroma vericiler, parlatma ajanları ve renklendiriciler yer almaktadır. Bileşenlerin belirli bir sıcaklıkta pişirilmesi ve kuru maddenin (briks) ayarlanması süreçlerine dayanarak elde edilen şekerleme ürünüdür.

2.4 Fonksiyonel Şekerleme Üretimi

Özellikle son yıllarda gıda trendlerinde ve tüketicilerin gıda talebinde değişiklikler yaşanmakta ve daha sağlıklı gıdalara yönelmeler gözlemlenmektedir. Bu yönelimlerden etkilenen gıda gruplarından biri de şekerlemeler olmuştur. Jeli şekerlemelerin her yaş grubundan kişiler tarafından oldukça sevilmesine rağmen, glisemik indeksinin fazla olması ve yüksek kalori alınımı ile ilişkilendirilmeleri sebebiyle tercih edilmesinde azalma meydana gelmekte olup, fazla tüketimi bazı olumsuz sonuçları doğurmaktadır. Bu bakımdan jeli şekerlerin içerik ve üretim metotlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılması önem arz etmektedir.

Fonksiyonel şekerleme üretimlerine yönelik yapılan çalışmalar aşağıda listelenmiştir.

Bartkiene ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada sığır sütü, esansiyel yağlar ve laktik asit bakterileri kombinasyonları kullanılarak gummy şekerlerin antimikrobiyal özelliklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, probiyotik ve prebiyotiklerle zenginleştirilmiş sakızlı takviyelerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu üzerinde çalışılmış, *Lactobacillus plantarum* LUHS135 ve *L. paracasei* LUHS244 bakteri suşları ve prebiyotik kaynağı olarak ise elma posası kullanarak üretilen sakızlı takviyelerin, canlı bakteri sayımlarını, fenolik bileşik içeriğini, antioksidan aktivitelerini, renk özelliklerini, doku parametrelerini değerlendirilmiş ve kullanılan laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal özellikleri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan kombinasyonun patojen mikroorganizmalara karşı önemli etki gösterdiği bildirilmiştir (Bartkiene vd., 2018).

Çağlar ve arkadaşlarının çalışmasında ise 4 farklı grup üzerinde çalışma yapılmış (A: probiyotik sakız, B: xylitol sakız, C: probiyotik-xylitol, D: plasebo sakız) ve 3 hafta boyunca günlük yemekler sonrası denemeler yapılmıştır. A grubu ve B grubunda yer alan çalışma sonrası tükürükte yer alan çürüğe sebep olan muhtemel bir bileşenin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Bu anlamda probiyotik kullanmanın avantajı belirtilerek, florayı bozmadan katkı sağladığı olduğu görülmüştür (Çağlar vd., 2007).

Ayrıca sakız, gummy, jelly gibi şekerleme ürünlerinin yanında, probiyotik mikroorganizmaların şekerlemelerde olduğu gibi doğrudan ağıza etki eden dış macunu ürünlerde de kullanılarak ağız içi mikrobiyotaya olan desteğinin ve zararlı mikroorganizmalara karşı olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur (Maden vd., 2018).

Başka bir çalışmada ise mikrokapsülleme tekniği ile probiyotik jelly reçel uygulanabilirliği araştırılmıştır. Serbest bakteri, aljinat tanecikleri ve kitosan kaplı olmak üzere üç tür reçel geliştirilmiş ve farklı sıcaklıklarda depolanmıştır. Jölelerin fiziksel ve organoleptik özelliklerinin yanı sıra bakterilerin canlı kalması ve gastrointestinal direnci araştırılmıştır. Bulgular, kapsüllenmiş probiyotiklerin, düşük bulanıklık ve yüksek sıcaklıklara karşı, maksimum duyuşal özelliklerle korunduğunu göstermiştir. Ayrıca, kitosan kaplı mikrokapsüllerin, gastrointestinal sistemde fiziksel stabiliteyi ve metabolik aktiviteyi arttırdığı görülmüştür (Talebzadeh ve Sharifan, 2017).

Başka bir çalışmada ise probiyotik *Bacillus indicus* HU36 ve diyet lifi (maltodekstrin ve limon lifi) ilavesinin bitter çikolatanın renk ve organoleptik kalite özellikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *B. indicus* HU36 numunelerde %88 ile 91 arasında sağkalım göstermiştir. Bakteriler ve diyet lifi ilavesinin, ürünün duyuşal ve renk özellikleri üzerinde olumsuz bir etki göstermediği tespit edilirken, diyet lifi ilavesinin bazı duyuşal özellikleri olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir (Erdem vd., 2014).

Başka bir çalışmada ise *Bacillus coagulans* GBI-30 6086 kullanılarak fonksiyonel jelly şekerleme geliştirilmiş ve geliştirilen ürün raf ömrü boyunca probiyotik özelliğini korumuştur (Miranda vd., 2020).

2.5 Probiyotikler

Probiyotikler yeterli miktarlarda alındığında konakçıya sağlık yararı sağlayabilen canlı mikroorganizmalardır. Besinlerle birlikte veya ayrı olarak alınan, mukozal ve sistemik immünitelyi düzenleyerek, bağırsaklarda besinsel ve mikrobiyal dengeyi sağlayarak konakçının sağlığını olumlu yönde etkileyen bu canlı mikroorganizmalara "probiyotik" adı verilir. "Pro" ve "biota" olmak üzere iki kısımdan oluşan bu terim "for life" (yaşam için) anlamını taşımakta olup, antibiyotik teriminin anlamca karşıtıdır (Gasbarrini vd., 2016).

Probiyotik kavramı ilk kez XIX. yüzyılın başlarında Nobel ödülü sahibi Elie Metchnikoff tarafından gündeme getirilmiştir. Metchnikoff, Bulgar köylülerinin uzun yaşamlarının fazlaca fermente süt ürünü tüketmelerine bağlı olduğunu belirtmiştir (Fuller, 2012) .

Probiyotik mikroorganizmalar, patojen ve toksijenik olmama, insan kaynaklı olma, mide asidi ve safraya dirençli olma, bağırsak hücre epiteline tutunabilme, gastrointestinal sistemde geçici olarak kolonize olabilme, doğal flora ya adapte olabilme, antimikrobiyal özellikte salgı yapabilme ve konakçının sağlığına olumlu katkı yapabilme gibi özelliklere sahip olmalıdır. Probiyotikler, patojen mikroorganizmaların inhibe edilmesini veya ortadan kaldırmasını birçok mekanizma veya yolla gerçekleştirmektedir. Bunlar; Laktik asit üreterek lümenin pH'sını düşürmek, antimikrobiyal mikrosin, hidrojen peroksit ve serbest radikaller üretmek, reseptörlere tutunarak ve besin kaynakları için rekabet etmek, koruyucu münin oluşumunu uyarmak, sekretuar IgA yapımını uyarmaktır (Bezkorovainy, 2001).

2.6 *Bacillus*

Bacillus cinsi, heterotrofik gelişme veya nadiren ototrofik gelişme için geniş bir karbon kaynağı yelpazesini kullanan, aerobik, spor oluşturan Gram-pozitif bakteri grubunu içermektedir. Bazıları yeni moleküler biyoloji verilerine dayanarak yeniden sınıflandırılmış olan 200'den fazla türden oluşur (Logan ve De Vos, 2009). *Bacillus* cinsinin tarihi 1835'te Ehrenberg'in bir bakteriyi "*Vibrio subtilis*" olarak adlandırmasına dayanmaktadır. Daha sonra 1872 yılında bu bakteri Cohn tarafından "*Bacillus subtilis*" olarak adlandırılmıştır (Gordon vd., 1973).

2.6.1 Habitat, Çeşitlilik, Metabolizma ve Taksonomi

Bacillus türleri Gram-pozitif, aerobik veya fakültatif anaerobik, endospor oluşturan bakterilerdir, peritrik olarak kamçılıdır ve elipsoidal veya küresel endosporlar oluştururlar.

Çoğunlukla katalaz-pozitifdir. Çevrede her yerde; toprak (yaygın habitatı), su, tortu, toz veya havada bulunabilirler (Jensen vd., 2003; Logan, N A., De Vos, P. A. U. L., 2009). Ayrıca hayvanlarda, hayvan yataklarında, gıdalarda (süt ürünleri, etler, bebek maması, pirinç yemekleri, sebzeler, baharatlar ve tahıllar), yem maddelerinde, mera, yiyecek işleme ekipmanı, nakliye gemileri dahil birçok yerde bulunabilirler. Kimyasal ve fiziksel etkenlere karşı spor oluşturma yetenekleriyle karakterize edilirler. Ayrıca, her yerde bulunmaları ve bazı *Bacillus* üyelerinin (*B. anthracis* gibi) patojenlikleri, bu cins hakkında çok önceden başlayan ilginin, şimdiye kadarda devam etmesinde oldukça etkili olmuştur. *Bacillus* grubu fenotipik ve genotipik olarak heterojen ve çok yönlüdür; bu, çeşitli ekolojik nişlerin hayatta kalması ve kolonizasyonu ile ilişkili çok çeşitli fizyolojik özelliklerde dahil olmak üzere, önemli fizyolojik çeşitliliklerinde yansıtılmaktadır. Bu nedenle, metabolizmaya dahil olan belirli genlerin varlığı veya yokluğu, bir suşun nişini ortaya koymada çok önemlidir.

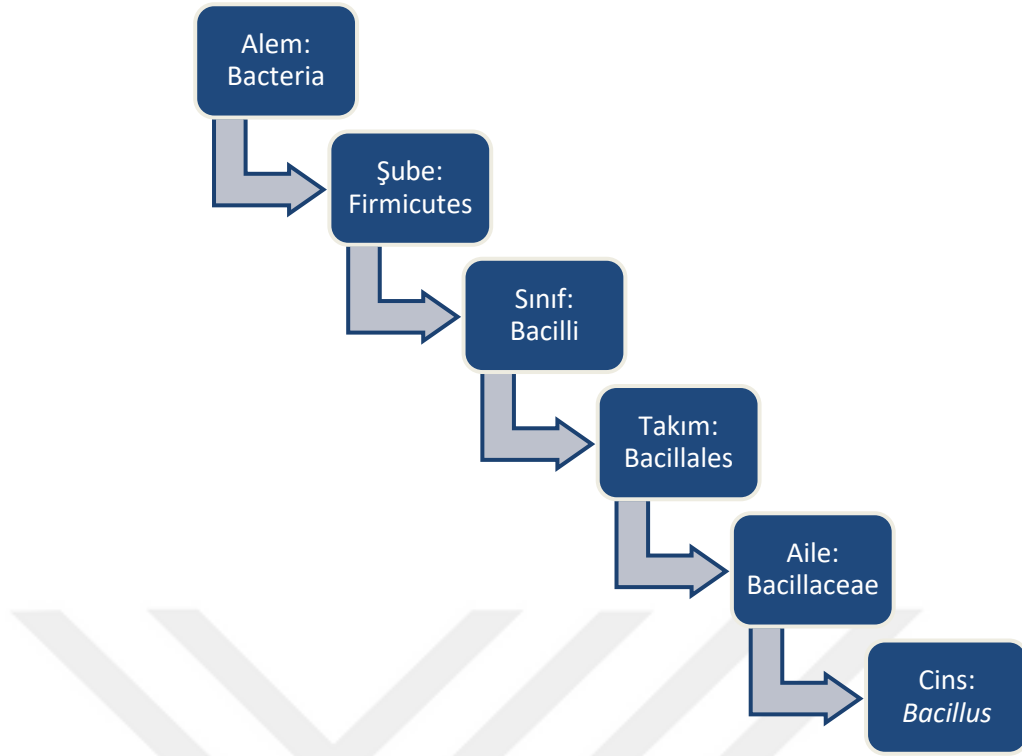
Bu özellikler arasında bitki ve hayvan kaynaklarından (selüloz, nişasta, pektin, proteinler, agar, hidrokarbonlar ve diğerleri) türetilen çoğu substratın degradesasyonu, antimikrobiyal maddelerin üretimi (antibiyotikler ve bakteriyosinler), nitrifikasyon, denitrifikasyon, azot (N) fiksasyonu, fakültatif anaerobiyoz, fakültatif litografi, ototrofi, heterotrofi, asidofil (pH 1.5'e kadar gelişme), nötrofil, alkalifil (pH 11'e kadar gelişme), psikrofil (-5°C'ye kadar gelişme), termofil (78°C'ye kadar gelişme), halofil ve parazitizm bulunmaktadır. Fenotipik özelliklerde bu heterojenlik için *Bacillus* üyeleri son derece geniş bir beslenme gereksinimi, gelişme koşulları, metabolik çeşitlilik ve DNA baz kompozisyonu sergiler. Bununla birlikte, bu cinsi tanımlayan temel özellikler endosporları ve Gram-pozitif hücre duvarını oluşturma kapasitesidir.

Bacillus türlerinin farklı habitatlardaki geniş dağılımı, vejetatif organizmalardan daha uzun süre herhangi bir habitatta hayatta kalabilen sporlarının olağanüstü dayanıklılığı ve dormansi durumundan kaynaklanmaktadır. Her ne kadar, az sayıda

Bacillus türü primer enfeksiyonlarla fazla veya az oranda ilişkili olsa da, önemli bir sayı, klinik veya sağlık açısından önem taşımaktadır. *Bacillus anthracis* ve *B. cereus* tıbbi öneme sahip iki ana türdür. *Bacillus anthracis*, şarbonun etken maddesidir. Toksin üretimi (emetik ve ishal) ile gıda zehirlenmesine neden olan *B. cereus* ise ayrıca; sepsis, menenjit ve diğer ciddi sistemik enfeksiyonlar gibi enfeksiyonlarda özellikle erken doğmuş bebekler de dahil olmak üzere immün sistemi baskılanmış hastalarda diğer türlerle birlikte etkili olmaktadır (Bottone, 2010; Hilliard vd., 2003).

Bu gibi etkilerinin yanında *Bacillus* türleri içerisinde önemli bir grubu ise sağlığa faydalı etki gösteren probiyotikler oluşturmaktadır. Probiyotik *Bacillus*'ları içeren gıdalar ve yemler, genellikle; insanlar için besin takviyesi, hayvanlar için büyümeyi teşvik edici, su ürünleri için ise büyüme düzenleyici veya hastalıklara karşı direnç sağlayıcı olarak kullanılmaktadır (Cutting, 2011).

Bacillus türleri arasında ayırım yapmak zordur ve bu çok fazla sayıda fenotipik test gerektirir. Fenotipik özelliklere dayanarak, bazen yakından ilişkili türler ayırt edilebilirken, diğer durumlarda sadece tek bir özellik belirli bir türü ayırt edebilir. 16S rDNA analizi gibi moleküler metotlar, türlerin tanımlanması için daha güvenilirdir (Drancourt vd., 2000). Bununla birlikte, *Bacillus* cinsinin genetik olarak, tek bir cins için genellikle makul olandan çok daha geniş olan yaklaşık %32 ile %66 mol arasında değişen G + C DNA baz oranları ile oldukça heterojen olduğu kanıtlanabilmektedir. DNA'nın % mol G + C içeriğindeki bu çeşitlilik sadece türler arasında değil, aynı zamanda tek bir türün alt türleri içinde de tespit edilir. Cinsin ilk etkin organizasyonu, 1960'larda ve 1970'lerde Gordon ve arkadaşları tarafından gerçekleştirildi (Gordon vd., 1973; Smith vd., 1952). *Bacillus* cinsi, son yıllarda, DNA-DNA hibridizasyonu ve 16S rRNA gen dizisi karşılaştırması gibi modern taksonomik yöntemler kullanılarak bu cins içindeki suşların ve türlerin yeniden sınıflandırılmasına ve yeniden düzenlenmesine yol açan çok çeşitli taksonomik düzenlemelere tabi tutulmuştur. Yüksek dereceli DNA-DNA ilişkisi, yüksek rRNA gen benzerliği ve *B. cereus* grubunun ayırt edilemez 16S-23S rRNA intergenik aralayıcıları gibi genotipik özellikler temelinde birkaç *Bacillus* grubu bildirilmiştir. Diğer sınıflandırmalarda gruplar, gelişme koşulları, metabolizma, spor şekli vb. gibi diğer fenotipik özelliklere göre düzenlenmiştir.



Şekil 2.1 *Bacillus* cinsi taksonomi (Elshaghabee vd., 2017)

2.6.2 *Bacillus* Türlerinin Probiyotik Olarak Kullanılması

Bacillus türleri yaklaşık 70 yıldır tıbbi destek ürünü olarak kullanıyor olmasına rağmen bu konudaki bilimsel çalışmalar yaklaşık olarak son 30 yıldır yoğun olarak yapılmaktadır. Enterogermina olarak bilinen İtalyan ürünü ilk kez, 1958'de İtalya'da ilaç takviyesi olarak tescil edilmiştir. Üzerinde en çok çalışılan *Bacillus* türleri; *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus laterosporus*'tur. Bilinen *Bacillus* türleri arasında patojen olmayan birkaç türün (*B. coagulans* ve *B. subtilis*), probiyotik olarak kullanımı ile insan tüketimi için uygun olduğu belirtilmiştir (Nithya ve Halami, 2013; Urdaci vd., 2004).

Isıya karşı dayanıklı olan sporların olması, *Lactobacillus* spp. gibi diğer sporsuz bakterilere göre ürünün canlılık üzerinde zararlı bir etkisi olmadan, özel bir biçimde oda sıcaklığında saklanabilmesi gibi birçok avantaja sahiptir. İkinci bir avantaj ise, sporların mide bariyerinin çok düşük pH'ında bile canlılığını koruyabilmesidir (Barbosa vd., 2005; Spinoso vd., 2000). Bu sayede, prensip olarak, belirli bir spor dozu, soğutma olmaksızın depolanabilir ve mideye ulaşan bakteri dozunun tamamı, yine aynı şekilde ince bağırsağa da bozulmadan ulaşabilir.

Bacillus türleri, genellikle topraktan izole edilebilecek sporlar olduğundan toprak organizmaları olarak kabul edilir. Ancak son dönemlerde yapılan bazı çalışmalarda *Bacillus* türlerinin sadece toprak kökenli olmadığı ve sporları aracılığıyla birçok ortamda canlılığını sürdürebileceği gösterilmiş, sindirim yoluyla *Bacillus* sporlarını alan hayvanların gastrointestinal sistem koşullarında bu bakterilerin canlılığını sürdürebiliyor olması nedeniyle *Bacillus*'ların şu ana kadar keşfedilmemiş gastrointestinal sistem kommensali olabileceği öne sürülmüştür.

Hatta bu çalışmalarda toprak kökenli olarak bilinen *Bacillus* türlerine ait sporların sanılanın aksine, toprağa gaita aracılığı ile bulaştığına yönelik bilgiler mevcuttur.

Birçok çalışma, sporların, fare modellerinin gastrointestinal kanalında güçlü immün tepkiler ortaya çıkarabildiğini ve bu immün uyarmanın, sporların probiyotik bir etki göstermesinin altında yatan sebep olabileceğini göstermiştir. Konu ile ilgili bilgilendirici çalışmalardan biri, oral yoldan verilen bakterilerin, bebek tavşanlarda bağırsakla ilişkili lenfoid doku gelişimi üzerindeki etkisini inceleyen bir araştırma olmuştur (Rhee vd., 2004). Bu çalışmalarda *B. subtilis*'in, lenfoid doku gelişiminde diğer kommensal bakterilere göre daha önemli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Coagulin, Amicoumacin ve Subtilisin gibi antimikrobiyallerin salgılanması gibi başka özelliklerde, enterik patojenlerin yanı sıra rakip mikroorganizmaların gelişmesini baskılayarak probiyotik bir etki sağlamaktadır.

Bunun yanında farklı çalışmalarda ise kanatlı hayvan modelinde *B. subtilis* sporlarının patojenik *S. enterica*, *C. perfringens* ve *E. coli* enfeksiyonunu baskıladığı gösterilmiştir (La Ragione vd., 2001; La Ragione ve Woodward, 2003).

Bacillus türlerinin intestinal sistemde probiyotik etki göstermesine vejetatif hücrelerin mi yoksa sporların mı aracılık ettiği tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak her iki biyolojik formun ayrı ayrı ya da birlikte etkili olabileceğini gösterir yönde çalışmalar mevcuttur. *Bacillus* türleri probiyotik etkiyi temel olarak, metabolik aktiviteleri sonucu salgıladıkları biyoaktif bileşikler aracılığıyla ve bağışıklık sistemini uyarma yoluyla göstermektedir. Probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistemdeki patojen mikroorganizmaları engellemedeki birincil mekanizmasının antimikrobiyal madde üretimi olduğu düşünülmektedir (Hong vd., 2005). *Bacillus* türlerinin 45'ten fazla antimikrobiyal madde ürettiği bildirilmiştir. Bunların bir kısmı klinik önem taşıırken; bir kısmı gıdaların üretiminde, bir kısmı

da bitki hastalıklarının kontrol edilmesinde kullanılmaktadır. Bu antimikrobiyal maddeler; ribozomal olarak sentezlenen, protein yapısındaki bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri maddeler ile enzimatik olarak sentezlenen küçük peptidler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Baruzzi vd., 2011). *Bacillus* türlerinin ürettiği bakteriyosinler, Gram pozitif ve negatif bakterilerden maya ve küflere kadar geniş bir inhibisyon alanına sahiptir. Bakteriyosin üreten *Bacillus* türlerinin, insanlar için probiyotik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Abriouel vd., 2011) *B. coagulans* tarafından üretilen ve bakteriyosin benzeri madde olan koagulinin; *Enterococcus*, *Listeria*, *Leuconostoc* gibi Gram pozitif bazı patojenlere, *B. clausii*'nin ürettiği antimikrobiyal maddelerin de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* ve *C. difficile*'e karşı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Hyronimus vd., 1998; Urdaci vd., 2004). *Bacillus* türleri, antimikrobiyal maddelerin yanı sıra salgıladıkları vitamin ve enzimler aracılığı ile de yararlı etki sağlayabilmektedir (Sanders vd., 2003)

3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Balık ve Toprak Örneklerinin Temini ve Bakteri İzolasyonu

Bacillus izolasyonu için toprak ve balık kaynak olarak düşünülerek numuneler alınmıştır (Şekil 3.1). Bu amaçla toprak numuneleri için; toprağın üst yüzeyi temizlendikten sonra steril bir spatula ile yaklaşık 4-5 cm derinlikten 50'şer gram olacak şekilde Edirne, Kırklareli ve İstanbul'un çeşitli bölgelerinden pH değerleri 6,65 ile 9,08 arasında değişen, 11 adet farklı toprak örnekleri alınarak steril plastik poşetler içerisine konulmuştur. Balık örnekleri için ise; 4 çipura, 1 somon ve 4 levrek olmak üzere toplamda 9 farklı balığın bağırsak örneklerinden 10'ar gram alınarak steril plastik poşetler içerisine konulmuş ve örnekler kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Bunlara ek olarak piyasada satılan probiyotik *Bacillus clausii* içeren takviye edici gıda olan Enterogermina® Kids, *Bacillus coagulans* içeren Digestive Advantage, Schiff® ve *Bacillus coagulans* ile *Bacillus subtilis* içeren Trunature® Digestive Probiotic Gummies ürünleri (Şekil 3.2) temin edilerek analizlere tabi tutulmuştur.



