



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



[Yüksek Lisans Tezi]

**[ASTAKSANTİN İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ KEFİRLERİN
MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI]**

[Sümeyye YILDIZ]

[Biyoloji Anabilim Dalı]

[Biyoteknoloji Programı]

**DANIŞMAN
[Doç. Dr.] [Sevcan AYDIN]**

[Aralık, 2022]

İSTANBUL

Bu alışma, 22.12.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Sevcan AYDIN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Mahmut ALIşKAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Özlem ATEş DURU
Nişantaşı Üniversitesi
Sağık Bilimleri Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2022-38795 numaralı projesi ile desteklenmiştir. |

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--	--

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: FYL-2022-38795'tir. Çalışmamın yürütülmesi için maddi destek veren İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi'ne en içten teşekkürlerimi sunarım.



ÖNSÖZ

Bu tez İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiş bir Yüksek Lisans tezidir. Tezde, vejetaryen/vegan beslenme tipini tercih eden ya da süt alerjisi/laktoz intoleransı olan tüketicilere yönelik literatürde daha önce hiç kullanılmamış olan *Haematococcus pluvialis* mikroalgi ve bu mikroalgden elde edilen astaksantin pigmenti ile zenginleştirilmiş fonksiyonel su kefir ve vegan (soya sütü) kefir üretilerek hayvansal süt eksikliğinden kaynaklı protein, şeker, mineral ve vitamin eksikliğinin karşılanması hedeflenmektedir. Ayrıca astaksantin pigmenti ile zenginleştirilmiş su kefirinin mikrobiyal çeşitlilik, protein ve yağ asidi açısından analizleri gerçekleştirilmiş olup bir çalışma yapılmıştır. Elde edilen veriler tezde sunulmaktadır.

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında bilgisini, ilgisini, katkısını, esirgmeden bana her zaman yardımcı ve destek olan ve bana yeni bir bakış açısı kazandıran danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sevcan AYDIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Öğrenimim boyunca bana hem maddi hem manevi bakımdan destek olan annem Nurten YILDIZ'a, babam Ali YILDIZ'a, ablalarım Sultan YILDIZ ve Sevde Nur YILDIZ'a aileme çok teşekkür ederim.

Aralık 2022

Sümeyye YILDIZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	8
3.1.HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS MİKROALGLERİNİN KÜLTÜRE ALINMASI VE LİYOFİLİZASYON İŞLEMLERİ	8
3.2. KEFİR FERMANTASYONU	8
3.3.FİZİKOKİMYASAL ÖLÇÜMLER.....	10
3.3.1. pH ölçümlerinin yapılması	10
3.3.2.Toplam titre edilebilir asitlik (TTA) tayini	10
3.4.BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER.....	10
3.4.1.Toplam protein içeriği analizi	10
3.4.2.Toplam Yağ Analizleri	10
3.4.3.Şekerlerin HPLC analizi.....	11
3.4.4.GC-MS analizi ile kefirin uçucu-organik bileşik profilinin çıkarılması	11
3.4.5.Yağ asidi profilinin GC-MS analizi	11
3.5. MİKROBİYAL TOPLULUK ANALİZİ.....	12
3.5.1. Moleküler numune hazırlama ve sıralama	12
3.5.2. Biyoinformatik analizi.....	13
4. BULGULAR.....	14
4.1.TOPLAM PROTEİN, LİPİD, PH VE TİTRE EDİLEBİLİR ASİTLİK TAYİN SONUÇLARI	14
4.2.YAĞ ASİDİ PROFİLİNİN GC-MS ANALİZ SONUÇLARI.....	15

4.3. FARKLI FERMANTASYON T�RLER� VE KOŞULLARINDA DEĞ��EN M�KROB�YAL TOPLULUK ANAL�Z SONUÇLARININ DEĞERLEND�R�LMES�.....	17
4.3.1. Su kefir fermentasyonu sırasında değ��en mikrobiyal komünite analiz sonuçları.....	17
4.3.2. Soya sütü kullanılarak hazırlanan kefir fermentasyonu sırasında değ��en mikrobiyal komünite analiz sonuçları	21
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	23
KAYNAKLAR.....	25
�ZGE�M��	32

|



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1: Su kefir yapımı.....	9
Şekil 3.2: Soya sütü kefir yapımı	9
Şekil 4.1: Su kefir ile yapılan kefire mikroalg ve astaksantin ilave edilmesi sonucunda mikrobiyal komünitede oluşan Filum, Sınıf, Takım ve Aile dağılımları	18
Şekil 4.2: Su kefir ile yapılan kefire mikroalg ve astaksantin ilave edilmesi sonucunda mikrobiyal komünitede oluşan cins düzeyindeki dağılımları.....	19
Şekil 4.3: Su kefir ile yapılan kefire mikroalg ve astaksantin ilave edilmesi sonucunda mikrobiyal komünitede oluşan tür düzeyindeki dağılımları.....	20
Şekil 4.4: Soya sütü ile yapılan kefire mikroalg ve astaksantin ilave edilmesi sonucunda mikrobiyal komünitede oluşan tür düzeyindeki dağılımları.....	21

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: Kefir tanelerinin biyokütlesindeki protein, lipid, pH ve titre edilebilir asitlik tayin	14
Tablo 4.2: Yağ asidi profilinin GC-MS analiz sonuçları	16