Şekil 3.1 Balık ve toprak örnekleri

gerçekleştirilmiştir. Diğer özellikleri tanımlanmak üzere gliserol ilave edilmiş kriyo tüplerinde -80°C’de stoklanarak muhafaza edilmiştir.

3.2.1 Gram Boyama

Gram boyama işlemi için preparat hazırlandıktan sonra kurutulup tespit edilmiştir. Kristal violet solüsyonu ile 2-3 dakika boyanmış daha sonra boya dökülerek yıkanmıştır. Preparat üzerine lugol solüsyonu konarak 1-2 dakika beklenmiş ve boya alkolle yıkanmıştır. Preparat son aşamada safranin ile 5-10 saniye boyanmış ve saf su ile yıkanmıştır. Örneklerin kuruması beklenmiş ve immersiyon yağı kullanılarak mikroskopta incelenmiştir. Bu yöntem ile, mor renge boyanan mikroorganizmalar Gram pozitif ve pembe olanlar ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2 Spor Boyama

Spor boyama işlemi için preparat hazırlanıp, kurutulup tespit edilmiştir. Malaşit yeşili (%5) solüsyonu ile, alttan ısıtılarak 7 dakika boyanmıştır. Su ile yıkanmış ve safranin (%0,5) ile 30 saniye boyanmıştır. Su ile yıkanıp kurutulduktan sonra immersiyon yağı ilavesiyle mikroskopta incelenmiştir. Sporlar yeşil ve basiller ise kırmızı-pembe renkte görülmüştür.

3.2.3 Katalaz Testi

Katı besiyerinde üremiş olan mikroorganizma kolonilerinden platin öze yardımı ile yeterli miktarda alınarak temiz bir lamin üzerine konulmuş ve %30’luk hidrojen peroksitten bir damla damlatılmıştır. Hidrojen peroksit ilavesinden sonra kabarcıkların görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

3.3 Genomik DNA İzolasyonu, İzolatların Moleküler Yöntemlerle Gruplandırılması ve Tanımlanması

Genomik DNA izolasyonu “Ecospin Bacterial Genomic DNA Kit” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle *Bacillus* türlerine özgü primerler yardımıyla izolatların *Bacillus* türü olup olmadıkları tespit edilmiş ve takiben 16S rRNA genleri yoluyla tanımlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan PCR karışımı ve program şartları Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1 PCR karışım bileşenleri

PCR karışımı	Miktar
Su	37,875 µL
5x Tampon	5 µL
dNTP	4 µL
Primer 1	1 µL
Primer 2	1 µL
GoTaq	0,125 µL
Şablon (DNA)	1 µL
	Toplam =50 µL

Tablo 3.2 PCR program şartları

Sıcaklık	Süre
95°C	2dk
95°C	30s
53°C	60s
72°C	30s
×20 döngü	
72°C	5dk

Genomik DNA'ları izole edilen bakteriyal izolatların 16S rRNA dizileri Bsub5F 5' AAGTCGAGCGGACAGATGG-3'-19bp Bsub3R 5' CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC-3'-22bp ve AMP_F 5'- GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG Tm 60.5, AMP_R 5'- AAGGAGGTGATCCARCCGCA 50 µL Tm 68.9 primer dizileri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır.

Çoğaltma işlemi 200 µL'lik tüplerde "Bio-Rad Thermal Cycler" da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µL'si 0,5 µg/mL etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Dizi analizi Medsantek, Türkiye firmasından hizmet alınarak gerçekleştirilmiştir. Benzerlik araştırması (GenBank/EMBL/DDBJ) Basic Local

Alignment Search Tools (Blast) programı referans veritabanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Altschul vd., 1990).

Ayrıca izolatların tür ve suş bazında tanımlanmasının yapılması için RAPD PCR (randomly amplified polymorphic DNA) tekniği uygulanmış ve primer olarak (GTG)₅ primeri (5'- GTGGTGGTGGTGGTG-3') kullanılmıştır. PCR işleminde kullanılan süre ve sıcaklık döngüsü; 94°C'de 1 dk (ayrılma), 40°C'de 60 s (bağlanma) ve 72°C'de 8 dk (uzama) şeklindedir. PCR karışımı toplam 13 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışımdan 5 µL alınarak %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme işlemi 3 saat boyunca uygulanmıştır. Yürütme sonrasında UV ışık altında izolatların fingerprintleri kaydedilmiş ve benzer suşlar tespit edilmiştir. Oluşturulan her benzer gruptan bir adet temsili örnek sekans analizi için kullanılmıştır (Vasdinyei ve Deák, 2003).

3.4 İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

3.4.1 Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme

İzolatların farklı oranlarda NaCl içeren ortamlarda gelişmelerini belirlemek amacıyla örnekler, %2, %5, %7 ve %10 oranlarında NaCl içeren 4 ml nutrient sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. 30°C'de 48 saat 200 g'de inkübasyondan sonra izolatların gelişmeleri değerlendirilmiştir.

3.4.2 Farklı Sıcaklık Derecelerinde Gelişme

İzolatların farklı sıcaklık derecelerinde gelişmelerini gözlemlemek için örnekler, 4 mL nutrient sıvı besiyerine inoküle edilerek 5°C, 30°C, 40°C ve 65°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda besiyerinde izolatların gelişmeleri değerlendirilmiştir.

3.4.3 Farklı pH Derecelerinde Gelişme

Mikroorganizma gelişimini etkileyen fiziksel etkenlerden pH (5-12) etkisini araştırmak için *Bacillus* kolonileri ayrı ayrı 5 mL 'lik NB besiyerine inokule edilerek 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve izolatların gelişmeleri değerlendirilmiştir.

3.4.4 Lesitin Hidroliz Testi

Lesitin hidrolizi testi için ilk olarak besiyeri hazırlanmıştır. Bir adet yumurta, steril su ile yıkanmış, etil alkolde 3 saat bekletilmiş ve alevden geçirildikten sonra, sarısı ayrııştırılarak serum fizyolojik ile homojenize edilmiştir. Elde edilen emülsiyon, steril edildikten sonra 50°C'ye soğutulmuş nutrient agar besiyerine %10 oranında ilave edilmiştir (Mac Faddin, 2000). Yumurta sarısı ile hazırlanmış besiyerine çizgi metodu ile bakteri ekimi yapılarak, 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Bakteri lesitinaz üretmişse üreme hattı çevresinde görülen opaklaşma pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Hayward, 1941).

3.4.5 Hemoliz Testi

Her izolat, %5 koyun kanlı agar içeren agar üzerine yayılmış ve hemoliz üretim modellerini tespit etmek için 37°C'de 24 ile 48 saat sureyle inkübe edilmiştir. Petriler, a-hemoliz, β -hemoliz veya γ -hemoz (hemolitik olmayan) özellikler açısından incelenmiştir.

3.4.6 Nişasta Hidroliz Testi

%1 nişasta içeren besiyerine çizgi şeklinde ekim yapılmış ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kültür içeren petri kaplarına direkt olarak iyot çözeltisi dökülmüş ve 5 dakika bekletilmiştir. Nişastanın hidrolize olduğu alanlar renksiz, diğer alanlar mavi renkli görülmüştür (Koneman, Allen, Janda, 1997).

3.4.7 Glukozdan Gaz Oluşumu

İçinde %1 oranında glukoz içeren durham tüplü steril nutrient broth besiyeri hazırlanarak içerisine iyi üremiş saf kültürlerden tek koloni inoküle edilerek 37 °C'de 1 – 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler her gün sabah-akşam, gaz oluşumu önünden incelenerek, kontrollerle birlikte gözle değerlendirilmiştir.

3.5 *Bacillus* İzolatlarının Probiyotik Potansiyeli İçin *in-vitro* Testler

3.5.1 Safra Toleransı

Safra tuzu varlığında gelişme, Nithya ve Halami (2013) tarafından uygulanan metodun modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. 37°C'de 24-48 saat inkübe edilen test kültürleri, 3.000 rpm'de 10 dakika boyunca 4°C'de santrifüjlenerek ve

toplanan pellet, aynı hacimde salin (%0,85 NaCl) içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Safra tuzu içermeyen taze kültür (kontrol) ve %0,3, %0,5, %1 ve %2 (a/h) safra tuzu içeren kültürler %1 hücre süspansiyonu ile aşılanmıştır. Gelişme Spektrofotometre kullanılarak 650 nm'de ölçülerek izlenmiştir.

3.5.2 Hücre Yüzeyi Hidrofobikliği Analizi

İzolatların hidrofobiklik derecesi, hücrelerin organik çözücülere yapışmasına prensibine dayanan test metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla taze kültürler, hücre ayrılması için 5 dakika 6.000 g'de santrifüjlenerek, pellet yıkanmış ve 5 mL %0,85 NaCl çözeltisi içinde yeniden süspanse edilmiştir. Sulu fazın A0 olarak 600 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Hücre süspansiyonu daha sonra organik çözücü olarak kloroform ile 1 dakika boyunca vortekslenerek iyice karıştırılmış ve 37°C'de 30 dakika faz ayrılması için beklenmiştir. Daha sonra 600 nm'de absorbans tekrar ölçülmüş ve A1 olarak kaydedilmiştir. Hidrofobiklik aşağıda yer alan formüle (3.1) göre hesaplanmıştır.

$$\%Hidrofobiklik = (1 - A1/A0) \times 100 \quad (3.1)$$

3.5.3 Otoagregasyon Analizi

İzolatların otoagregasyon derecesini belirlemek amacıyla taze kültürler, hücre ayrılması için 5 dakika 6.000 g'de santrifüjlenerek, pellet yıkanmış ve 5 mL %0,85 NaCl çözeltisi içinde yeniden süspanse edilmiştir. Sulu fazın A0 olarak 600 nm'de absorbansı ölçülmüştür. 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılan kültürlerin absorbansı (A1) tekrar ölçülerek kaydedilmiştir. Otoagregasyon aşağıda yer alan formüle (3.2) göre hesaplanmıştır.

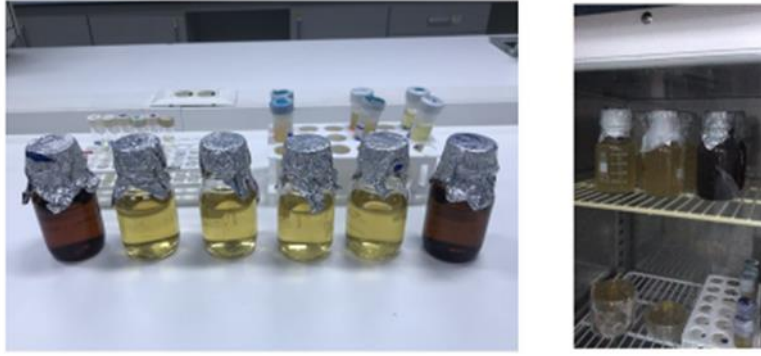
$$\%Otoagregasyon = (A0 - A1)/A0 \times 100 \quad (3.2)$$

3.5.4 Antibiyotik Duyarlılık Testi

Bacillus suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, disk difüzyon yöntemi kullanılarak beş farklı antibiyotik ile belirlenmiştir. Antimikrobiyal hassasiyet testleri The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kriterlerine uygun olarak yapılmıştır. Antibiyotik olarak penisilin G (10 µg), tetrasiklin (30 µg), amoksisilin (10 µg), rifampisin (30 µg) ve vankomisin (30 µg) seçilmiştir (Chaiyawan vd., 2010).

3.6 *Bacillus* Sporulasyonu

Bacillus suşlarından spor eldesi için ilk olarak kültürler Nutrient broth (NB)'da 37°C'de 2 gün geliştirilmiş ve aktif kültürler 50 mL'lik Nutrient Broth medyasına aktarılmış ve 37°C'de 1 gün daha inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kültürler 250 mL lik sporülasyon medyalarına (%0,2 Glucose, %0,05 MgSO₄.7H₂O %0,6 KH₂PO₄, %0,5 Meat extract, %0,3 Peptone) aktarılmış (Şekil 3.4) ve 37°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır (Posada-Urbe vd., 2015; Sinnelä vd., 2019; Verma vd., 2013).



Şekil 3.4 Bakteri sporülasyon medyaları

İnkübasyon sonrasında 80°C'de 15 dk ısıtma işlemine uğratılan kültürler daha sonra saf su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla kültürler +4°C, 5000 rpm de 15 dk santrifüj edilmiş ve sporların çökmesi sağlanmıştır (Şekil 3.5). Daha sonra süpernatant kısımları atılarak, pellet 10 mL steril saf su ile yıkanmış ve tekrar santrifüj işlemi yapılmıştır. Bu işlem 3 kere tekrar edilmiştir. Elde edilen pellet 5mL steril saf su içerisinde çözündürülerek üretimde kullanılmak üzere +4 derecede saklanmıştır.



Şekil 3.5 Bakteri sporlarının toplanması

3.7 Probiyotik Yumuşak Şekerleme Üretimi

Probiyotik yumuşak şekerleme üretim çalışmaları bakterisiz kontrol numunesiyle birlikte toplamda 6 çeşit yumuşak şekerleme olmak üzere 3 farklı ticari suş (*Bacillus subtilis* DE111 (P1), *Bacillus coagulans* BC99 (P2), *Bacillus clausii* Enterogermina (EG)) ve 2 izolat (*Bacillus subtilis*: BB2 ve *Bacillus coagulans*: FC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak kültürlerden yukarıda belirtildiği gibi spor elde edilmiştir. Daha sonra Şekil 3.6'da gösterildiği gibi yumuşak şekerleme üretimi için öncelikle %26±4 sakkaroz, %45±5 maltoz şurubu, %3±1 su briks değeri 83 olana kadar pişirilmiştir. Ayrı olarak ağırlıkça jelatin:su oranı 1:2 olacak şekilde jelatin (240-260 bloom) çözeltisi hazırlanmıştır. Pişirilen karışıma 80°C'de %18±2 jelatin çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra toplam karışımın %0,8 i olacak şekilde renklendirici ve %0,12 oranında aroma maddesi ilave edilmiştir (Tablo 3.3). Son olarak sitrik asit çözeltisi kontrol numunesi için %3,6 (1:1 w/w) bakteri kültürleri içeren karışım için %2,4 olarak ilave edilerek karışım hazırlanmıştır. En son aşama olarak bakteri sporları üretimde kullanılmak üzere 45-50°C sıcaklığı aralığında ayrı ayrı karışıma ilave edilmiştir. Falkon tüpleri içerisinde yer alan bakteri sporları ilave edilirken kayıp yaşamamak için 5mL saf su ile çalkalanarak ilave işlemi gerçekleştirilmiştir. Yumuşak şekerleme karışımları sıkma poşetlerine aktararak nişasta içeren kalıplara dökülmüş ve 2 gün 25°C sıcaklığında dinlenmeye bırakılmıştır. Kuruyan yumuşak şekerlemeler öncelikle nişastalarından temizlenmiştir. Daha sonra dış kısımlarına kaplama (palm yağı, karnauba mumu, bal mumu) yapılarak depolama işlemleri için plastik kap ve plastik poşetlere aktarılmış ve 0. gün, 15. gün, 45. gün ve 90. gün analizleri yapılmak üzere oda sıcaklığında depolanmıştır (Şekil 3.6).

Tablo 3.3 Yumuşak şekerleme bileşenleri

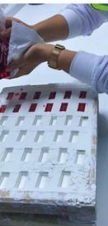
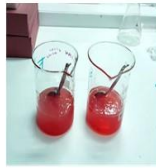
Bileşen	Toplam karışımda kullanılma yüzdesi (%)
Şeker	26±4
Maltoz şurubu	45±5
Su	3±1
Jelatin çözeltisi (jelatin:su, 1:2 w/w)	18±2
Toplam	100
Renklendirici-Aroma-Asit ilavesi	
Renklendirici	0,8
Aroma	0,12
Sitrik asit çözeltisi (sitrik asit:su, 1:1, w/w)	Probiyotikli üretim için: 2,4 Kontrol üretim için: 3,6



Pişirme



Aroma, Boya, Asit ve Probiyotik İlavesi



Kalıplama



Nişasta kalıplar



Paketleme



Yağ kaplama



Nişastanın uzaklaştırılması



Şekil 3.6 Probiyotik yumuşak şekerleme üretim çalışmaları

3.8 Reolojik Analiz

Örneklerin akış davranış özelliklerini belirleyebilmek için yatışkan faz (steady state) reolojik özellikleri belirlenmiştir. Pişirilen yumuşak şekerleme karışımı, jelleşmeden 50°C’de reolojik özellikler belirlenmiştir. Reolojik ölçümler,

stress/strain kontrollü reometre cihazı (Anton Paar MCR 302, Avusturya) ile paralel tabaka sistemi kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.7). İki plaka arasındaki mesafe 0,5 mm olacak şekilde ayarlanmış ve ölçüm sırasında örneğe 0,1-100 s⁻¹ aralığında shear rate uygulanmıştır. Akış davranışını tanımlamak için Herschel Bulkley modeli kullanılmıştır (3.3).

$$\sigma = \sigma_0 + K\dot{\gamma}^n \quad (3.3)$$

Bu denklemde; σ kayma gerilimi (Pa), K kıvam katsayısı (Pa sⁿ), $\dot{\gamma}$ kayma hızını (s⁻¹), n akış davranışı indeksini (boyutsuz), σ_0 akma gerilimini (Pa) ifade etmektedir.



Şekil 3.7 Reometre cihazı

3.9 Yumuşak Şekerlemelerde Probiyotik Sayımı

Üretilen yumuşak şekerlerde bakteri sayımı yapılmak üzere 5 g örnek steril şartlarda alev başında alınarak fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde homojenize edilmiş ve seri seyreltimler yapılarak nutrient agara yayma plak ve damlatma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Sayımlar *Bacillus coagulans* ve *Bacillus clausii* için 37°C’de 2 gün, *Bacillus subtilis* için 37°C’de 1 gün inkübasyon sonrasında

yapılmıştır (Şekil 3.8). Örneklerin 15. gün, 45. gün ve 90. gün depolanmaları süresince probiyotik sayımı tekrar edilmiştir.



Şekil 3.8 Yumuşak şekerlemelerde bakteri ekimleri

3.10 Yumuşak Şekerlemelerde *in-vitro* Gastrointestinal Sistem Dayanıklılık Analizi

Probiyotik yumuşak şekerlemelerin *in-vitro* gastrointestinal sistemdeki dayanıklılığı Liserre, Ré ve Franco ve Buriti vd. tarafından önerilen metoda göre tespit edilmiştir (Buriti vd., 2010; Liserre vd., 2007). Örnekler (10 g), gastrik fazı simüle etmek için 1M steril hidroklorik asit (HCl) çözeltisi yardımı ile pH 2'ye ayarlanmış pepsin (3 g/L) ve lipaz (0,9 g / L) çözeltilerinin etkisine maruz bırakılmıştır (37°C'de 2 saat). Enterik I faz simülasyonu için daha sonra safra tuzları (10 g/L) ve pankreatin (1 g/L) çözeltileri ilave edilerek, alkalın çözeltisi (L başına 150 mL 1 M NaOH, 14 g PO₄H₂Na x H₂O) kullanılarak pH 5,6'ya ayarlanmıştır (37°C'de 2 saat). Son olarak, enterik II fazını simüle ederek, pH 7,2'ye ayarlandıktan sonra numunelere tekrar 10 g/L safra tuzu ve 1 g/L pankreatin çözeltisi ilave edilmiştir. Üç fazın çözeltileri, her biri 2 saat boyunca olmak üzere bir çalkalayıcıda 37°C'de tutulmuştur. Sporları (probiyotik *Bacillus*) saymak için,

simüle gastrointestinal koşullarına maruz kalan gıda matrisinden (yumuşak şekerleme) 1 mL numune alınarak, 0 ve 6. Saatte sayımlar yapılmak üzere ekilmiştir. Probiyotik suşların t₀ ve t_s daki hayatta kalma oranları aşağıda belirtilen eşdeğerliğe (3.4) göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{Canlı kalım} = \frac{N \log \text{son zaman (6h)}}{N \log \text{başlangıç zaman (0h)}} \times 100 \quad (3.4)$$

In-vitro gastrointestinal sistem analizi örneklerin 1. gün ve 15. gün, 45. gün, 90. gün depolanmalarından sonra gerçekleştirilmiştir.

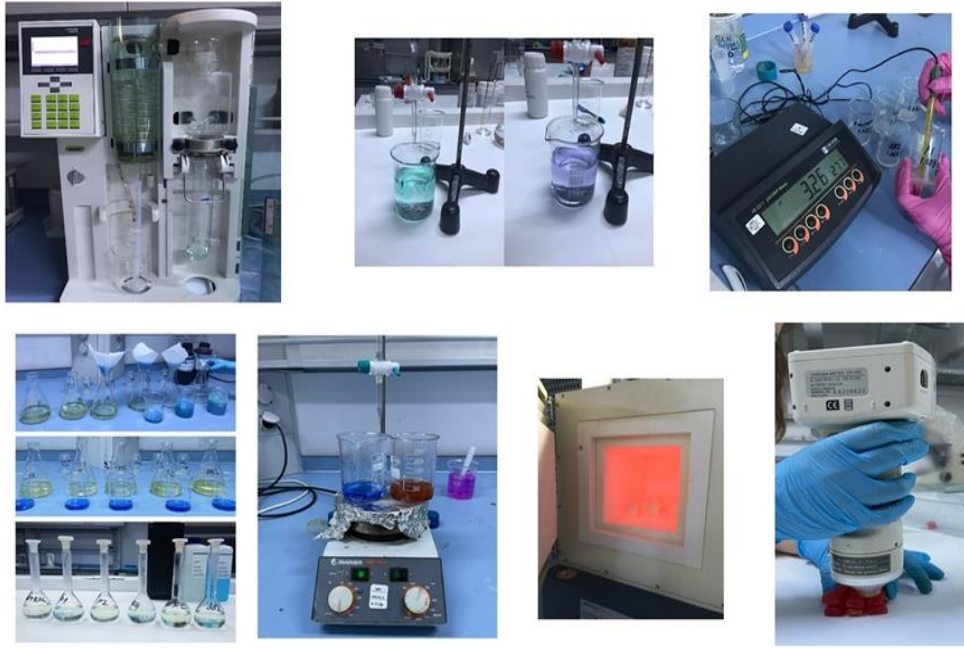
3.11 Yumuşak Şekerlemelerin Fizikokimyasal Analizleri

Protein tayini, kjeldahl yöntemiyle belirlenmiştir. Bu yöntemde 1 g örneğe 20 mL H₂SO₄ ve 2 adet tablet ilave edilip ve infrared yakma ünitesinde dereceli olarak 4 saat kadar yakılmıştır. Daha sonra distilasyon işlemi uygulanmış ve ardından elde edilen çözelti 0,1 M HCl ile pH 4,6'ya ulaşana kadar titre edilmiştir. Toplam şeker tayini: alkali ortamda ve kaynama sıcaklığında invert şekerin Fehling çözeltisinde bulunan Cu-II- oksidi suda çözünmeyen Cu-Ioksidi indirgemesi esasına dayanan Lane-Eynon Metodu ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örnekler ilk olarak üzerlerine saf su ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş örneklerden 25 mL alınarak durultma işlemi için üzerlerine 150 ml kadar su konup üstüne 10 ml Carrez I ve 10 ml Carrez II eklenmiştir. Daha sonra 250 ml'ye tamamlanmış ve filtre edilip bürete aktarılmıştır. Örnekte ilk olarak indirgen şeker tayini yapılmıştır. Hazırlanmış filtrat doğrudan bir bürete alınmış, bir erlende 5 ml Fehling A, 5 mL Fehling B ve 25 mL damıtık su karışımının 2 dakika kaynatılması sonrası %1'lik metilen mavisi indikatörlüğünde berrak olan çözelti titre edilip, erlende oluşan çözelti bakır kırmızı rengine dönene kadar bu durum devam ettirilmiştir. Daha sonra, toplam şeker tayini için durutulmuş berrak filtrattan (örnekten) 50 mL alınarak 100 mL'lik bir balona aktarılmış ve üzerine %37'lik HCl çözeltisinden 6 mL eklenip, 70°C'ye ayarlanmış bir su banyosuna yerleştirilmiştir. 3 dakika sonunda sıcaklığın 67°C'ye erişmesi sağlanmış ve 5 dakika daha bekletilmiştir. Daha sonra soğuk su altında hızlıca soğutulmuştur. Balondaki çözeltiye, 5N NaOH çözeltisi ve 1-2 damla fenolfitalein ilave edilerek nötralize edilip, damıtık su ile balon hacmine kadar tamamlanmıştır. İndirgen şeker tayininde olduğu gibi titrasyon işlemi aynı şekilde yapılmıştır. Bu durumda toplam şeker

taini için harcanan miktar not edilmiştir. Toplam şeker miktarı aşağıda yer alan formüle (3.5) göre hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam şeker miktarı \%} = \frac{\text{Faktör} \times \text{seyreltme miktarı} \times 100}{\text{Titrasyonda harcanan miktar}} \quad (3.5)$$

Renk değerleri, her biri, 3,5 cm uzunluk, 1,5 cm genişlik ve 0,5 cm kalınlığa sahip 6 adet yumuşak jelly şekerlemenin yan yana getirilerek otomatik renk tayin cihazı (Konica Minolta CR400, Japonya) ile ölçülmesi ile belirlenmiştir. Sonuçlar L*, a* ve b* cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.9 Fizikokimyasal analizler

3.12 Yumuşak Şekerlemelerin Biyoaktif Özelliklerinin

Belirlenmesi

Üretilen yumuşak şekerleme örneklerinde toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesi için yumuşak şekerlemeler %0,1 HCl içeren %80'lik metanol çözeltisinde çalkalayıcıda 18 saat ekstrakte edilmiştir. Daha sonra elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriği, Folin metodu kullanılarak belirlenmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). Bu amaçla 0,5 mL ekstre, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (0,2 N) ve 2 mL Na₂CO₃ solüsyonu (%7) ile karıştırılmıştır. Örnekler 30 dakika bekletildikten sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve 0,22 µm por genişlikte filtreden geçirilmiştir. Numunelerin absorbansı, spektrofotometrede

(Optizen Pop Bio UV/Vis Spectrophotometer, S. Korea) kör numuneye karşı 765 nm'de ölçülmüştür. Örneklerin toplam fenolik madde miktarı, mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/kg olarak ifade edilmiştir.

Örneklerin antioksidan aktivitesi ise DPPH metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 4,9 ml DPPH (0,1mM) ve 0,1 mL ekstrakt 27°C'de 20 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra karışım 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve 0,22 µm por genişlikte filtreden geçirilmiştir. Örneklerin spektrofotometrede (Optizen Pop Bio UV/Vis Spectrophotometer, S. Korea) 517 nm'de absorbans ölçümü yapılarak DPPH aktivitesi, µmol TE/g örnek olarak ifade edilmiştir (Sánchez-Moreno, 2002).

3.13 Yumuşak Şekerlemelerin Tekstürel Özelliklerinin Belirlenmesi

Tekstür profil analizi (TPA) 5kg yük hücresi ile donatılmış tekstür analiz cihazıyla (Micro Stable TA-TX Plus, İngiltere) 5mm çaplı silindirik prob ve şekerleme tutucu gövde kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10). Ürünlere TPA (Doku Profili Analizi) testi uygulanmıştır. Test sırasında 3,5 cm uzunluk, 1,5 cm genişlik ve 0,5 cm kalınlığa sahip örnekler iki kez sıkıştırma uygulanmıştır. Ön test, test ve son test hızları 1,7 mm/s olarak ayarlanmıştır ve %73 gerinim uygulanmıştır. TPA grafiğinden yumuşak örneklerinin sertlik (N), yapışkanlık, sakızimsılık (N) ve esneklik değerleri hesaplanmıştır. Tekstür analizi örneklerin 1. gün ve 15. gün, 45. gün, 90. gün depolanmalarından sonra gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.10 Tekstür cihazı ve şekerleme tutucu tablası

3.14 Yumuşak Şekerlemelerin Duyusal Özelliklerinin Belirlenmesi

Üretilen probiyotik yumuşak şekerlemelerin duyusal özellikleri, örneklerin renk, koku, lezzet gibi özelliklerinin kalite karakteristiklerinin derecelendirilmesine dayanan puanlama testi ile belirlenmiştir. Duyusal profillemeye, bu amaç için bilgilendirilmiş 20 kişilik bir ekip tarafından gerçekleştirilmiştir. Panelistler ürünleri, renk özellikleri, koku özellikleri, çiğnenebilirlik, tat özellikleri ve genel kabul edilebilirlik açısından değerlendirmiştir. Panelistler ürünü her bir duyusal özellik için 1 (kesinlikle beğenilmeyen)' den 10 (kesinlikle beğenilen)'a kadar uzanan skala ile değerlendirmiştir. Duyusal analiz örneklerin 1. gün ve 15. gün, 45. gün, 90. gün depolanmalarından sonra gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.11 Duyusal analiz için yumuşak şekerleme örnekleme

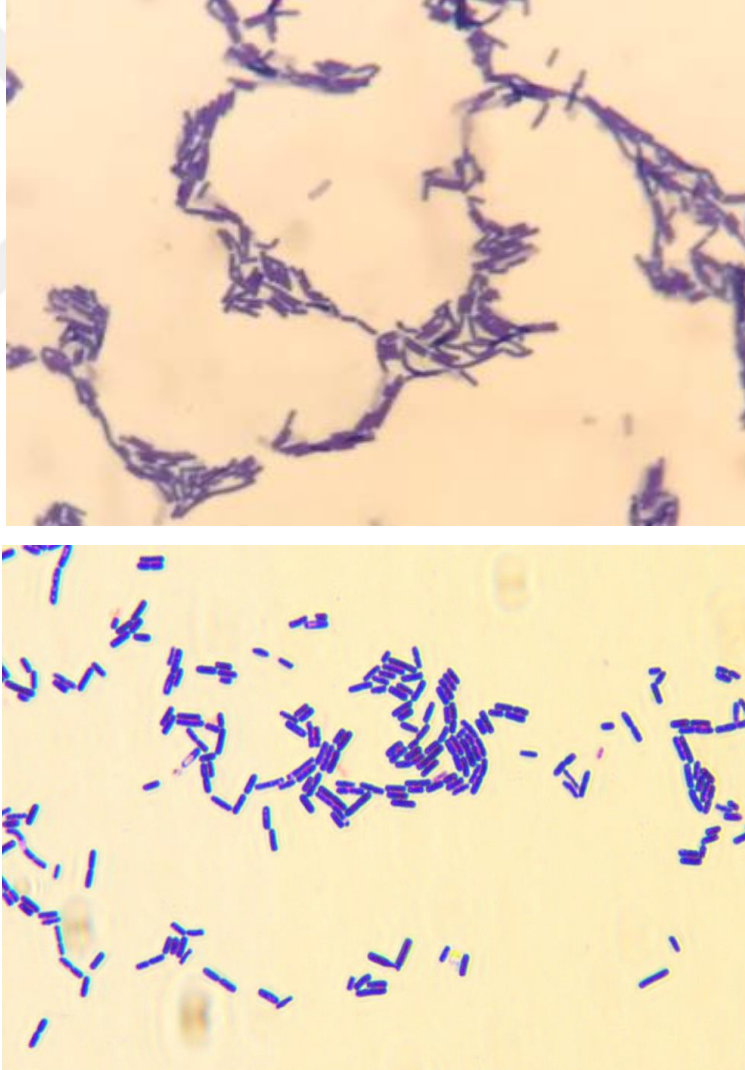
3.15 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, probiyotik yumuşak şekerlemenin özelliklerini depolama süresince gün bazında ve kullanılan *Bacillus* türü olarak değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

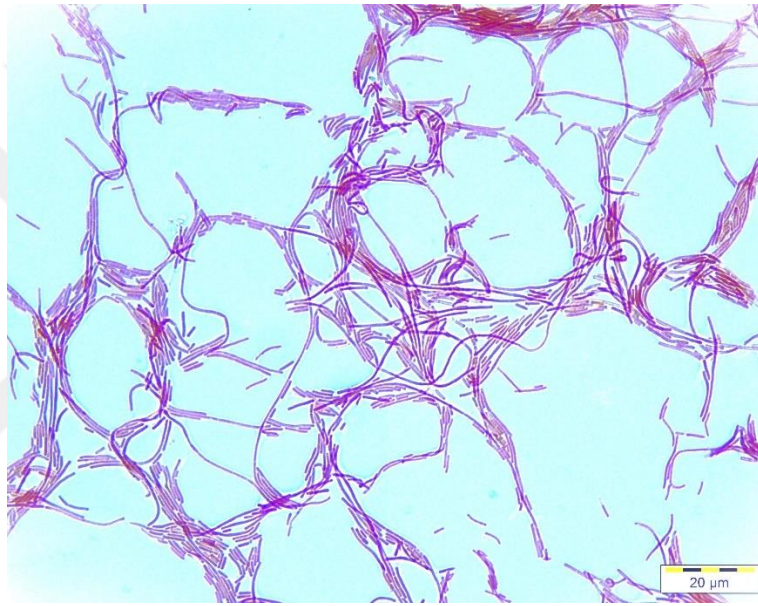
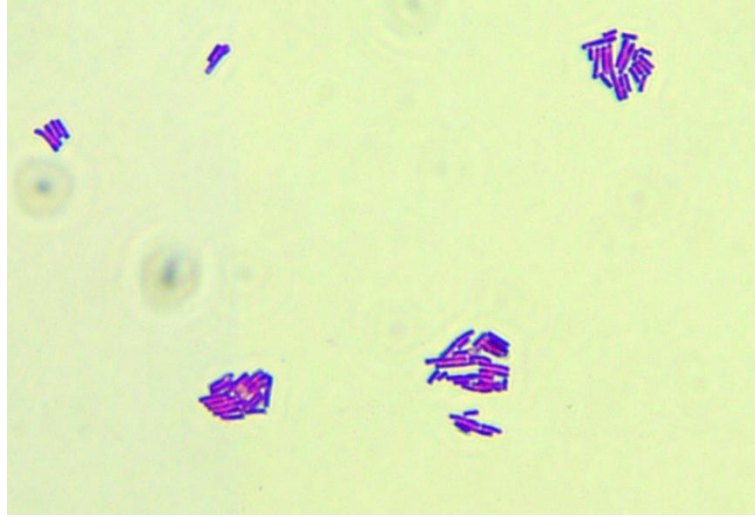
Araştırma sonrasında elde edilen veriler, varyans analizlerine tabi tutulmuştur. Duyusal, tekstürel, reolojik, mikrobiyal özellikler ve diğer veriler değerlendirilmek üzere tek faktörlü varyans analizlerine (one-way ANOVA) tâbi tutulmuşlardır. Varyans analizleri JMP (release 6.0) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmeler tek yönlü ANOVA ve Tukey testleri ile yapılmıştır.

4.1 İzole Edilen Bakterilerin Özellikleri

Yapılan analizlerle izole edilen bakterilerin morfolojileri, Gram özellikleri, katalazla reaksiyon verip/vermemeleri ve spor oluşturup/oluşturmamaları belirlenmiştir. Analiz sonucunda muhtemel *Bacillus* izolatlarını temsil etmek üzere gram pozitif (Şekil 4.1), katalaz pozitif (Şekil 4.2) ve sporlu (Şekil 4.3) bakteriler deney materyali olarak seçilmiştir. Elde edilen izolatlara dair özellikler Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de verilmiştir. Probiyotik *Bacillus* içeren takviye edici gıdalardan elde edilen izolatların özellikleri ise Tablo 4.3’te verilmiştir.



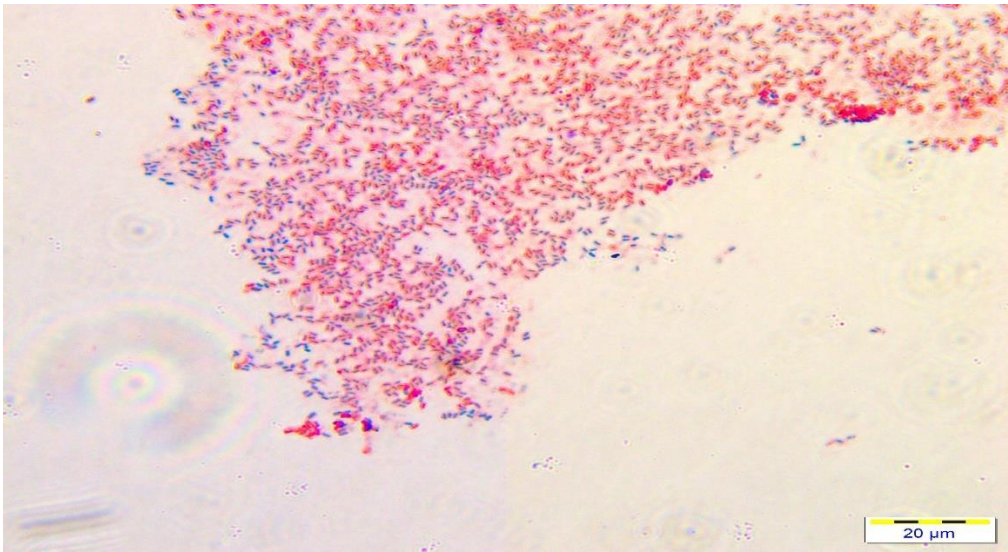
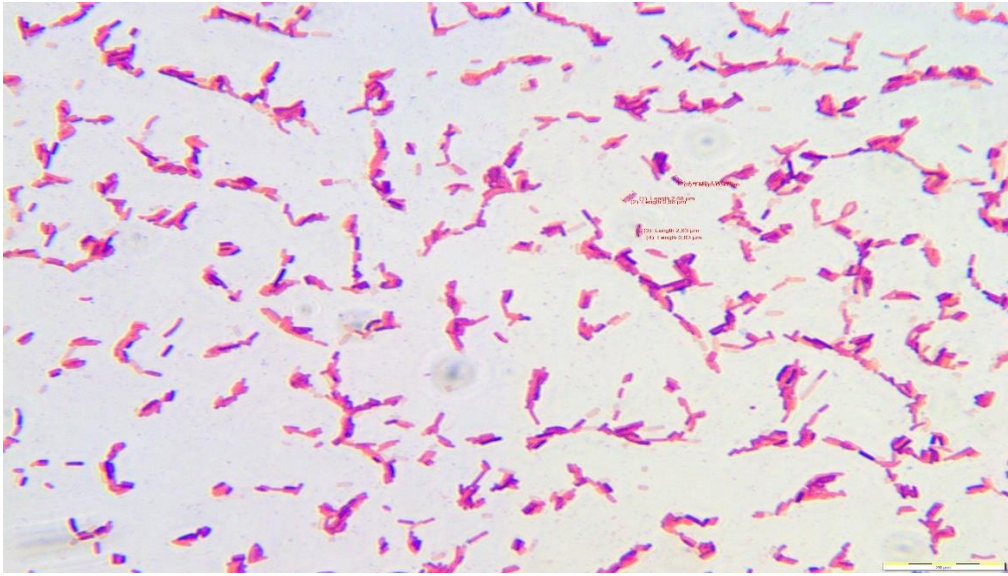
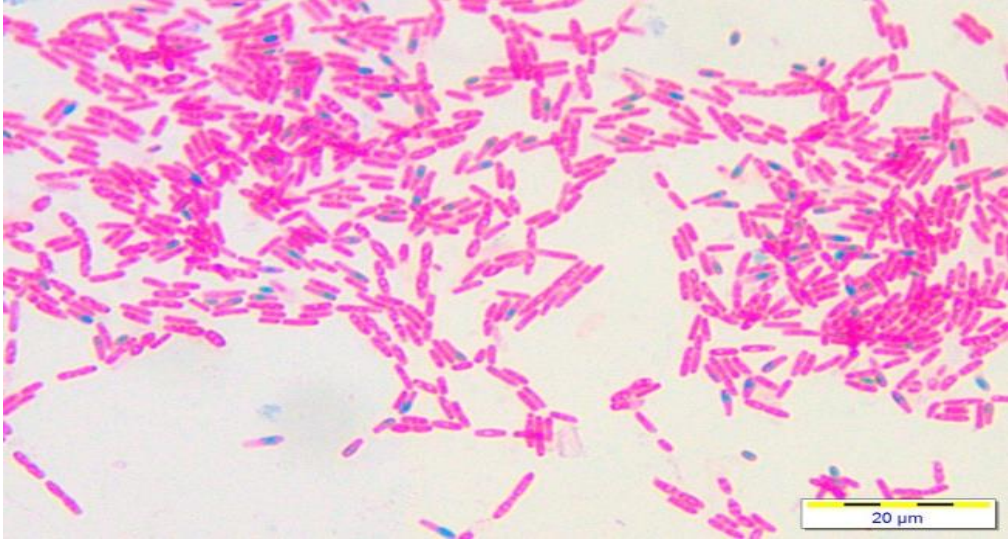
Şekil 4.1 Gram boyama testi, (Gram pozitif)



Şekil 4.1 Gram boyama testi, (Gram pozitif) (devamı)



Şekil 4.2 Katalaz testi (pozitif)



Şekil 4.3 Spor boyama (pozitif)

Tablo 4.1 Toprak numunelerine ait bilgiler ve elde edilen izolatların özellikleri

Toprak kodu*	Toprak pH'ı	Isılı işlem sonrası üreme	İzolat kodu**	Gram boyama özellikleri	Mikroskopik morfolojileri	Spor boyama özellikleri	Katalaz testi
TA	6,65	Var	TA1	Gram negatif	Basil		
			TA2	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TA3	Gram negatif	Basil		
			TA4	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
TB	6,81	Var	TB1	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TB2	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TB3	Gram pozitif	Kok		
			TB4	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
TC	7,79	Var	TC1	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TC2	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TC3	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+

Tablo 4.1 Toprak numunelerine ait bilgiler ve elde edilen izolatların özellikleri (devamı)

			TC4	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
TD	6,73	Var	TD1	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TD2	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TD3	Gram negatif	Basil		
TE	7,85	Var	TE1	Gram pozitif	Kok		
			TE2	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TE3	Gram pozitif	Kok		
TF	7,95	Var	TF1	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TF2	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TF3	Gram negatif	Basil		
			TF4	Gram pozitif	Kok		
			TF5	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TF6	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+

Tablo 4.1 Toprak numunelerine ait bilgiler ve elde edilen izolatların özellikleri (devamı)

TG	8,44	Var	TG1	Gram pozitif	Kok		
			TG2	Gram negatif	Basil		
			TG3	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TG4	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TG5	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TG6	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TG7	Gram negatif	Basil		
			TG8	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
TH	9,08	Var	TH1	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TH2	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TH3	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TH4	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+

Tablo 4.1 Toprak numunelerine ait bilgiler ve elde edilen izolatların özellikleri (devamı)

			TH5	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			TH6	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
TK	8,03	Var	TK1	Gram negatif	Basil		
			TK2	Gram negatif	Basil		
			TK3	Gram pozitif	Kok		
			TK4	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
TL	8,12	Yok					
TM	8,13	Var	TM1	Gram negatif	Basil		
			TM2	Gram negatif	Basil		

*Edirne, Kırklareli ve İstanbul'un çeşitli bölgelerinden alınan toprak örnekleri

**Toprakların ekimi sonucu, morfolojik olarak farklı olan kolonilerden saflaştırılan izolatlar

Tablo 4.2 Balık numuneleri ve elde edilen izolatların özellikleri

Balık kodu*	Balık Türü	Isıl işlem sonrası üreme	İzolat kodu**	Mikroskopik morfolojileri	Gram boyama özellikleri	Spor boyama özellikleri	Katalaz testi
BA	Çipura	Var	BA1	Gram negatif	Basil		
			BA2	Gram negatif	Basil		
			BA3	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			BA4	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			BA5	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
BB	Somon	Var	BB1	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			BB2	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			BB3	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
			BB4	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
BC	Levrek	Var	BC1	Gram negatif	Basil		

Tablo 4.2 Balık numuneleri ve elde edilen izolatların özellikleri (devamı)

BD	Çipura	Yok					
BE	Çipura	Yok					
BF	Çipura	Yok					
BG	Levrek	Yok					
BH	Levrek	Yok					
BK	Levrek	Yok					

* Çeşitli türlerde alınan balık örnekleri

** Balıkların ekimi sonucu, morfolojik olarak farklı olan kolonilerden saflaştırılan izolatlar

Tablo 4.3 Çeşitli takviye edici gıdalardan elde edilen izolatların özellikleri

Ürün adı	İzolat kodu	Gram boyama özellikleri	Mikroskopik morfolojileri	Spor boyama özellikleri	Katalaz testi
Enterogermina® Kids Probiotic¹	EG	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
Schiff® Digestive Advantage²	KKB	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+
Trunature® Digestive Probiotic Gummies³	K1	Gram pozitif	Basil	Sporlu	+

¹ Probiyotik mikroorganizma (*Bacillus clausii*) içeren takviye edici gıda

² Probiyotik mikroorganizma (*Bacillus coagulans*) içeren takviye edici gıda

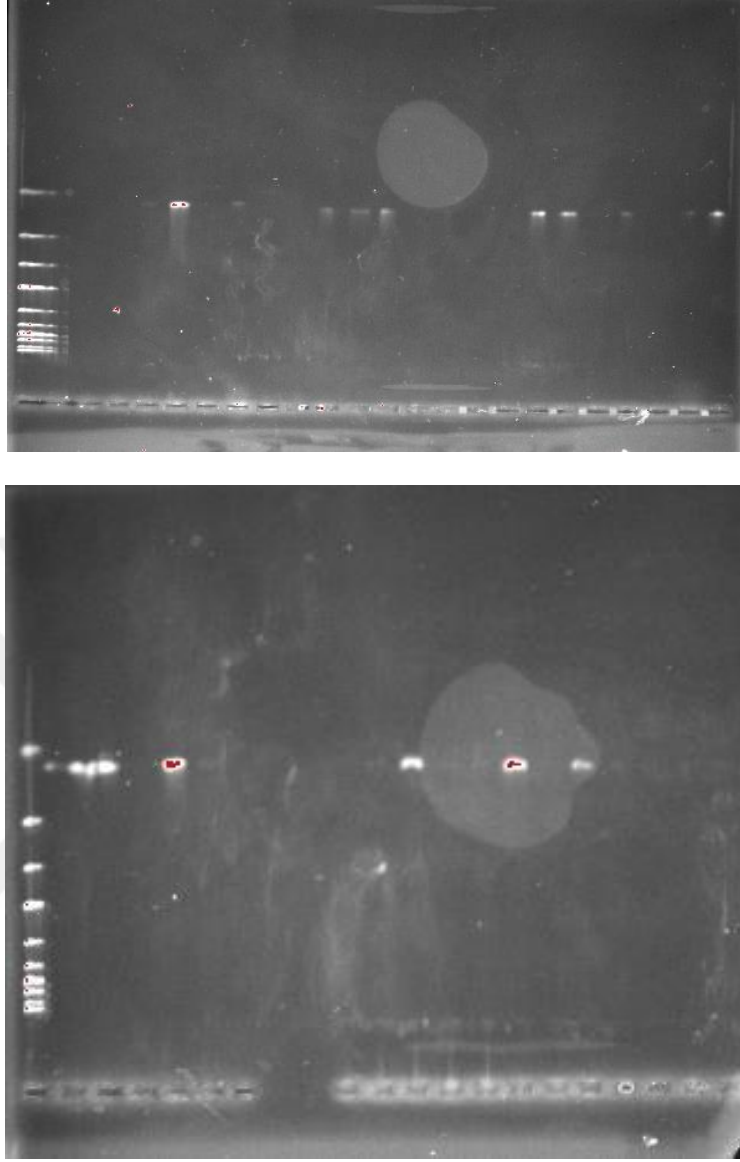
³ Probiyotik mikroorganizma (*Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*) içeren takviye edici gıda

Gerçekleştirilen analizler sonucunda 55 adet izolat elde edilmiş ve 35 adet izolat muhtemel *Bacillus* olarak değerlendirilmiştir. Muhtemel *Bacillus* izolatları detaylı analizlere tabi tutulmak üzere -80°C’de stoklanmıştır.

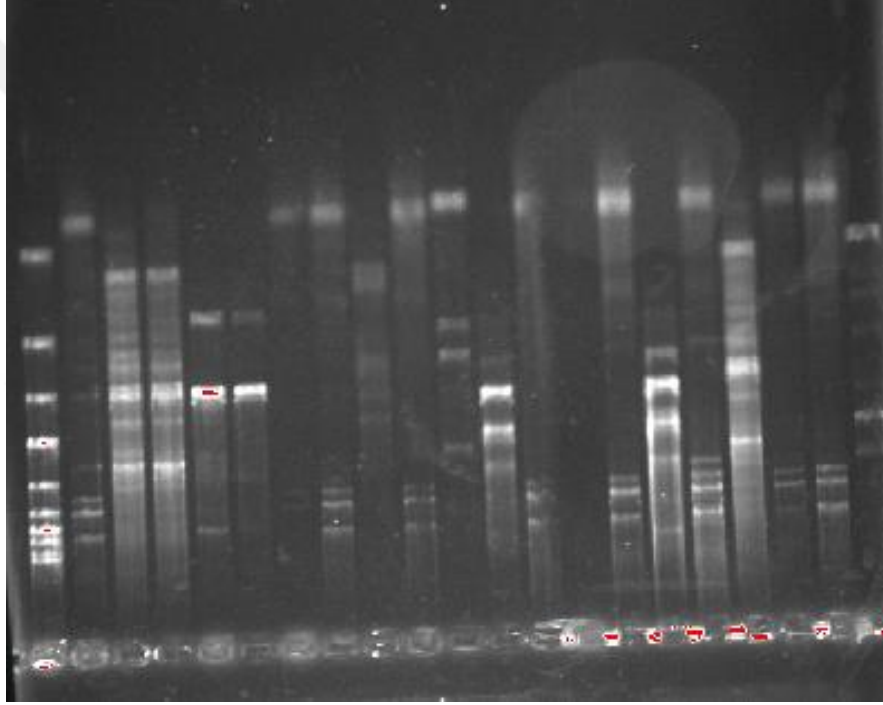
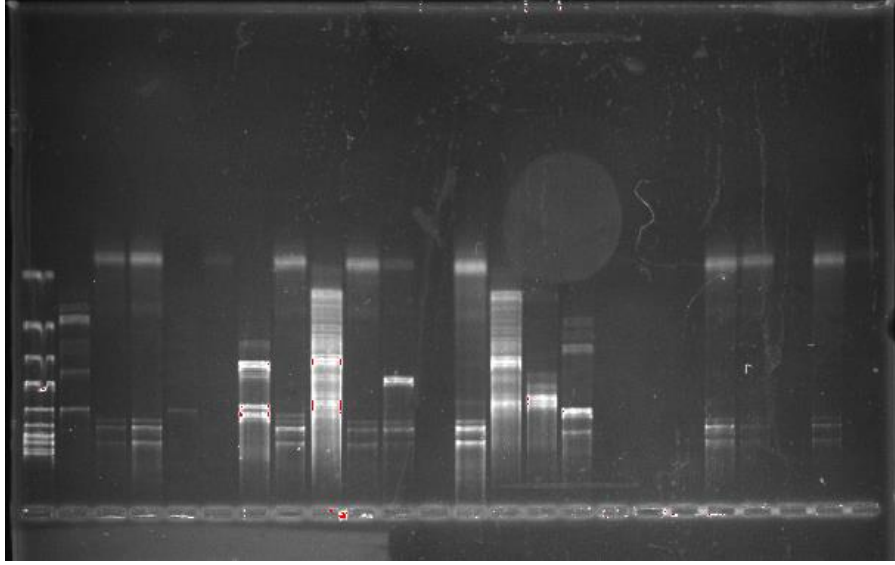
Tablo 4.3’te verilen piyasadaki gıda takviyelerinden elde edilen izolatlara ek olarak ticari olarak satılan *Bacillus subtilis* DE111 (P1), *Bacillus coagulans* BC99 (P2), suşları da, sonraki analizlerde pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere saklanmıştır. Ek olarak önceki çalışmalar kapsamında peynirden izole edilmiş ve moleküler tanımlanması yapılmış *Bacillus coagulans* (FC) izolatı da çalışmalar kapsamında kullanılmıştır.

4.2 İzolatların 16S rRNA Dizin Analizi Sonuçları

Bakteri sistematığının belirlenmesi ve filogenetik ağaç oluşumunda 16S rRNA gen dizilerinin kullanılması günümüzde oldukça rutin hale gelmiştir. Bu sebeple izolatlardan kromozomal DNA’lar izole edilmiştir. Elde edilen kromozomal DNA’ların PCR yardımıyla çoğaltılması sonucu yaklaşık 1.500 bp büyüklüğünde bantlar gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *Bacillus* türlerine özgü primer kullanılarak çalışılan PCR analizinden elde edilen elektroforez jel görüntüleri



Şekil 4.5 Farklı DNA parmak izine (fingerprint) sahip izolatların agaroz jel görüntüleri

Bu sonuçlar değerlendirilerek benzer suşlar tespit edilmiştir. Oluşturulan her benzer gruptan bir adet temsili örnek sekans analizi için kullanılmıştır.

Farklı suşların tespitinden sonra genotipik tanılama için yapılan 16S-rRNA PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen suşların hedef bölgelerinin amplifikasyonu gerçekleştirilen temsili suşlar, sekans işlemlerini gerçekleştirilmek üzere hizmet alımı gerçekleştirilecek ilgili firmaya gönderilmiştir. 16S rRNA gen bölgelerinin

nükleotit sırasının belirlenmesi için genin her iki tarafından dizin analizi yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 İzolatların 16S rRNA dizin analizi sonuçları

İzolat kodu	Türler	% Benzerlik oranı	Temsil ettiği izolatlar
BB2	<i>Bacillus subtilis</i>	99	BA3
TA2	<i>Bacillus subtilis</i>	99	TB2, TA4
TC2	<i>Bacillus subtilis</i>	99	TC1
KKB	<i>Bacillus coagulans</i>	99	
K1	<i>Bacillus subtilis</i>	99	
P1	<i>Bacillus subtilis</i>	99	
P2	<i>Bacillus coagulans</i>	99	
P3	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	99	
FC	<i>Bacillus coagulans</i>	99	
TG6	<i>Bacillus cereus</i>	99	
TK4	<i>Bacillus cereus</i>	99	
TF6	<i>Bacillus cereus</i>	99	
TH4	<i>Bacillus cereus</i>	99	

4.3 Bakteri İzolatlarının Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Bacillus izolatlarına ait fizyolojik özellikler Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5 Bakteri izolatlarının fizyolojik özellikleri

		Farklı Sıcaklık (°C)				Farklı Tuz Konsantrasyonları (%)				Farklı pH dereceleri				
İzolat kodu	Bakteri türü	5	30	40	65	2	5	7	10	5	6	8	10	12
BB2	<i>Bacillus subtilis</i>	-	++	+	-	++	+	+	+	+	++	+	+	+
TA2	<i>Bacillus subtilis</i>	-	++	+	-	++	+	+	+	+	++	+	+	+
TC2	<i>Bacillus subtilis</i>	-	++	+	-	++	+	+	+	+	++	+	+	+
KKB	<i>Bacillus coagulans</i>	-	++	+	-	++	+	+	+	+	++	+	+	+
K1	<i>Bacillus subtilis</i>	-	++	+	-	++	+	+	+	+	++	+	+	+
FC	<i>Bacillus coagulans</i>	-	++	+	-	++	+	+	-	+	++	+	+	+

Tablo 4.5 Bakteri izolatlarının fizyolojik özellikleri (devamı)

P1	<i>Bacillus subtilis</i>	-	++	+	-	++	+	+	+	+	++	+	+	+
P2	<i>Bacillus coagulans</i>	-	++	+	-	++	+	+	-	+	++	+	+	+
P3	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	-	++	+	-	++	+	+	+	+	++	+	+	+
EG	<i>Bacillus clausii</i>	-	++	+	-	++	+	+	+	-	+	++	+	+
BA3	<i>Bacillus spp</i>	-	++	+	-	++	+	+	+	+	++	+	+	+
TB2	<i>Bacillus spp</i>	-	++	+	-	++	+	+	-	+	++	+	+	+
TA4	<i>Bacillus spp</i>	-	++	+	-	++	+	+	+	+	++	+	+	+
TC1	<i>Bacillus spp</i>	-	++	+	-	++	+	+	-	-	+	++	+	+

* Tabloda verilen -, + ve ++ simgeleri sırasıyla gelişme olmadığını, az gelişme olduğunu ve iyi gelişme olduğunu göstermektedir.

Elde edilen bulgular, *Bacillus* izolatlarının alkali, tuz içeren ortamlarda kolayca gelişebileceğini göstermiştir. En iyi gelişme pH 6 ile 8 arasında gözlemlenmiştir. Literatürde *Bacillus* suşlarının, pH 1'den 7'ye kadar değişen gelişme oranlarına sahip olduğu ve farklı asidik-bazik derecelerde hayatta kalmaları konusunda umut verici toleransa sahip olduğu belirtilmektedir (Kavitha vd., 2018). Ek olarak, %10 NaCl konsantrasyonundaki gelişme, bu türlerin yüksek tuz konsantrasyonlarına dirençli olduğunu göstermiştir (Satapute vd., 2012). İzole edilen çeşitli *Bacillus* türleri 30 ve 40°C'lerde iyi gelişme göstermiştir. Çalışmalar, *Bacillus* türlerinin gelişme aralıklarının mezofilikten orta derecede termofiliğe (54°C) kadar değiştiğini göstermiştir (Łubkowska vd., 2023).



Tablo 4.6 Bakteri İzolatlarının çeşitli biyokimyasal özellikleri

Örnek Kodları	Bakteri türü	Lesitin hidrolizi	Hemolitik aktivite	Nişasta hidrolizi	Glukozdan gaz oluşumu	Eskulin hidrolizi	Nitrat Redüksiyon
BB2	<i>Bacillus subtilis</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
TA2	<i>Bacillus subtilis</i>	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
TC2	<i>Bacillus subtilis</i>	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
KKB	<i>Bacillus coagulans</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
K1	<i>Bacillus subtilis</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
FC	<i>Bacillus coagulans</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
P1	<i>Bacillus subtilis</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
P2	<i>Bacillus coagulans</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif

Tablo 4.6 Bakteri İzolatlarının çeşitli biyokimyasal özellikleri (devamı)

P3	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
EG	<i>Bacillus clausii</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
BA3	<i>Bacillus spp</i>	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
TB2	<i>Bacillus spp</i>	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
TA4	<i>Bacillus spp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
TC1	<i>Bacillus spp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif

Sonuçlara göre izolatların glikozdan gaz üretmediği, ancak tüm bakteri suşlarının eskülin ve nişastayı hidrolize edebildiği ve katalaz kullanabildiği bulunmuştur. Tüm *B. subtilis* ve *B.clausii* izolatları nitratı indirgeyebilirken, *B. coagulans* izolatları genel olarak nitratı nitrite indirgeyememiştir.

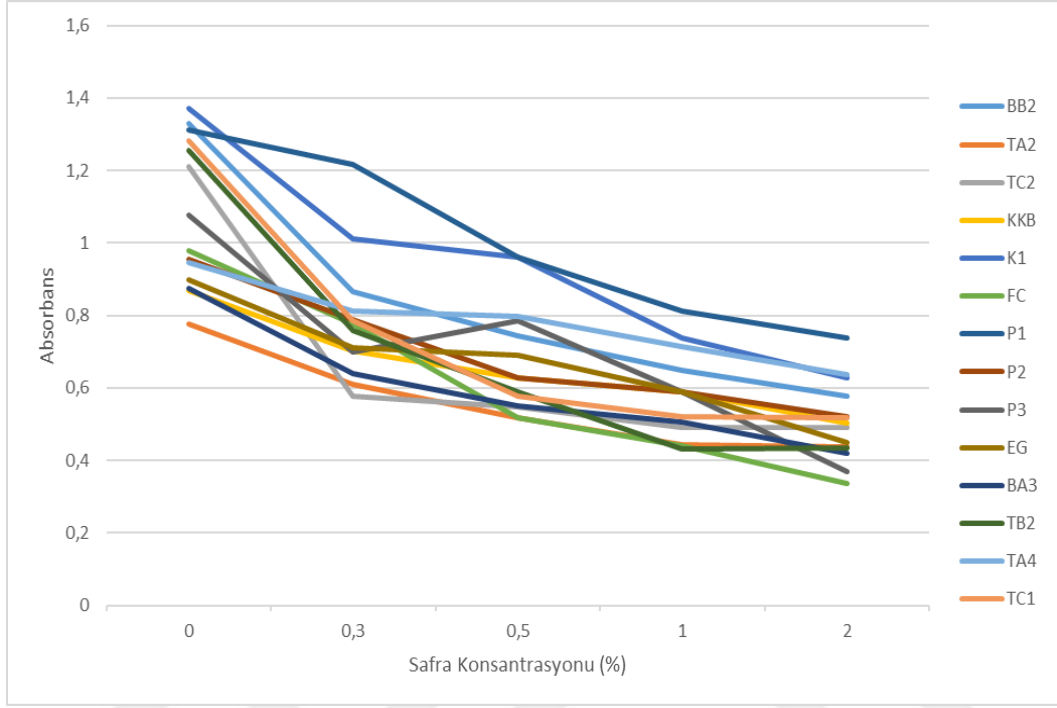
Güçlü hemolitik ve / veya lesitinaz aktivitesi, bakterilerin virallitesi üzerinde etkisi olan sitotoksik fosfolipazların varlığının bir göstergesi olabilmektedir (Sorokulova vd., 2008). Bu nedenle izole edilen bu bakterilerde hemolitik ve lesitinaz aktivitelerinin olmaması probiyotik olarak değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bulgular, tüm *Bacillus*'un ticari takviyelerden elde edilen suşların ve çoğu izolatin lesitinaz negatif olduğunu göstermektedir. TA2 ve TC2 izolatları ise lesitinaz aktivitesi göstermiştir. Bununla birlikte, literatürde lesitinaz pozitif suşların hepsinin zorunlu olarak toksijenik olmadığı belirtilmiştir (Obi, 1980). Test edilen suşların hemolitik kapasitesi sonuçlarına göre sekans ile tanımlanan hiçbir suşun hemolitik aktivite göstermediği fakat TB2 suşu hemolitik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

4.4 *Bacillus* İzolatların Probiyotik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

4.4.1 Safra Toleransı

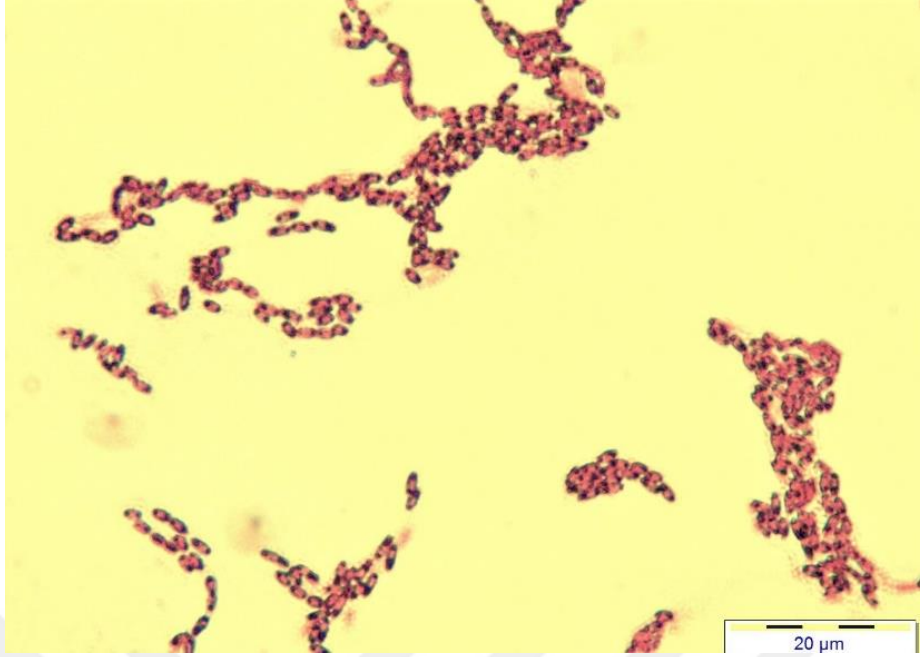
Sindirim sisteminde antimikrobiyal etkili mekanizmalardan bir tanesi de safra tuzlarıdır. Safra asidi, karaciğerde kolesterolden sentezlenir ve safra kesesinden konjuge formda on iki parmak bağırsağına gönderilir. Bu asitler, çoğunlukla mikrobiyal aktivite sonucunda kolonda kimyasal modifikasyonlara (dekonjugasyon, dehidroksilasyon, dehidrojenasyon ve deglukuronidasyon) uğramakta, bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranlarına zarar vererek inhibitör etkisi yapmaktadırlar. Mikroorganizmaları etkileyen bu özelliğinden dolayı, muhtemel probiyotik suşların bağırsaklarda fonksiyon gösterebilmeleri için safraya karşı dirençli olmaları gerekmektedir . Laboratuvar ortamında probiyotik aday mikroorganizmaların safra tuzlarına toleransı incelenirken genellikle ilgili besiyerindeki %0,2-%1 konsantrasyonlu ortamlarda gelişimi takip edilmektedir. Bu çalışmada da %0,3, %0,5 ve %1 ve %2

konsantrasyonlarındaki safra tuzlu ortamlarda *Bacillus* bakteri suşlarının üremeleri gözlemlenmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda safra tuzu içeren ortamlardaki *Bacillus* suşlarının gelişme değerleri Şekil 4.6 'da verilmiştir.



Şekil 4.6 *Bacillus* izolatlarının safra toleransları

Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus* suşlarının safra tuzları içerisinde iyi üreme gerçekleştirdiği görülmüştür. En iyi gelişmelerin %0,3 ve %0,5 safra tuzu içeren ortamlarda olduğu göze çarpmaktadır. Ayrıca *Bacillus subtilis* türü, *Bacillus coagulans* ve *Bacillus clausii* türlerine göre safra tuzuna karşı daha dirençli bulunmuştur. Benzer çalışmalar *Bacillus* izolatlarının %6 ve %10 safra varlığında bile yüksek sağ kalım oranları gösterdiğini bildirmiştir (Giri vd., 2012; Thankappan vd., 2015).

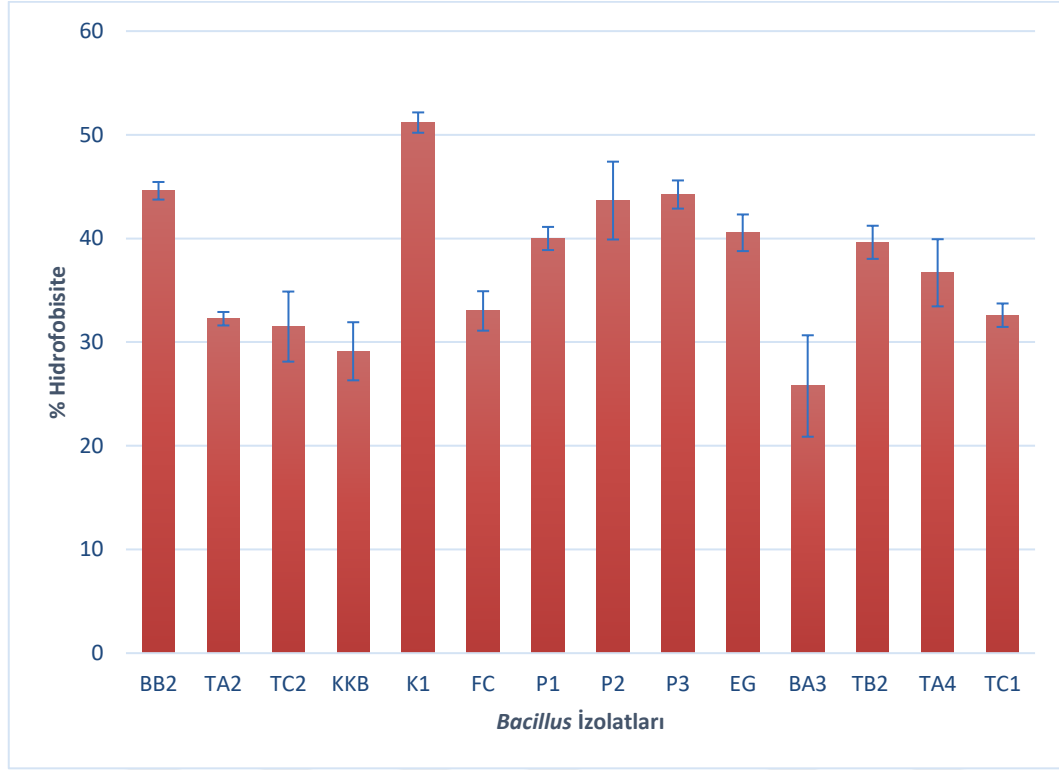


Şekil 4.7 Safra ortamına maruz kalan *Bacillus* türünün mikroskop görüntüsü

4.4.2 Hücre Yüzeyi Hidrofobikliği

Bakteriyel yüzey özellikleri, probiyotik yapılarının bilinmesi için üzerinde çalışılan *in-vitro* özelliklerden biridir. Bakteriyel yüzey özellikleri, çeşitli substratlara bağlanma ile ilişkilendirilmiştir ve bu da hidrofobiklik ile ilişkilidir. Probiyotik suşların gastrointestinal sistemde kolonizasyon için bağırsak epitel hücrelerine tutunması, peristalsis yoluyla eliminasyonu önlemesi ve mikrofloradaki rekabette avantaj sağlaması çok önemlidir (Kos vd., 2003). *Bacillus* suşlarının hidrofobikliği, kloroforma yapışma derecesi kullanılarak değerlendirilmiştir. Test edilen *Bacillus* izolatların % hidrofobisite değerleri %51,18 ile %25,7 arasında farklılıklar göstermiştir (Şekil 4.8). En yüksek yapışma yüzdesi ticari probiyotik üründen elde edilen K1 suşunda gözlenmiştir. Buna en yakın değeri %44,6 ile balık izolatu olan *Bacillus subtilis* BB2 suşu vermiştir. En düşük yapışma yüzdesi, test edilen en yüksek hidrofobisite derecelerinin neredeyse yarısı kadar olan balık izolatu BA3 için gözlemlenmiştir. Genel olarak izolatların hidrofobiklik dereceleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir. Ksilen ve etil asetat gibi çözücüler de başka çalışmalarda kullanılmış ve bu da *Bacillus* suşlarının farklı derecelerde hidrofobikliği ile sonuçlanmıştır.(Nithya ve Halami, 2013; Patel vd., 2009). Bu çalışmada tüm izolatlar, monopolar bir asidik çözücü ve elektron alıcısı olan kloroforma dikkat çekici bir afinite sergilemiştir. Balık ve toprak izolatları

kendi aralarında farklı yapışma dereceleri gösterdiğinden izolatların kaynağı açısından kapsamlı bir karşılaştırmaya olanak sağlayacak genelleştirilmiş sonuçlar elde edilememiştir.

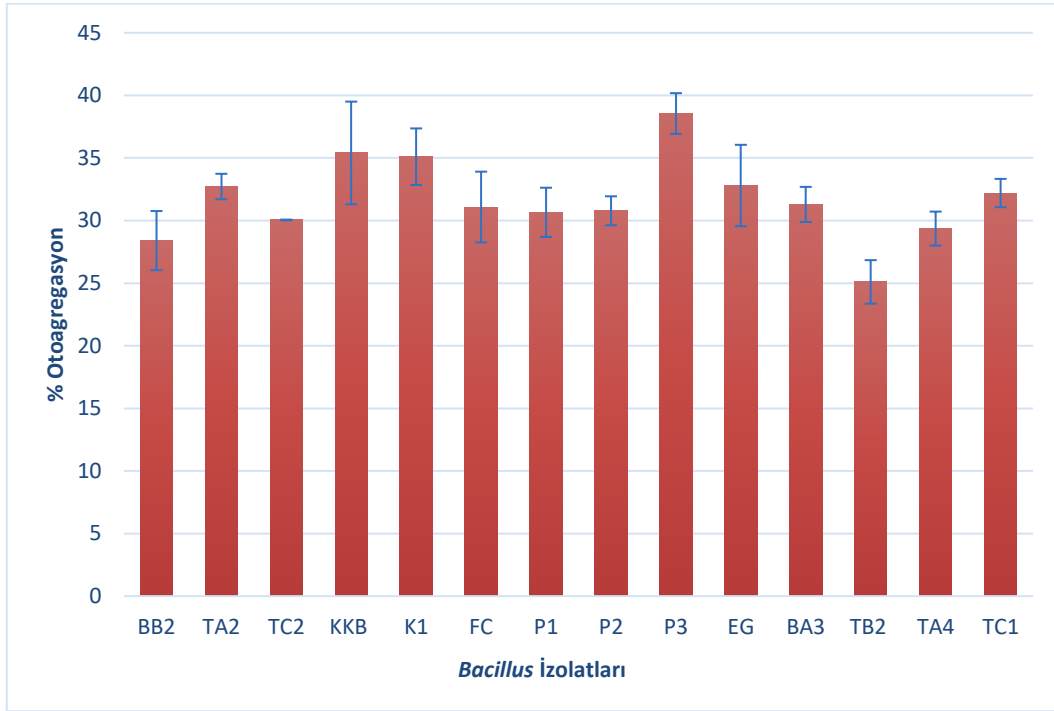


Şekil 4.8 *Bacillus* izolatlarına ait hidrofobisite değerleri

4.4.3 Otoagregasyon

Hidrofobiklik gibi, otoagregasyonda probiyotik türlerinin önemli bir fonksiyonel özelliğidir. Otoagregasyonun hücrenin yapışma özelliğine katkı sağladığı belirtilmiştir (Kos vd., 2003). Genel olarak otoagregasyon yeteneği, hücre yapışma özellikleriyle ilişkilidir ve aynı zamanda gastrointestinal sistemde hayatta kalma ve kalıcı olma yeteneklerini de sağlar (Vlková vd., 2008). İzolatların otoagregasyon aktivitesi %25,1 ile %35,4 arasında değişmektedir (Şekil 4.9). En yüksek otoagregasyon değeri P3, en düşük ise TB2 suşunda kaydedilmiştir. Hücre yüzeyi hidrofobikliği sonucuna benzer şekilde ticari probiyotik suşları daha yüksek otoagregasyon aktivitesi göstermiştir. İzole edilen diğer *Bacillus* suşlarının otoagregasyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Çalışmada balık bağırsağından (BB2) ve topraktan (TA2) izole edilen *Bacillus* suşlarının sırasıyla %32,2 ve %32,7 seviyeleriyle iyi bir otoagregasyon yüzdesi gösterdiği rapor edilmiştir. Diğer çalışmalarda da

belirtildiği gibi bu özellikler, *Bacillus*'un gastrointestinal sistemde kolonizasyonunu ve patojenlere karşı rekabeti sağlayabilmektedir (Thankappan vd., 2015). Collado vd. (2007), agregasyonun gıda, insan veya hayvan kullanımına uygun güçlü probiyotik suşları belirlemede ön tarama için yararlı olduğunu belirtmiştir (Collado vd., 2007).



Şekil 4.9 *Bacillus* izolatlarına ait otoagregasyon değerleri

4.4.4 Antibiyotik Duyarlılık

Probiyotiklerin güvenliği birincil öneme sahiptir. Probiyotiklerin, antibiyotiklere karşı dirençleri olası tehditlerden biri olabilmektedir. Aktarılabılır antibiyotik direnç genlerinin varlığı bir güvenlik tehlikesi oluşturmaktadır (Sharma vd., 2014). *Bacillus* izolatlarına ait antibiyotik inhibisyon zonları (cm) Tablo 4.7’de verilmiştir. İnhibisyon zonlarına göre bakteriler Dirençli 0–0,5 cm; Duyarlı+ 0,6–1,5 cm; Duyarlı++ 1,6–2,5 cm; Duyarlı+++ 2,6–3,5 cm olarak değerlendirilmiştir (Nithya ve Halami, 2013). İzolatların tamamı tetrasiklin, vankomisin, rifampisin, amoksisilin, penisilin G gibi test edilen tüm antibiyotiklere çeşitli derecelerde duyarlılık göstermiştir (1 cm’den fazla inhibisyon bölgesi). Patel ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada antibiyotiklere karşı duyarlılığın önemli bir probiyotik özellik olduğunu belirtmişlerdir (Patel vd., 2009). Çalışmada incelenen *Bacillus*

izolatlarının antibiyotik direnci göstermemesi, patojeniteyi ve enterotoksin oluşumunu tetikleyen plazmid geninin transfer edilememesi açısından önemli bir bulgudur.

Hemen hemen tüm isolatlar tetrasikline karşı (S+++), Vankomisine karşı (S++) daha duyarlı özellik göstermiştir. Ayrıca isolatların bakteri tipine göre rifampisin, penisilin G ve amoksisilin antibiyotiklerine karşı farklı duyarlılık dereceleri sergiledikleri görülmüştür. Önceki çalışmalar ticari olarak temin edilebilen farklı ticari probiyotik ürünleri incelemiş ve bazılarının belirtilenden farklı bir *Bacillus* türü içerdiğini ve bakterilerin penisilin G, tetrasiklin, rifampin ve ampicilin gibi antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç gösterdiğini bulmuştur (Green vd., 1999; Hoa vd., 2000; Senesi vd., 2001).

Tablo 4.7 *Bacillus* suşlarının antibiyotiklere karşı dirençleri (cm)

Örnek kodları	Bakteri türü	Vankomisin	Rifampin	Penisilin	Amoksisilin	Tetrasiklin
BB2	<i>Bacillus subtilis</i>	2,10±0,00 ^a	2,60±0,14 ^{bc}	2,25±0,07 ^{abc}	2,75±0,07 ^{ab}	2,45±0,07 ^{bcd}
TA2	<i>Bacillus subtilis</i>	2,05±0,07 ^a	3,05±0,07 ^a	1,85±0,07 ^{cdef}	2,85±0,07 ^a	3,05±0,07 ^a
TC2	<i>Bacillus subtilis</i>	2,00±0,14 ^a	2,45±0,07 ^c	2,05±0,07 ^{bcdef}	2,30±0,00 ^{abcd}	2,50±0,00 ^{bcd}
KKB	<i>Bacillus coagulans</i>	1,85±0,21 ^{ab}	1,55±0,07 ^{ef}	1,55±0,07 ^{efg}	1,55±0,07 ^{def}	2,65±0,07 ^{abc}
K1	<i>Bacillus subtilis</i>	1,85±0,07 ^{ab}	1,40±0,00 ^{fg}	1,50±0,0 ^{fg}	1,55±0,07 ^{def}	2,55±0,07 ^{bc}
FC	<i>Bacillus coagulans</i>	1,90±0,14 ^a	1,60±0,00 ^{ef}	1,65±0,07 ^{defg}	1,65±0,07 ^{cdef}	2,55±0,07 ^{bc}
P1	<i>Bacillus subtilis</i>	2,15±0,21 ^a	2,00±0,14 ^d	1,85±0,21 ^{cdef}	2,40±0,42 ^{abc}	2,90±0,14 ^{ab}
P2	<i>Bacillus coagulans</i>	2,05±0,07 ^a	2,70±0,14 ^{abc}	2,75±0,07 ^a	2,80±0,14 ^a	2,40±0,14 ^{cd}

Tablo 4.7 *Bacillus* suşlarının antibiyotiklere karşı dirençleri (cm) (devamı)

P3	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	1,40±0,14 ^{bc}	1,45±0,07 ^{efg}	2,10±0,00 ^{bcde}	2,40±0,14 ^{abc}	2,45±0,07 ^{bcd}
EG	<i>Bacillus clausii</i>	1,75±0,07 ^{ab}	2,50±0,00 ^{bc}	1,75±0,35 ^{cdef}	2,25±0,35 ^{abcd}	2,90±0,14 ^{ab}
BA3	<i>Bacillus spp</i>	2,05±0,07 ^a	2,85±0,07 ^{ab}	2,45±0,21 ^{ab}	2,35±0,21 ^{abc}	2,60±0,14 ^{abc}
TB2	<i>Bacillus spp</i>	2,00±0,14 ^a	1,40±0,14 ^{fg}	1,15±0,21 ^{fg}	1,35±0,07 ^{ef}	2,35±0,07 ^{cd}
TA4	<i>Bacillus spp</i>	0,95±0,07 ^{cd}	1,15±0,07 ^{gh}	0,90 ±0,00 ^h	0,90±0,14 ^f	2,25±0,07 ^{cd}
TC1	<i>Bacillus spp</i>	1,85±0,07 ^{ab}	2,65±0,07 ^{bc}	2,10±0,14 ^{bcde}	2,30±0,00 ^{abcd}	2,55±0,07 ^{bc}

*Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. – İnhibisyon zonu olmadığını göstermektedir.

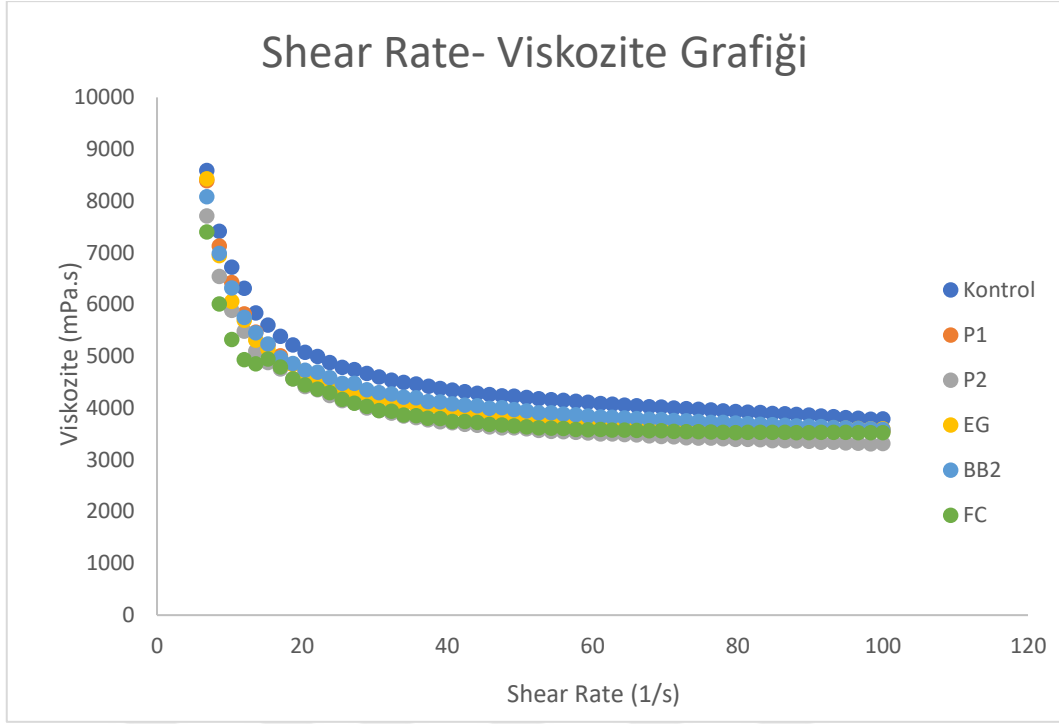
**Farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençleri arasında istatistiksel farklılığın bulunduğunu gösterir ($p<0,05$).

4.5 Probiyotik Yumuşak Jelly Şekerlemelerin Özellikleri

Probiyotik yumuşak şekerlemeler bakterisiz kontrol numunesiyle birlikte toplamda 6 çeşit yumuşak şekerleme olmak üzere 3 farklı ticari suş (P1: *Bacillus subtilis* DE111, P2: *Bacillus coagulans* BC99, EG: *Bacillus clausii* Enterogermina) ve probiyotik özellikler açısından öne çıkan, 2 izolat (*Bacillus subtilis*: BB2 ve *Bacillus coagulans*: FC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Probiyotik yumuşak şekerleme üretimi metotlarda belirtildiği gibi gerçekleştirilerek kalıplara dökülmeden önce reolojik analizleri gerçekleştirilmiş ve üretimden sonra son ürün analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.5.1 Yumuşak Şekerlemelerin Reolojik Özellikleri

Üretilen yumuşak şekerleme örneklerinin depozit sıcaklığında (50°C)'de akış davranış özelliklerini belirleyebilmek için yatışkan faz (steady state) reolojik özellikleri belirlenmiştir. Şekil 4.10'dan görüleceği üzere hem kontrol numunesinde hem de probiyotik içeren numunelerde artan kesme hızıyla (shear rate) birlikte viskozitede düşüş gözlemlenmiştir. Bu sonuç üretilen yumuşak şekerlemelerin pseudoplastik yapısı nedeniyle beklenen karakteristikte gerçekleşmiştir. Artan kesme hızıyla birlikte moleküler yapıda hareketlilik meydana gelmiş ve düşük kesme hızı bölgelerinde shear thinning gözlemlenmiştir. Fakat kontrol grubuna kıyasla probiyotik içeren numunelerdeki düşüş artan kesme hızlarıyla birlikte daha fazla gözlemlenmiştir. Probiyotik içeren numunelerde viskozitede meydana gelen bu farkın bakterilerin ilave edilmesi esnasında 5mL sıvı içerisinde çözdürülerek ilave edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek kesme hızı oranlarında probiyotik içeren numuneler hemen hemen benzer viskozite değerleri göstermiştir.



Şekil 4.10 Probiyotik yumuşak şekerlemelere ait shear rate-viskozite grafiği

Kayma hızı ve kayma gerilimi verilerinin model denkleminde uyarlanmasıyla elde edilen Herschel–Bulkley modelinin parametreleri Tablo 4.8 'de verilmiştir. Numunelerin akma gerilimi ve kararlılık indeks değerleri 26,91-30,52 Pa ile 4,16-4,49 Pa sⁿ arasında değişmiştir. Numunelerin akma gerilimi ve tutarlılık katsayıları arasında anlamlı fark gözlemlenmemiştir. Bu iki parametre kalıplama işlemi sırasında numunelerin depozitlenmesinde, aroma ve asit ilavesi sırasında numunelerin karıştırılmasında ve numunelerin kalıba yayılma aşamasında önem taşımaktadır. Numunelerin üretim sürecinde herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır. Tüm numunelerin reolojik özellikleri işlenebilirliğe uygunluğunu göstermektedir.

Tablo 4.8 Herschel–Bulkley model parametreleri

	σ_0 (Pa)	K (Pa s ⁿ)	n	R^2
Kontrol	26,91±7,25 ^a	4,49±0,65 ^a	0,945±0,04 ^a	0,99±0,00 ^a
P1	30,52±4,36 ^a	4,18±0,61 ^a	0,955±0,02 ^a	0,99±0,00 ^a
P2	27,29±7,79 ^a	4,48±0,66 ^a	0,945±0,04 ^a	0,99±0,00 ^a
EG	27,51±2,94 ^a	4,40±0,16 ^a	0,955±0,01 ^a	0,99±0,00 ^a
BB2	26,76±1,75 ^a	4,16±0,55 ^a	0,960±0,03 ^a	0,99±0,00 ^a
FC	27,43±0,81 ^a	4,43±0,17 ^a	0,950±0,01 ^a	0,99±0,00 ^a

4.5.2 Yumuşak Şekerlemelerin Mikrobiyolojik Özellikleri

Üretilen yumuşak şekerlemelerin bakteri sayımları Tablo 4.9 'da verilmiştir. Tüketicilere sağlık açısından fayda sağlamak için gereken minimum probiyotik mikroorganizma sayısının 10⁶ kob/g'dan yüksek olması gerekmektedir (Abedinia vd., 2021; Donnet-Hughes vd., 1999; Kailasapathy ve Chin, 2000). 1. gün bakteri sayımı sonuçlarına göre yumuşak şeker örneklerinin tamamının probiyotik özellik taşıyacak gerekli canlı mikrobiyal sayıya ulaştığı görülmüştür. *Bacillus* P1, P2, EG ve BB2 suşlarını içeren yumuşak şekerler depolama süresi boyunca probiyotik özelliklerini korumuştur. Yalnızca FC kodlu *Bacillus coagulans* izolatını içeren yumuşak şekerleme örneklerinin sayım sonuçları bu sınırdan düşük kalmıştır. Yumuşak şekerleme üretimi yüksek sıcaklık ve asitlik ile gerçekleştirildiğinden, üretim ve depolama sırasında bakterilerin dayanıklılığının korunması önemlidir. Bakteri sporları aşırı çevre koşullarında hayatta kalmanın bir yolu olarak üretilir (Nicholson vd., 2000). Termal stabiliteleri ve zorlu koşullarda hayatta kalabilme yetenekleri, *Bacillus* türlerinin probiyotik olarak kullanımlarını cazip hale getirmiştir (Cutting, 2011). Bulgulara göre *Bacillus* türlerinin bu yüksek hayatta kalma değerleri, onları fonksiyonel probiyotik yumuşak şekerleme üretimi için önemli adaylar haline getirmektedir.

Tablo 4.9 Üretilen yumuşak şekerlemelerde bakteri canlılığının tespiti

Yumuşak şekerleme ürünü	Hazırlanan karışım miktarı (g)	Eklenen bakteri miktarı (log kob/g)	Son ürünlerdeki bakteri miktarı (log kob/g)			
			1. gün	15. gün	45. gün	90. gün
Kontrol	600	0	0	0		
P1	600	10,15±0,11	8,09±0,31 ^{Aa}	7,81±0,30 ^{ABa}	7,63±0,06 ^{ABa}	7,02±0,07 ^{Ba}
P2	600	10,01±0,05	7,56±0,72 ^{Aab}	7,51±0,21 ^{Aa}	6,96±0,16 ^{Ab}	6,74±0,04 ^{Ab}
EG	600	9,43±0,14	7,26±0,24 ^{Aab}	7,09±0,36 ^{Aa}	6,46±0,15 ^{Bc}	6,06±0,10 ^{Bc}
BB2	400	9,42±0,37	7,39±0,21 ^{Aab}	7,33±0,25 ^{Aa}	7,40±0,02 ^{Aa}	7,19±0,01 ^{Aa}
FC	400	8,40±0,07	6,52±0,47 ^{Ab}	5,99±0,09 ^{ABb}	5,90±0,17 ^{ABd}	5,80±0,17 ^{Bc}

* Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel farklılığın bulunduğunu gösterir ($p<0,05$).

4.5.3 Yumuşak Şekerlemelerin *in-vitro* Gastrointestinal Sisteme

Dayanıklılığı

Probiyotiklerin etkisini gösterebilmesi için sindirimi simüle eden *in-vitro* çalışmaların yapılması önemlidir (Campos vd., 2019). Simüle edilmiş gastrik ve enterik sıvılara direnç, suş probiyotik potansiyelinin değerlendirilmesi için sıklıkla önerilen *in-vitro* testler arasındadır (Buriti vd., 2010; Gbassi vd., 2011). Nihai ürünlerdeki probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal koşullara karşı toleransının kontrol edilmesi, özellikle gastrointestinal sistem koşullarına daha fazla duyarlı olan bakteriler için uygun bir gıda matrisinin seçilmesine yardımcı olabilir ve gastrointestinal sistemde probiyotik hayatta kalma ve etkinliğe katkıda bulunabilir (Buriti vd., 2010; Schillinger vd., 2005)

Simüle edilmiş gastrointestinal sistem sıvılarına maruz bırakılan yumuşak şekerleme ürünlerine ilave edilen probiyotik özelliklere sahip mikrobiyal suşların hayatta kalma oranları, her ürünün depolanma süresince belirlenmiştir (Tablo 4.10).

Yumuşak şekerlemelerdeki probiyotik bakterilerin gastrointestinal sistem koşullarında canlılık yüzdeleri %90'ın üzerinde bulunmuştur. Örnekler 1. gün kendi içlerinde kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Depolamaya bağlı olarak ise P1 kodlu örnekte 15., 45. ve 90. günlerde ufak bir azalma gözlemlenirken, diğer yumuşak şekerlemeler depolamaya bağlı olarak anlamlı derecede farklılık göstermemiştir.

Üretime eklenen *Bacillus* cinsi bakterilerinin nihai ürün içerisinde yüksek canlılık oranları göstermesi, yumuşak şekerlemenin probiyotik etkinliği açısından oldukça önem taşımaktadır.

Tablo 4.10 Üretilen yumuşak şekerlemelerdeki probiyotiklerin gastrointestinal sistem içerisindeki canlı kalım yüzdeleri

	% Canlılık			
	1. gün	15. gün	45. gün	90. gün
P1	96,20±1,65 ^{Aab}	94,74±0,81 ^{ABab}	94,93±0,60 ^{ABa}	93,22±0,24 ^{Ba}
P2	96,93±1,06 ^{Aa}	95,01±2,42 ^{Aab}	94,93±3,95 ^{Aa}	94,46±1,01 ^{Aa}
EG	90,13±1,97 ^{Ab}	91,40±0,79 ^{Aab}	91,32±1,16 ^{Aa}	90,36±2,62 ^{Aa}
BB2	96,88±1,18 ^{Aa}	95,60±1,56 ^{Aa}	94,95±2,01 ^{Aa}	93,45±1,43 ^{Aa}
FC	92,20±4,58 ^{Aab}	90,84±1,93 ^{Ab}	90,56±3,73 ^{Aa}	91,37±3,16 ^{Aa}

* Farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel farklılık olduğunu ($p<0,05$), farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

4.5.4 Yumuşak Şekerlemelerin Fizikokimyasal Özellikleri

Üretim sonrası yumuşak şekerlerin briks değerleri $83,50\pm0,42$ ile $83,15\pm0,07$ arasında değişmiştir ve aralarında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). °Briks ve pH gibi fiziksel parametreler genellikle şekerleme fabrikalarında hidrasyon derecesini kontrol etmek için ölçülür (Kia, Ghaderzadeh, Langroodi, Ghasempour & Ehsani, 2020). Yumuşak şekerlemelerin Briks içeriği genel olarak 65° Briks'ten yüksek olmakla birlikte literatürde bu değerler genellikle 75-85 aralığında yoğunlaşmıştır (Delgado & Bañón, 2015; Kia vd., 2020; Kumar, Chauhan, & Giridhar, 2020). Üretilen kontrol grubu ile probiyotik içeren yumuşak şekerler pH açısından kıyaslandığında, Tablo 4.11 'de görüldüğü üzere, probiyotik içeren yumuşak şekerlemelerin pH değeri kontrol grubuna nazaran bir miktar fazla çıkmıştır. pH'da meydana gelen bu farklılığın nedeni üretim esnasında içerisine ilave edilen sitrik asitin probiyotiklerin zarar görmesini engellemek amacıyla probiyotikli üretimlere daha az ilave edilmiş olmasından ileri gelmektedir. Probiyotikli yumuşak şekerlemeler ise kendi içlerinde kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülmemiştir ($p>0,05$).

Su aktivitesi, a_w , üretilen yumuşak şekerlerde $0,63 \pm 0,013$ ile $0,61 \pm 0,002$ arasında değişmektedir. Değerlendirilen gruplar içerisinde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Bu değerler nihai ürün kalitesi için güvenlidir ve bu değer 0,55 ile 0,75 arasında olmalıdır (Ergun vd., 2010). Su aktivitesi, bir ürünün serbest olan ve bu nedenle mikrobiyal gelişme ve ürün stabilitesini etkileyebilecek farklı kimyasal reaksiyonlar için uygun olan toplam nem fraksiyonunu gösterir (Periche vd., 2014). Bu nedenle, depolama esnasında yumuşak şekerlerin su emilimi ve su kaybı yaşamaması için uygun şekilde muhafaza edilmiştir.

Tablo 4.11 Üretilen yumuşak şekerlemelerin pH ve su aktivitesi değerleri

	pH	a_w
Kontrol	$2,94 \pm 0,007^b$	$0,63 \pm 0,004^a$
P1	$3,13 \pm 0,007^a$	$0,63 \pm 0,013^a$
P2	$3,15 \pm 0,071^a$	$0,63 \pm 0,002^a$
EG	$3,20 \pm 0,021^a$	$0,62 \pm 0,004^a$
BB2	$3,19 \pm 0,007^a$	$0,62 \pm 0,004^a$
FC	$3,17 \pm 0,014^a$	$0,62 \pm 0,007^a$

*Aynı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılığın bulunmadığını gösterir ($p>0,05$).

Gıda ürünlerinin, özellikle yumuşak ürünlerinin, renk özellikleri, tüketicinin kabul edilebilirliğinin hayati bir bileşeni olarak ilk izlenimi belirleyebilen önemli kalite parametreleridir. Tablo 4.12 'den görüleceği üzere kontrol grubu ve probiyotik içeren yumuşak şekerlemeler kıyaslandığında L^* değeri açısından önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir. Probiyotik ilavesi yumuşak şekerlemelerin kararması açısından önemli bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. a * ve b * değerleri arasında önemli ölçüde bir fark olmaması renk açısından birbirlerine yakın olduklarını göstermektedir. Renk gıdanın kabul ve ret kriterleri açısından

değerlendirilmesi gereken önemli bir parametre olup duyuusal açıdan da değerlendirilmesi gerekmektedir.

Tablo 4.12 Üretilen yumuşak şekerlemelerin renk özellikleri

	L*	a*	b*
Kontrol	32,63±1,56 ^a	6,85±1,13 ^a	-0,54 ±0,51 ^a
P1	31,49±1,96 ^a	9,33 ±1,63 ^a	0,00 ±0,49 ^a
P2	32,34±0,63 ^a	8,82 ±1,19 ^a	1,02±1,65 ^a
EG	31,94±0,90 ^a	8,85 ±0,37 ^a	-0,53 ±0,42 ^a
BB2	31,55±1,22 ^a	8,92 ±1,60 ^a	-0,27 ±0,92 ^a
FC	32,31±1,81 ^a	8,03 ±0,52 ^a	-0,24± 0,17 ^a

*Aynı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılığın bulunmadığını gösterir ($p>0,05$).

Üretilen yumuşak şekerlemelerin protein ve toplam şeker miktarları Tablo 4.13 'te verilmiştir. Probiyotik şekerleme ile kontrol grubu arasında protein oranını etkileyen bileşenlerin içeriği açısından bir fark olmadığından protein yüzdeleri arasında herhangi belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Yumuşak şekerlemeler yüksek protein içeriği ile tüketici tarafından kabul edilebilirliği yüksek olan gıdalardır. Üretilen yumuşak şekerlemelerin protein miktarları %5,50 ile %5,92 arasında değişmiştir. Toplam şeker içerikleri ise %53,03 ile %55,78 arasında değişmekte olup, örnekler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

Tablo 4.13 Üretilen yumuşak şekerlemelerde protein ve toplam şeker miktarları

	Protein (%) *5,30	Toplam şeker (%)
Kontrol	5,61±0,058 ^a	55,30±1,169 ^a
P1	5,86±0,036 ^a	53,74±1,987 ^a
P2	5,66±0,317 ^a	54,92±1,302 ^a

Tablo 4.13 Üretilen yumuşak şekerlemelerde protein ve toplam şeker miktarları
(devamı)

EG	5,50±0,421 ^a	53,03±0,842 ^a
BB2	5,50±0,307 ^a	53,96±2,153 ^a
FC	5,53±0,126 ^a	54,76±1,056 ^a

*Aynı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılığın bulunmadığını gösterir ($p>0,05$).

Sonuçlar değerlendirildiğinde, probiyotik içeriğin incelenen fizikokimyasal parametreleri etkilemediği görülmüştür. Probiyotiklerin endosporlarının kullanılmış olmasıyla inaktif metabolizmaları sayesinde gıda kalitesinin etkilenmediği gözlemlenmiştir (Fares vd., 2015).

4.5.5 Yumuşak Şekerlemelerin Biyoaktif Özellikleri

Yumuşak şekerlemeler doğal renklendiriciler, nutrasötikler ve antioksidanlar gibi farklı biyoaktif bileşiklerle takviye için uygun bir formülasyon olarak belirtilebilmektedir. Üretimde kullanılan meyve özleri gibi bileşenler şekerlemelerin biyoaktif özelliklerini önemli derecede etkilerler. Meyve özlerine ek olarak, konakçıya fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olan probiyotik mikroorganizmalar gibi fonksiyonel bileşenler de sağlığı geliştirmek için şekerlemelerde kullanılabilir (Joint FAO WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2006). Probiyotikler tüketiciler tarafından iyi bilinmekte ve kabul görmektedir. Probiyotik bakteriler insan sağlığına yararlı olan çok sayıda metabolitin üretimini sağlayabilir. Probiyotik bakteri tarafından üretilen bakteriyosinler, metabolik enzimler, amino asitler ve peptitler, kısa zincirli yağ asitleri, vitaminler, antioksidanlar, antiinflamar ve immune-modulating ajanlar ve eksopolisakkaritler biyoaktif bileşenleri oluşturmaktadırlar. Bu moleküler bir bütün olarak bağırsak fonksiyonunu iyileştirmekte ve sağlığa fayda sağlamaktadır. Bu faydayı probiyotik mikroorganizmalardan sağlamak adına yapılacak en önemli iş işleme, paketlenme ve muhafaza esnasında gıda içerisinde mikrobiyal hücrelerin mevcudiyetini sürdürmesini sağlamaktır (Chugh ve Kamal-Eldin, 2020). Probiyotik ilaveli

yumuşak şekerlemelerin biyoaktif özellikleri Tablo 4.14 'te verilmiştir. Tablo incelendiğinde genel olarak probiyotik ilavesinin örneklerin fenolik içeriğini olumlu yönde etkilediği gözlemlenmiştir. Birinci gün ölçümlerinde kontrol numunesinin fenolik içeriği 180,60±6,51mg GAE/kg şeklinde iken en yüksek P1 kodlu *Bacillus subtilis* ilavesiyle üretilen yumuşak şekerlemede (202,80±2,26 mg GAE/kg) görülmüştür. Aynı şekilde antioksidan içeriği de probiyotik ilavesiyle olumlu yönde etkilenmiştir. Probiyotik içerikli yumuşak şekerlerin birinci gün dpph radikal süpürücü aktiviteleri 3,861 ile 4,424 µmol trolox/g arasında değişmektedir.

Tablo 4.14 Yumuşak şekerlemelerin biyoaktif özellikleri

	Toplam Fenolik (mg GAE/kg)	DPPH (µmol trolox/g)
Kontrol	180,60±6,51 ^b	3,861±0,042 ^d
P1	202,80±2,26 ^a	4,412±0,04 ^a
P2	200,00±6,79 ^{ab}	4,070±0,034 ^c
EG	192,40±5,09 ^{ab}	4,166±0,051 ^{bc}
BB2	200,40±5,09 ^{ab}	4,424±0,025 ^a
FC	197,40±3,11 ^{ab}	4,316±0,076 ^{ab}

*Farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar ürünler arasında istatistiksel farklılığın bulunduğunu gösterir ($p<0,05$).

4.5.6 Yumuşak Şekerlemelerin Tekstürel Özellikleri

Üretilen yumuşak şekerlemelerin tekstürel özellikleri Tablo 4.15 – 4.18'de verilmiştir. TPA analizi sonucunda elde edilen sertlik, yapışkanlık, sakızimsılık ve esneklik değerleri incelenmiştir.

Sertlik (Hardness) TPA analizinden elde edilen en önemli duyuşal parametrelerden biridir. Gıdanın ağızda uyandırdığı hissi değerlendirmede kullanılır ve de belirli bir deformasyonu meydana getirmek için uygulanması gereken kuvvet olarak tanımlanır (Garrido vd., 2015; Kek vd., 2013). Kontrol grubundan elde edilen sertlik sonuçları ve probiyotik ilavesi sonrası numunelerden elde edilen sertlik

sonuçları incelendiğinde örnekler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Tablo 4.15). Bu da probiyotik ilavesinin yapıdaki sıkılığı (firmness) kayda değer bir şekilde değiştirmediği şekilde değerlendirilebilir. Numunelerin ilk günkü sertlik değerleri $5,18 \pm 0,59$ N ile $5,02 \pm 0,10$ N arasında değişmekle birlikte depolamaya bağlı olarak küçük bir artış gözlenmiştir. Kontrol ve *B. coagulans* içeren P2 kodlu ürünlerde depolamaya bağlı olarak istatistiksel fark gözlemlenmiştir.

Tablo 4.15 Yumuşak şekerlemelerin sertlik özellikleri

	Sertlik (N)			
	1. gün	15. gün	45. gün	90. gün
Kontrol	$5,14 \pm 0,53^{Ba}$	$5,70 \pm 0,23^{ABa}$	$6,01 \pm 0,42^{Aa}$	$6,06 \pm 0,19^{Aa}$
P1	$5,18 \pm 0,59^{Aa}$	$5,55 \pm 0,99^{Aa}$	$5,60 \pm 1,34^{Aa}$	$6,03 \pm 1,47^{Aa}$
P2	$5,05 \pm 0,57^{Ba}$	$5,91 \pm 0,29^{ABa}$	$6,07 \pm 0,63^{ABa}$	$6,27 \pm 0,64^{Aa}$
EG	$5,02 \pm 0,10^{Aa}$	$5,58 \pm 0,56^{Aa}$	$6,44 \pm 0,82^{Aa}$	$6,10 \pm 1,45^{Aa}$
BB2	$5,04 \pm 0,17^{Aa}$	$5,64 \pm 0,74^{Aa}$	$5,39 \pm 0,94^{Aa}$	$5,94 \pm 0,96^{Aa}$
FC	$5,08 \pm 0,56^{Aa}$	$5,83 \pm 0,87^{Aa}$	$5,61 \pm 1,21^{Aa}$	$6,73 \pm 0,59^{Aa}$

* Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel farklılık olduğunu ($p < 0,05$) aynı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılığın bulunmadığını gösterir ($p > 0,05$).

Yapışkanlık (Cohesiveness) değeri ürünün ilk deformasyondan sonra ikinci kez uygulanan bir deformasyon ile ilk deformasyona nazaran (kuvvet zaman diyagramı altında kalan alan kullanılarak) ne ölçüde dayandığını değerlendirmede kullanılmaktadır. Düşük yapışkanlık değerlerinde yumuşak şekerlemenin çiğnenmesi ve yutulması kolaydır. Uzun yıllardır yapışkanlık kabul kriterleri arasında yer alan önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (Kawano vd., 2017). Kontrol numunesi ve probiyotik içeren numuneler yakın yapışkanlık değerlerine sahip bulunmuşlardır. Bununla birlikte sertlik değerlerinin de benzer olması müşteri tarafından olumlu karşılanabilecek nitelikte olduklarını göstermektedir.

Tarafımızdan üretilen mevcut yumuşak şekerlemelerin ilk gün ölçülen iç yapışkanlık değerleri; 0,88 ile 0,91 arasında değişmektedir. Depolama süresince ise Kontrol örneği hariç diğer ürünlerde depolamaya bağlı olarak iç yapışkanlıkta bir azalma söz konusudur.

Tablo 4.16 Yumuşak şekerlemelerin iç yapışkanlık özellikleri

	İç yapışkanlık			
	1. gün	15. gün	45. gün	90. gün
Kontrol	0,91±0,01 ^{Aa}	0,92±0,01 ^{Aa}	0,89±0,03 ^{Aab}	0,88±0,02 ^{Aa}
P1	0,92±0,02 ^{Aa}	0,91±0,01 ^{Aab}	0,87±0,01 ^{Bb}	0,87±0,03 ^{Ba}
P2	0,88±0,02 ^{ABb}	0,92±0,01 ^{Aa}	0,88±0,02 ^{ABb}	0,84±0,03 ^{Ba}
EG	0,91±0,00 ^{Aa}	0,91±0,01 ^{Aab}	0,87±0,01 ^{Bb}	0,86±0,01 ^{Ba}
BB2	0,90±0,01 ^{Aab}	0,91±0,01 ^{Aab}	0,93±0,01 ^{Aa}	0,86±0,02 ^{Ba}
FC	0,91±0,00 ^{Aa}	0,89±0,01 ^{Ab}	0,85±0,03 ^{Bb}	0,85±0,00 ^{Ba}

* Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel farklılık olduğunu ($p<0,05$) farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel farklılığın bulunduğunu gösterir ($p<0,05$).

Sakızımsılık (Gumminess) yarı katı bir gıda ürününü yutulabilir bir duruma getirmek için gerekli enerji olarak tanımlanmaktadır (Szczeniak, 1963) ve yumuşak şekerlemeye ait önemli tekstür karakteristiklerinden biridir. Sakızımsılık, sertlik ve yapışkanlık gibi temel tekstürel özelliklerle ilişkilidir. Sonuçlardan da görüleceği üzere kontrol grubuna nazaran probiyotik içeren yumuşak şekerlemelerin sakızımsılık değerlerinde kayda değer mertebede bir değişiklik meydana gelmemiştir. İlk gün sakızımsılık değerleri 4,39±0,24 N ile 4,89±0,41 N arasında değişmekte olup, örnekler arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte depolamaya bağlı olarak da örneklerin sakızımsılık değerlerinde artış gözlemlenmiştir.

Tablo 4.17 Yumuşak şekerlemelerin sakızımsılık özellikleri

	Sakızımsılık (N)			
	1. gün	15. gün	45. gün	90. gün
Kontrol	4,50±0,19 ^{Ba}	5,23±0,19 ^{ABa}	5,35±0,46 ^{Aa}	5,60±0,45 ^{Aa}
P1	4,56±0,58 ^{Aa}	5,54±0,86 ^{Aa}	4,81±0,87 ^{Aa}	5,71±0,40 ^{Aa}
P2	4,46±0,52 ^{Ba}	5,63±0,36 ^{Aa}	5,98±0,67 ^{Aa}	6,02±0,42 ^{Aa}
EG	4,89±0,41 ^{Ba}	5,65±0,50 ^{ABa}	6,39±0,60 ^{Aa}	6,40±0,59 ^{Aa}
BB2	4,39±0,24 ^{Ba}	5,55±0,35 ^{Aa}	5,67±0,94 ^{Aa}	5,76±0,14 ^{Aa}
FC	4,40±0,14 ^{Ba}	5,72±0,44 ^{Aa}	6,04±0,59 ^{Aa}	6,11±0,40 ^{Aa}

* Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel farklılık olduğunu ($p<0,05$) aynı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılığın bulunmadığını gösterir ($p>0,05$).

Esneklik (Resilience) değerleri, gıdalarda deformasyon ortadan kaldığı zaman hız ve dayanım açısından ne ölçüde tekrardan eski durumuna döndüğünün ölçüsüdür. Örneklerin ilk günlük esneklik değerleri $0,59\pm0,03$ ile $0,53\pm0,00$ arasında değişmiştir. Esneklik açısından da kontrol numunesi ve probiyotik içeren yumuşak şekerlemeler arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Genel olarak kontrol yumuşak şekerlemenin esneklik değerleri daha yüksek bulunmuştur. Depolamaya bağlı olarak ise genel olarak (*B. coagulans* içeren FC kodlu yumuşak şekerleme dışında) örneklerin esneklik değerlerinde azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlarla birlikte genel değerlendirme yapıldığında, gıda endüstrisinde, her şirket kendi müşteri tercihlerine uygun jelly ürünlerinin tekstürel özelliklerini belirlemekte ve bu nedenle literatürde veya pazarda genel olarak kabul edilmiş tekstürel parametreler bulunmamaktadır.

Tablo 4.18 Yumuşak şekerlemelerin esneklik özellikleri

	Esneklik			
	1. gün	15. gün	45. gün	90. gün
Kontrol	0,59±0,03 ^{Aa}	0,57±0,02 ^{Aa}	0,54±0,04 ^{ABa}	0,50±0,03 ^{Ba}
P1	0,57±0,03 ^{Aabc}	0,58±0,02 ^{Aa}	0,55±0,01 ^{ABa}	0,51±0,03 ^{Ba}
P2	0,54±0,01 ^{Abc}	0,57±0,02 ^{Aa}	0,55±0,01 ^{Aa}	0,49±0,02 ^{Ba}
EG	0,58±0,02 ^{Aab}	0,58±0,01 ^{Aa}	0,52±0,02 ^{Bab}	0,49±0,01 ^{Ba}
BB2	0,54±0,02 ^{Abc}	0,51±0,01 ^{ABb}	0,49±0,04 ^{ABab}	0,48±0,03 ^{Ba}
FC	0,53±0,00 ^{Ac}	0,49±0,02 ^{Ab}	0,47±0,04 ^{Ab}	0,46±0,04 ^{Aa}

* Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel farklılık olduğunu ($p<0,05$) farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel farklılığın bulunduğunu gösterir ($p<0,05$).

4.5.7 Yumuşak Şekerlemelerin Duyusal Özellikleri

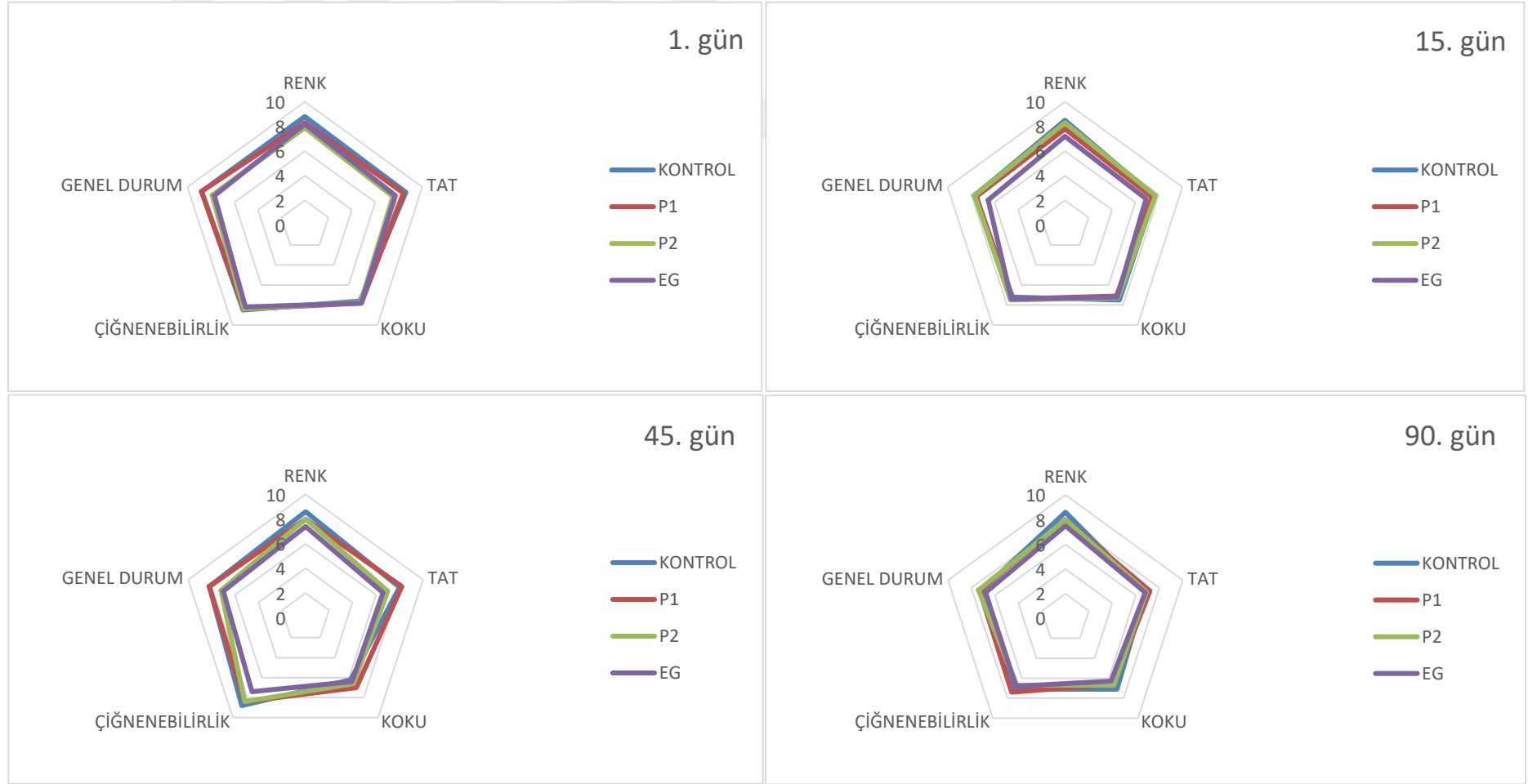
Geliştirilen yumuşak şekerlemelere ait duyusal analiz sonuçları Tablo 4.19’da verilmiştir. Tablo incelendiğinde görüldüğü üzere genel beğenilirlik en çok kontrol ve *Bacillus subtilis* içeren P1 kodlu üründe bulunmuştur. Genel kabul edilebilirlik 8,8 ile 6,6 arasında değişmekte olup, probiyotik ilavesinin yumuşak şekerlemeyi olumsuz etkilemediği görülmüştür. Aynı ürünlerde depolamaya bağlı olarak istatistiksel fark gözlemlenmiştir. Kontrol ve P1 kodlu yumuşak şekerleme ürününün 90. gün genel kabul edilebilirlik değerlerinde azalma kaydedilmiştir. Bununla birlikte aynı depolama gününde kontrol ve farklı probiyotikli yumuşak şekerleme ürünleri arasında istatistiksel bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). Tat özellikleri incelendiğinde genel olarak beğenilmekle birlikte diğerlerine göre daha az beğenilen ürünlerin *Bacillus coagulans* ve *Bacillus clausii* içeren P2 ve P3 kodlu yumuşak şekerlemelerin olduğu tespit edilmiştir. Üretilen yumuşak şekerlerde çiğnenebilirlik özellikleri tekstür analiz sonuçlarından sakızimsılık değerinden de gözlemlendiği gibi aynı günlerde farklı ürünlerin ortalamalarında fark

bulunmayacak şekilde sonuçlara yansımıştır. Yumuşak şekerlerin koku özellikleri beğenilmekle beraber, aralarında önemli derecede fark gözlemlenmemiştir. Yumuşak şekerlerin renk değerleri incelendiğinde ise kontrol numunesinin renk beğenilirliği diğer yumuşak şekerlemelere göre yakın bulunmuştur, aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Genel olarak değerlendirildiğinde ise üretilen probiyotik yumuşak şekerlemelerin kabul görececek iyi duyuşal özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Örnekler arasında yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre örneklerin aynı depolama gününde kendi aralarında önemli fark gözlemlenmemiştir. Aynı örnekler depolamaya göre değerlendirildiğinde ise, renk, tat, koku açısından farklılık gözlemlenmemiştir.

Tablo 4.19 Yumuşak şekerlemelerin duyuşal özellikleri

	GÜN	RENK	TAT	KOKU	ÇİĞNENEBİLİRLİK	GENEL DURUM
KONTROL	1	8,8±0,79 ^{Aa}	8,6±1,35 ^{Aa}	7,9±1,52 ^{Aa}	8,5±1,84 ^{Aa}	8,8±1,40 ^{Aa}
	15	8,5±1,18 ^{Aa}	7,6±1,17 ^{Aa}	7,9±1,29 ^{Aa}	7,2±1,81 ^{Aa}	7,7±1,16 ^{ABa}
	45	8,6±1,36 ^{Aa}	8,0±1,90 ^{Aa}	6,9±1,51 ^{Aa}	8,8±1,47 ^{Aa}	8,2±1,33 ^{ABa}
	90	8,6±0,66 ^{Aa}	6,8±1,47 ^{Aa}	7,1±1,45 ^{Aa}	7,1±0,83 ^{Aa}	7,2±0,98 ^{Ba}
P1	1	8,3±0,95 ^{Aa}	8,4±1,35 ^{Aa}	7,8±1,40 ^{Aa}	8,4±1,58 ^{Aa}	8,8±1,32 ^{Aa}
	15	7,8±1,32 ^{Aa}	7,4±1,43 ^{Aa}	7,1±1,60 ^{Aa}	7,4±1,07 ^{Aa}	7,6±1,01 ^{ABa}
	45	8,0±1,67 ^{Aa}	8,2±0,75 ^{Aa}	7,0±1,41 ^{Aa}	8,4±1,20 ^{Aa}	8,2±0,75 ^{ABa}
	90	8,0±0,89 ^{Aa}	7,2±1,33 ^{Aa}	6,6±1,56 ^{Aa}	7,4±0,92 ^{Aa}	7,3±1,10 ^{Ba}
P2	1	7,9±0,95 ^{Aa}	7,5±1,35 ^{Aa}	7,7±1,40 ^{Aa}	8,4±1,58 ^{Aa}	7,9±1,32 ^{Aa}
	15	8,3±0,95 ^{Aa}	7,7±1,16 ^{Aa}	7,3±1,42 ^{Aa}	7,5±1,08 ^{ABa}	7,7±1,09 ^{Aa}
	45	8,0±1,76 ^{Aa}	7,0±0,94 ^{Aa}	6,6±1,71 ^{Aa}	8,4±1,43 ^{Aa}	7,2±1,03 ^{Aa}
	90	8,0±0,82 ^{Aa}	6,9±1,45 ^{Aa}	6,7±1,49 ^{Aa}	6,7±1,49 ^{Ba}	7,4±1,35 ^{Aa}
EG	1	8,2±1,23 ^{Aa}	7,7±1,64 ^{Aa}	7,8±1,69 ^{Aa}	7,8±1,62 ^{Aa}	7,7±1,57 ^{Aa}
	15	7,2±1,69 ^{Aa}	6,9±0,99 ^{Aa}	6,8±1,14 ^{Aa}	7,0±0,82 ^{Aa}	6,6±1,42 ^{Aa}
	45	7,4±1,26 ^{Aa}	6,6±0,84 ^{Aa}	6,4±1,96 ^{Aa}	7,4±1,26 ^{Aa}	7,0±0,94 ^{Aa}
	90	7,5±1,27 ^{Aa}	6,8±1,75 ^{Aa}	6,3±1,77 ^{Aa}	6,8±1,23 ^{Aa}	6,8±1,62 ^{Aa}

*Aynı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olmadığını, aynı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılığın bulunmadığını gösterir ($p>0,05$).



Şekil 4.11 Üretilen yumuşak şekerlemelerin duyu özellikleri

Probiyotik mikroorganizmaların sağlığa yararından dolayı birçok gıdanın zenginleştirilmesi amacıyla kullanıldığı bilinmekte ancak probiyotik yumuşak şekerleme üretimi ülkemizde ticari olarak gerçekleştirilmemektedir. Bu tezde, zorlu sindirim ve çevre koşullarına dayanabilen *Bacillus* bakterileri kullanılarak probiyotik yumuşak şekerleme üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen fonksiyonel yumuşak şekerlemelerin fizikokimyasal, duyuşal, tekstürel ve mikrobiyal özellikleri belirlenerek ve bu şekerlemelerin ticarileşmesi sağlayacak çalışmaları yapmak amaçlanmıştır. Projenin ana materyallerini *Bacillus* bakterileri ve yumuşak şekerleme karışımını oluşturacak olan gıda bileşenleri oluşturmuştur. Öncelikle farklı kaynaklardan (toprak, balık vb) *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilip moleküler tekniklerle (PCR) tanımlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu izolatların probiyotik özellikleri incelenmiş ve üretimde kullanılacak *Bacillus* türleri belirlenip, seçilen bakterilerin sporları elde edilmiştir. Yumuşak şekerlemelerin hazırlanış aşamasında probiyotik mikroorganizma sporları yumuşak şekerleme karışımına inoküle edilerek üretim gerçekleştirilmiştir. Probiyotik canlılığın, gıda ürünü, inoküle edilen bakteri suşu, gıda matrisinin fizikokimyasal özellikleri, oksijen içeriği, depolama koşulları, ortamın asitliği gibi bir dizi faktöre bağlı olduğu bilinen bir gerçek olduğundan bu bağlamda en iyi üretim şartları oluşturulmuştur. Üretilen probiyotik yumuşak şekerleme ürünlerinde fizikokimyasal, mikrobiyolojik, tekstürel, reolojik ve duyuşal analizler gerçekleştirilerek ürün değerlendirilmeleri yapılmıştır. Ayrıca bakteriler spor olarak ürün formülasyonunda kullanılacağı için bakterilerin depolama aşamasındaki durumu veya tüketim aşamasında da aktivasyonu probiyotik ürün açısından önemlidir. Bundan dolayı üretilen yumuşak şekerlemelerde tüketim aşamasını gastrointestinal sistemde simüle eden *in-vitro* ortamlarda depolama süresince bakteri sayımı (canlı kalım tespiti) gerçekleştirilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde;

- Probiyotik içeriğin incelenen fizikokimyasal parametreleri etkilemediği görülmüştür.
- Probiyotiklerin endosporlarının inaktif metabolizmaları sayesinde kullanımından gıda kalitesinin etkilenmediği tespit edilmiştir.
- Reolojik ve tekstürel sonuçların da yine kontrol grubuna oldukça yakın olması probiyotik katkısının yumuşak şekerleme üretimine olumsuz etki etmediğini göstermiştir.
- *Bacillus* probiyotiklerinin dirençli sporları sayesinde üründeki probiyotikler 90 günlük depolama boyunca yüksek canlılık ve *in-vitro* gastrointestinal sistem dayanıklılığı göstermiştir.
- Üretilen probiyotik yumuşak şekerlemeler ayrıca iyi duyuşal özellikler göstermiş ve panelistler tarafından oldukça beğeni görmüştür. Jelly şekerleme ürünü mükemmel bir taşıyıcı özellik göstermiştir.
- Bu tez çalışması ile birlikte sert/zorlu sindirim ve çevre şartlarına dayanabilen *Bacillus* bakterileri kullanılarak probiyotik yumuşak şekerleme üretimi istenen düzeyde gerçekleştirilmiştir.
- Bunlarla birlikte bu çalışmada spor oluşturma özelliğine sahip *Bacillus* cinsi kullanılmıştır. Bu cinsi tanımlayan temel özellikler endosporları ve gram-pozitif hücre duvarını oluşturma kapasitesidir. Sporlu bakteriler, spor oluşturmayan bakterilere karşı sıcaklık, çevresel ve kimyasal faktörlere karşı önemli ölçüde daha dirençli hale getiren özel bir protein kaplaması içerir. Sporların vejetatif formdaki mikroorganizmalara göre yüksek dayanıklılığı ve dormansi durumu; genel bir test veya üretim ortamında, konsantre probiyotik sporlara veya probiyotik sporlar içeren örneklerle maruziyeti arttıran önemli bir faktördür. Bununla birlikte, sporların esnek doğası, ürünün ve çevresindeki alanların çapraz kontaminasyonunu önlemek için özel dikkat gerektirdikleri anlamına gelir ve bu da aerobik bakteri sayımlarının yüksek çıkması konusunda önem taşımaktadır. Bu bağlamda söz konusu bakterilerin üretim hatlarında kullanımı konusunda ekstra dikkat edilmesi gerekmektedir. Sporlu bakterilerin üretim hattında kullanılmaları birçok düzenleme, doğrulama ve denetleme faaliyetlerini gerektirmektedir.

Sonuç olarak elde edilen çıktıları, tezin başlatılma gerekçe ve hedeflerine uygun olup beklentileri karşılayan nitelikte sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışma, istenilen tekstürel ve duyusal kalitede *Bacillus* türlerini içeren fonksiyonel, probiyotik yumuşak jelly şekerlemelerin üretilebileceğini göstermiştir.



- Abedinia, A., Alimohammadi, F., Teymori, F., Razgardani, N., Saeidi Asl, M. R., Ariffin, F., ... Roslan, J. 2021. "Characterization and Cell Viability of Probiotic/Prebiotics Film Based on Duck Feet Gelatin: A Novel Poultry Gelatin as a Suitable Matrix for Probiotics". *Foods*, 10(8), 1761.
- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., Gálvez, A. 2011. "Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*". *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201-232.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. "Basic local alignment search tool". *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Barbosa, T. M., Serra, C. R., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., Henriques, A. O. 2005. "Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract". *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 968-978.
- Bartkiene, E., Ruzauskas, M., Lele, V., Zavistanaviciute, P., Bernatoniene, J., Jakstas, V., ... Juodeikiene, G. 2018. "Development of antimicrobial gummy candies with addition of bovine colostrum, essential oils and probiotics". *International Journal of Food Science & Technology*, 53(5), 1227-1235.
- Baruzzi, F., Quintieri, L., Morea, M., Caputo, L. 2011. "Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food".
- Bezkorovainy, A. 2001. "Probiotics: determinants of survival and growth in the gut". *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 399S-405S.
- Bilginer, H., Çetin, B. 2019. "Probiyotikler ve Belirlenmelerinde Kullanılan in vitro Testler". *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(3), 312-325.
- Bottone, E. J. 2010. "*Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen". *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382-398.
- Burey, P., Bhandari, B. R., Rutgers, R. P. G., Halley, P. J., Torley, P. J. 2009. "Confectionery Gels: A Review on Formulation, Rheological and Structural Aspects". *International Journal of Food Properties*, 12(1), 176-210.
- Buriti, F. C. A., Castro, I. A., Saad, S. M. I. 2010. "Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions". *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 121-129.
- Campos, P. A., Martins, E. M. F., Martins, M. L., de Oliveira Martins, A. D., de Castro Leite Júnior, B. R., da Silva, R. R., Trevizano, L. M. 2019. "In vitro resistance of *Lactobacillus plantarum* LP299v or *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by vegetable appetizer". *LWT*, 116, 108512.
- Chaiyawan, N., Taveeteptaikul, P., Wannissorn, B., Ruengsomwong, S., Klungsunya, P., Buaban, W., Itsaranuwat, P. 2010. "Characterization and Probiotic Properties of *Bacillus* Strains Isolated from Broiler". *Thai J. Vet. Med.*, 8.

- Chen, K.-N., Chen, M.-J., Shiu, J.-S. 2008. "Development of Probiotic Candies with Optimal Viability by Using Response Surface Methodology and Sequential Quadratic Programming". *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(6), 896-902.
- Chugh, B., Kamal-Eldin, A. 2020. "Bioactive compounds produced by probiotics in food products". *Current Opinion in Food Science*, 32, 76-82.
- Collado, M. C., Grześkowiak, Ł., Salminen, S. 2007. "Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa". *Current Microbiology*, 55(3), 260-265.
- Cutting, S. M. 2011. "Bacillus probiotics". *Food Microbiology*, 28(2), 214-220.
- Çaglar, E., Kavaloglu, S. C., Kuscu, O. O., Sandalli, N., Holgerson, P. L., Twetman, S. 2007. "Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli". *Clinical Oral Investigations*, 11(4), 425-429.
- Delgado, P., Bañón, S. 2015. "Determining the minimum drying time of gummy confections based on their mechanical properties". *CyTA - Journal of Food*, 13(3), 329-335.
- Di Monaco, R., Miele, N. A., Cabisidan, E. K., Cavella, S. 2018. "Strategies to reduce sugars in food". *Current Opinion in Food Science*, 19, 92-97.
- Donnet-Hughes, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J. M., Schiffrin, E. J. 1999. "Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose". *Journal of Dairy Science*, 82(5), 863-869.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J.-P., Raoult, D. 2000. "16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates". *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3623-3630.
- Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., Panwar, H. 2017. "Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives". *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Endres, J. R., Clewell, A., Jade, K. A., Farber, T., Hauswirth, J., Schauss, A. G. 2009. "Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient". *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1231-1238.
- Erdem, Ö., Gültekin-Özgüven, M., Berktaş, I., Erşan, S., Tuna, H. E., Karadağ, A., ... Cutting, S. M. 2014. "Development of a novel synbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus* HU36, maltodextrin and lemon fiber: Optimization by response surface methodology". *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 187-193.
- Erge, A., Zorba, Ö. 2018. "Jelatinin Fonksiyonel Özellikleri ve Gıda Sanayinde Kullanımı". *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 6(7), 840-849.
- Ergun, R., Lietha, R., Hartel, R. W. 2010. "Moisture and shelf life in sugar confections". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(2), 162-192.

- Fares, C., Menga, V., Martina, A., Pellegrini, N., Scazzina, F., Torriani, S. 2015. "Nutritional profile and cooking quality of a new functional pasta naturally enriched in phenolic acids, added with β -glucan and *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086". *Journal of Cereal Science, Complete*(65), 260-266.
- Fuller, R. 2012. "*Probiotics: The scientific basis*". Springer Science & Business Media.
- Garrido, J. I., Lozano, J. E., Genovese, D. B. 2015. "Effect of formulation variables on rheology, texture, colour, and acceptability of apple jelly: Modelling and optimization". *LWT - Food Science and Technology*, 62(1, Part 1), 325-332.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., Gramenzi, A. 2016. "Probiotics History". *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, S116.
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Yolou, F. S., Marchioni, E. 2011. "In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model". *International Dairy Journal*, 2(21), 97-102.
- Giri, S. S., Sukumaran, V., Dangi, N. K. 2012. "Characteristics of Bacterial Isolates from the Gut of Freshwater Fish, *Labeo rohita* that May be Useful as Potential Probiotic Bacteria". *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 238-242.
- Gordon, R. E., Haynes, W. C., Pang, C. H.-N. 1973. "*The Genus Bacillus*". Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture.
- Green, D. H., Wakeley, P. R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S. M. 1999. "Characterization of Two *Bacillus* Probiotics". *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4288-4291.
- Hartel, R. W., Hartel, A. 2014. "*Candy Bites: The Science of Sweets*". New York, NY: Springer New York.
- Hartel, R. W., von Elbe, J. H., Hofberger, R. 2018. "*Confectionery Science and Technology*". Cham: Springer International Publishing.
- Hayward, N. J. 1941. "Rapid Identification of *Cl. welchii* by the Nagler Reaction". *British Medical Journal*, 1(4195), 811-814. Geliş tarihi gönderen <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2161994/>
- Hilliard, N. J., Schelonka, R. L., Waites, K. B. 2003. "*Bacillus cereus* Bacteremia in a Preterm Neonate". *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3441-3444.
- Hoa, N. T., Baccigalupi, L., Huxham, A., Smertenko, A., Van, P. H., Ammendola, S., ... Cutting, S. M. 2000. "Characterization of *Bacillus* Species Used for Oral Bacteriotherapy and Bacterioprophylaxis of Gastrointestinal Disorders". *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5241-5247.
- Hong, H. A., Duc, L. H., Cutting, S. M. 2005. "The use of bacterial spore formers as probiotics". *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 813-835.
- Hull, P. 2010. "*Glucose Syrups: Technology and Applications*". John Wiley & Sons.

- Hyronimus, Le Marrec, Urdaci. 1998. "Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4". *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), 42-50.
- Imeson, A. 2011. *"Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents"*. John Wiley & Sons.
- Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg, J., Mahillon, J. 2003. "The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives". *Environmental Microbiology*, 5(8), 631-640.
- Joint FAO WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (Ed.). 2006. *"Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation ; report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Córdoba, Argentina, 1 - 4 October 2001"*
- Kailasapathy, K., Chin, J. 2000. "Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp". *Immunology and Cell Biology*, 78(1), 80-88.
- Kavitha, M., Raja, M., Perumal, P. 2018. "Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822)". *Aquaculture Reports*, 11, 59-69.
- Kawano, Y., Kiuchi, H., Haraguchi, T., Yoshida, M., Uchida, T., Hanawa, T., A.K, A. I. 2017. "Preparation and Evaluation of Physicochemical Properties of Isosorbide Gel Composed of Xanthan Gum, Locust Bean Gum and Agar for Improving the Patients Adherence". *International Journal of Medicine and Pharmacy*.
- Kek, S. P., Chin, N. L., Yusof, Y. A. 2013. "Direct and indirect power ultrasound assisted pre-osmotic treatments in convective drying of guava slices". *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 495-506.
- Konar, N., Gunes, R., Palabiyik, I., Toker, O. S. 2022. "Health conscious consumers and sugar confectionery: Present aspects and projections". *Trends in Food Science & Technology*, 123, 57-68.
- Koneman, E.W, Allen, S.D., Janda, W.M. 1997. *"Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology"*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins,.
- Kos, B., Susković, J., Vuković, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosić, S. 2003. "Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92". *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 981-987.
- La Ragione, R. M., Casula, G., Cutting, S. M., Woodward, M. J. 2001. "*Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry". *Veterinary Microbiology*, 79(2), 133-142.
- La Ragione, R. M., Woodward, M. J. 2003. "Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens". *Veterinary Microbiology*, 94(3), 245-256.

- Le, H., Wang, X., Wei, Y., Zhao, Y., Zhang, J., Zhang, L. 2022. "Making Polyol Gummies by 3D Printing: Effect of Polyols on 3D Printing Characteristics". *Foods*, 11(6), 874.
- Liserre, A. M., Ré, M. I., Franco, B. D. G. M. 2007. "Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in Modified Alginate-chitosan Beads and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions". *Food Biotechnology*, 21(1), 1-16.
- Logan, N A., De Vos, P. A. U. L. 2009. "*Family Bacillaceae. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" (C. 3, 20).
- Łubkowska, B., Jeżewska-Frąckowiak, J., Sroczynski, M., Dzitkowska-Zabielska, M., Bojarczuk, A., Skowron, P. M., Ciężczyk, P. 2023. "Analysis of Industrial *Bacillus* Species as Potential Probiotics for Dietary Supplements". *Microorganisms*, 11(2), 488.
- Mac Faddin, J. F. 2000. "*Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*". *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Maden, E. A., Altun, C., Ozmen, B., Basak, F. 2018. "Antimicrobial effect of toothpastes containing fluoride, xylitol, or xylitol-probiotic on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* in children". *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 21(2), 134-138.
- Miranda, J. S., Costa, B. V., de Oliveira, I. V., de Lima, D. C. N., Martins, E. M. F., de Castro Leite Júnior, B. R., ... Martins, M. L. 2020. "Probiotic jelly candies enriched with native Atlantic Forest fruits and *Bacillus coagulans* GBI-30 6086". *LWT*, 126, 109275.
- Moghaddas Kia, E., Ghaderzadeh, S., Mojaddar Langroodi, A., Ghasempour, Z., Ehsani, A. 2020. "Red beet extract usage in gelatin/gellan based gummy candy formulation introducing *Salix aegyptiaca* distillate as a flavouring agent". *Journal of Food Science and Technology*, 57(9), 3355-3362.
- Mutlu, C., Tontul, S. A., Erbaş, M. 2018. "Production of a minimally processed jelly candy for children using honey instead of sugar". *LWT*, 93, 499-505.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., Setlow, P. 2000. "Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548-572.
- Nithya, V., Halami, P. M. 2013. "Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources". *Annals of Microbiology*, 63(1), 129-137.
- Obi, S. K. C. 1980. "Lecithinase and Toxin Production in *Bacillus* Species". *Zentralblatt Für Bakteriologie. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten Und Parasitologie*, 246(3), 415-422.
- Olsen, H. S. 1995. "Enzymatic production of glucose syrups". İçinde M. W. Kearsley & S. Z. Dziedzic (Ed.), *Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives* (ss. 26-64). Boston, MA: Springer US.

- Patel, A. K., Ahire, J. J., Pawar, S. P., Chaudhari, B. L., Chincholkar, S. B. 2009. "Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes". *Food Research International*, 42(4), 505-510.
- Periche, A., Heredia, A., Escriche, I., Andrés, A., Castelló, M. L. 2014. "Optical, mechanical and sensory properties of based-isomaltulose gummy confections". *Food Bioscience*, 7, 37-44.
- Posada-Urbe, L. F., Romero-Tabarez, M., Villegas-Escobar, V. 2015. "Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(10), 1879-1888.
- Rhee, K.-J., Sethupathi, P., Driks, A., Lanning, D. K., Knight, K. L. 2004. "Role of Commensal Bacteria in Development of Gut-Associated Lymphoid Tissues and Preimmune Antibody Repertoire¹". *The Journal of Immunology*, 172(2), 1118-1124.
- Rivero, R., Archaina, D., Sosa, N., Leiva, G., Baldi Coronel, B., Schebor, C. 2020. "Development of healthy gummy jellies containing honey and propolis". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(3), 1030-1037.
- Sánchez-Moreno, C. 2002. "Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems". *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.
- Sanders, M. e., Morelli, L., Tompkins, T. a. 2003. "Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 101-110.
- Satapute, P., Olekar, H. S., Shetti, A., Kulkarni, A., Hiremath, G., Patagundi, B. I., ... Kaliwal, B. B. 2012. "Isolation and characterization of nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain as-4 from agricultural soil". *International Journal of Recent Scientific Research*, 3, 762-765.
- Schillinger, U., Guigas, C., Holzapfel, W. H. 2005. "In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products". *International Dairy Journal*, 12(15), 1289-1297.
- Senesi, S., Celandroni, F., Tavanti, A., Ghelardi, E. 2001. "Molecular Characterization and Identification of *Bacillus clausii* Strains Marketed for Use in Oral Bacteriotherapy". *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 834-839.
- Sessler, T., Weiss, J., Vodovotz, Y. 2013. "Influence of pH and soy protein isolate addition on the physicochemical properties of functional grape pectin confections". *Food Hydrocolloids*, 32(2), 294-302.
- Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., Singh, R. 2014. "Antibiotic resistance among commercially available probiotics". *Food Research International*, 57, 176-195.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents". *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sinnelä, M. T., Park, Y. K., Lee, J. H., Jeong, K. C., Kim, Y.-W., Hwang, H.-J., Mah, J.-H. 2019. "Effects of Calcium and Manganese on Sporulation of

- Bacillus Species Involved in Food Poisoning and Spoilage". *Foods* (Basel, Switzerland), 8(4), E119.
- Smith, N. R., Gordon, R. E., Clark, F. E. 1952. "*Aerobic Sporeforming Bacteria*". U.S. Government Printing Office.
- Sorokulova, I. B., Pinchuk, I. V., Denayrolles, M., Osipova, I. G., Huang, J. M., Cutting, S. M., Urdaci, M. C. 2008. "The Safety of Two *Bacillus* Probiotic Strains for Human Use". *Digestive Diseases and Sciences*, 53(4), 954-963.
- Spinosa, M. R., Braccini, T., Ricca, E., De Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., Oggioni, M. R. 2000. "On the fate of ingested *Bacillus* spores". *Research in Microbiology*, 151(5), 361-368.
- Sravan Kumar, S., Singh Chauhan, A., Giridhar, P. 2020. "Nanoliposomal encapsulation mediated enhancement of betalain stability: Characterisation, storage stability and antioxidant activity of *Basella rubra* L. fruits for its applications in vegan gummy candies". *Food Chemistry*, 333, 127442.
- Stephen, A. M., Phillips, G. O., Williams, P. A. (Ed.). 2006. "*Food polysaccharides and their applications*" (2nd ed). Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis.
- Szczesniak, A. S. 1963. "Classification of Textural Characteristics". *Journal of Food Science*, 28(4), 385-389.
- Talebzadeh, S., Sharifan, A. 2017. "Developing Probiotic Jelly Desserts with *Lactobacillus Acidophilus*". *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e13026.
- Thankappan, B., Ramesh, D., Ramkumar, S., Natarajaseenivasan, K., Anbarasu, K. 2015. "Characterization of *Bacillus* spp. From the Gastrointestinal Tract of *Labeo rohita*—Towards to Identify Novel Probiotics Against Fish Pathogens". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 340-353.
- Urdaci, M. C., Bressollier, P., Pinchuk, I. 2004. "*Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities". *Journal of Clinical Gastroenterology*, 38(6 Suppl), S86-90.
- Uusitupa, M. 1994. "Fructose in the diabetic diet". *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(3), 753S-757S.
- Vasdinyei, R., Deák, T. 2003. "Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques". *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 123-130.
- Verma, N., Singh, N., Kumar, N. 2013. "Screening of different media for sporulation of *Bacillus megaterium*". *Int. J. Microbiol. Res. Rev*, 1, 68-73.
- Vlková, E., Rada, V., Šmehilová, M., Killer, J. 2008. "Auto-aggregation and Co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia". *Folia Microbiologica*, 53(3), 263-269.
- Yan, B., Davachi, S. M., Ravanfar, R., Dadmohammadi, Y., Deisenroth, T. W., Pho, T. V., ... Abbaspourrad, A. 2021. "Improvement of vitamin C stability in vitamin gummies by encapsulation in casein gel". *Food Hydrocolloids*, 113, 106414.

A

İZOLATLARIN 16S rRNA GEN DİZİLİMLERİ

EK 1: İzolatların 16S rRNA Gen Dizilimleri

BB2 *Bacillus subtilis*

CGTGGTGC GATACGTCCATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCT
TGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT
GCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACC
ACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGC
TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG
TGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG
TACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TGTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGG
GGAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT
GGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA
TTAGATA CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
GGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGT
CCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATC
TTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGAC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAAC
CGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAG

TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGG
AGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGAGAGT
AGAGCGGAACGG

TA2 *Bacillus subtilis*

CAACGGTGGGGCCCGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGG
AGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG
GATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
ACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAT
GGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
AAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAA
CTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT
CTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGG
ACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGTCATGGTTGTCGTCAG
CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
GATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGC

GAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGAT
CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
CGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTT
TTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCG
TAAGATAGTCGCATATACG

TC2 *Bacillus subtilis*

GCAGGTGCGGGCGTGTCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGA
GCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG
ATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATG
GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
AACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACT
GGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT
CTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
TAGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGAC
GTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGTCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGA
TCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG

ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAA
ACCGCGAGGTAAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGC
AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
CACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTA
GGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAA
CTAGAGCCTTTGG

K1 *Bacillus subtilis*

AGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT
AATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGC
TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG
GAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAAC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTGTC

KKB *Bacillus coagulans*

TTTTAAAAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGC
CTGTAAGATCGGGATAACGCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAG
TTTTTTCCTCCGCATGGAGGAAAAAGGAAAGACGGCTTCGGCTGTCAC
TTACAGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTC
ACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAT
TGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGCCGGGGAAGAACAAGT
GCCGTTCGAACAGGGCGGCGCCTTGACGGTACCCGGCCAGAAAGCCA

CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TGTCCGG

TF6 *Bacillus cereus*

GATTAAGAGCTTAGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGC
GGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC
AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTT
AGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTT

TH4 *Bacillus cereus*

CAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTT
CGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTC
GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA
AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCA
ACCGT

TG6 *Bacillus cereus*

GTATGTGCGGGCGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGC
TTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG
ATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTG
TCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
AACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGTAATACTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCAATTGGAAACT
GGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
CTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAAGCGGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCAAGCACGCGA
AGAACCTTTACCAGTTTTGACATCCTCTGCACCCCAGAGATAGGGTTTT
CCTTGGGAGCAGAGTGACGGTGGTGCAAGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGAATGTGGGTTTAAGTCCCGCCAACCGAGAGCACCCCTTGATTT
TAGTTGCCATCATTAAAGTGGGGCATTTTAAGGTGACTCCCGGTGCCAA
CCCGGAGGAAGGTGGGGATGAGGTCAAATCATCATCCCCCTTATGCCT
TGGGTTCCCCACGTGTTCCAATGGACGGTCCAAAGAGCTGCAAGCCCG
GGAGGTGAAGTTATTTTCATAAACCCGTTTTTCAGTTGGGATTGTAGGCT
GCAATTCCTTCCATGAAGCGGGAATCGTTGGTAATCGGGGATCACCA
TCCCGCGGGGAATACGTTCCCGGCCCTGGTCCCCCCCCCCCCGTCCCCC
ACGAGAGTTGGTACCACCCGAAGTCGGTGGGGTACCCTTTTGGAGCCA
GCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAATGAG
CATAC

TK4 *Bacillus cereus*

GGTCGTGGCGGAGCGTCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGA
GCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC
GGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGC
TGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC
TTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
CGAAGACCCTTACCAGTTCTTGACATCTTCTGACACCCTAGAGATAGG
GCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGCCAGGTGGTGCATGGTGGTCGTCAG
CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
GTTTTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGCCATTTTAAGGTGACTGCCGGTG
CCAACCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT
GCCCTGGGCTCCCCACGTGTTCCAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAG
CCCGCGAGGTGGAGTTAATTTCATAAACCCGTTTTTCAGTTCGGATTGTA
GGCTGCAATTCCCCTCCATGAAGCTGGAATCGTTAGTAATCGCGGATC
ACCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTCACCCCCCGCCCGTCC
CACCACGAGAGTTTGTACCACCCGAAGTCGGTGGGGTACCCTTTTGA

GCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATGGGGTGAAGTCGAACAAGA
GCATTCG

P1 *Bacillus subtilis*

GGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGGATAACGCCGGGAAACCGGGGCTA
ATACCGGATAGTTTTTTCCTCCGCATGGAGGAAAAAGGAAAGACGGCT
TCTGCTGTCACTTACAGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG
GGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGCCGGGG
AAGAACAAGTGCCGTTCTGAACAGGGCGGCGCCTTGACGGTACCCGGC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG

P3 *Bacillus zanthoxyli*

CTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAG
GATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACT
TACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
CCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT
GAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACG
AGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCC

FC *Bacillus coagulans*

CCTGCCTGTAAGATCGGGATAACGCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG
GATAGTTTTTTCCTCCGCATGGAGGAAAAAGGAAAGACGGCTTTTGCT
GTCACTTACAGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAC
GGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGCCGGGGGAAGAA

CAAGTGCCGTTCTGAACAGGGCGGCGCCTTGACGGTACCCGGCCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Kahraman, B., Arıcı, M., Şenol, B. M., Dertli, E., Investigation of Probiotic Potential of *Bacillus* spp. Isolated From the Soil and Digestive Tract of Fish, III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 1-3 September 2021
2. Arıcı, M., Kahraman, B., Evaluation of *Bacillus* Species as Probiotics: Investigation of Probiotic Potentials and Assessment of Concerns, 1. Gıda Kimyası Kongresi, Antalya, Türkiye, 3- 6 Mart 2022
3. Arıcı, M., Kahraman, B., Aktay, D., Kuzey, F.K., Tazeoğlu, F., Korkmaz, K., Toker O.S., Dertli, E., Effect of Probiotic Addition on The Textural Properties of Soft Jelly Candies, 1. Gıda Kimyası Kongresi, Antalya, Türkiye, 3- 6 Mart 2022

Makaleler

1. Kahraman, B., Korkmaz, K., Daştan, D., Toker, O. S., Dertli, E., & Arıcı, M. (2023). Production and characterization of probiotic jelly candy containing *Bacillus* species. Journal of Food Measurement and Characterization, 17, 5864–5873.
2. Kahraman, B., Şenol, B. M., Dertli, E., & Arıcı, M. (2024). A Comparative Study of *Bacillus* Spp. Isolated From Various Sources and Commercial Food Supplements and Evaluation of Some Probiotic Properties. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 21(1), 265-276.

Projeler

1. TÜBİTAK, 1505 Üniversite-Sanayi İş birliği Destek Projesi, Probiyotik Yumuşak Şekerleme Geliştirilmesi, Proje Numarası: 5190060