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
°C	: Santigrat
H ₂ O	: Su

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

dk	: Dakika
EPS	: Ekzopolisakkaritler
g	: Gram
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Uçucu yağların gaz kromatografisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
L	: Litre
LAB	: Laktik asit bakterileri
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
NIST	:Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü
NMKL	: İskandinav Gıda Analizi Komitesi
nm	: Nanometre
pH	: Potansiyel hidrojen
pmol	: Pikomol
ppm	: Milyonda bir
TTA	: Toplam titre edilebilir asitlik
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
VOC	: Uçucu Organik Bileşikler

ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[ASTAKSANTİN İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ KEFİRLERİN MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI]

[Sümeyye YILDIZ]

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

[Biyoloji Anabilim Dalı]

Danışman : [Doç. Dr. Sevcan AYDIN]

Günümüzde, sağlıklı olan fonksiyonel içecek ve gıdalar seçme konusunda bilinçli olan tüketicilerin alternatif ürünlere olan ilgisi, sağlıklı içecekler arasında yer alan kefire olan ilgiyi de giderek arttırmaktadır. Kefirin besinsel değeri yüksek ve probiyotik mikroorganizmalarca zengin, sağlık üzerine antikanserojenik, bağışıklık ve sindirim sistemini düzenleyici, kolesterol düşürücü gibi özelliklerinin bulunmasıyla birçok tüketici tarafından tercih edilmektedir. Fakat vejetaryan/vegan beslenme tipini tercih eden ya da hayvansal süte karşı alerjisi/intoleransı olan tüketiciler geleneksel hayvansal bazlı sütle elde edilen kefirleri tüketmek konusunda engellere karşılaşmaktadırlar. Gıda katkı maddesi olarak doğal kaynaklı biyoaktif bileşikler giderek artan bir popülerlik kazanmaktadır. Bahsi geçen bileşiklerin sahip olduğu yüksek biyolojik aktivite ve biyoyararlanım oranı, sağlık üzerindeki faydalı etkileri ve kullanım güvenliği bu bileşiklerin tercih edilme özelliklerinden bazılarıdır. Ayrıca, düşük üretim ve işleme maliyetleri onları daha da çekici kılmaktadır. Mikroorganizmalar yıllardır gıda, ilaç, kozmetik ve enerji endüstrilerinde kullanılmaktadır. Onların arasında, mikroalglerin gıda katkı maddesi olarak kullanımı alternatif gıda sektörünün son yıllarda üzerinde çalıştığı gözde alanlar arasında yer almaktadır. Bu doğrultuda, gerçekleştirilen tezde vejetaryen/vegan beslenme tipini tercih eden ya da süt alerjisi/laktoz intoleransı olan tüketicilere yönelik literatürde daha önce hiç kullanılmamış olan *Haematococcus pluvialis* mikroalginden elde edilen astaksantin pigmenti ile zenginleştirilmiş fonksiyonel su kefiri ve vegan (soya sütü) kefir üretilerek hayvansal süt eksikliğinden kaynaklı protein, şeker, mineral ve vitamin eksikliğinin karşılanması hedeflenerek; astaksantin pigmenti ile zenginleştirilmiş su kefiri ve soya sütü kefirinin mikrobiyal çeşitlilik, protein, şeker ve yağ

asidi açısından analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: FYL-2022-38795'tir. |

Aralık 2022, 46 sayfa.

Anahtar kelimeler: Kefir, Fermente gıdalar, Astaksantin, Mikrobiyal Çeşitlilik, Metagenomik Analiz |



SUMMARY

[M.Sc. THESIS]

**[THE INVESTIGATION OF KEFIR FORTIFIED WITH ASTAXANTHIN IN
TERMS OF MICROBIAL DIVERSITY]**

[Sümeyye YILDIZ]

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

[Department of Biology]

Supervisor : [Assoc. Prof. Dr.] [Sevcan AYDIN]

Today, consumers who are conscious of choosing healthy functional beverages and foods are interested in alternative products and the interest in kefir is increasing. Kefir is preferred by many consumers due to its high nutritional value, probiotic microorganisms, anti-carcinogenic, immune and digestive system regulatory, cholesterol-lowering properties. However, consumers who prefer a vegetarian/vegan diet or have an allergy/intolerance to animal milk faced with obstacles in consuming kefir produced with traditional animal-based milk. Bioactive compounds of natural origin as food additives are gaining increasing popularity gradually. The high biological activity, bioavailability ratio and their beneficial effects on health are some of the preferred features of these compounds. Moreover, their low production and processing costs make them more attractive. Microorganisms have been used for years in food, pharmaceutical, cosmetic and energy industries. Among them, the use of microalgae as food additives has been a rising topic in the alternative food industry in recent years. In the light of this information, this thesis aims to produce functional water kefir and vegan (soy milk) kefir enriched with astaxanthin pigment obtained from *Haematococcus pluvialis* microalgae for consumers who prefer vegetarian/vegan diet or have milk allergy/lactose intolerance. Furthermore, it was aimed to meet the protein, sugar, mineral and vitamin deficiencies caused by animal milk deficiency. Lastly, water kefir and soya milk enriched with astaxanthin pigment were analyzed regarding microbial diversity, protein, sugar and fatty acid compounds. This study was funded by

Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University. Project number: FYL-2022-38795. |

December 2022, 46 pages.

Keywords: | Kefir, Fermented foods, Astaxanthin, Microbial Diversity, Metagenomic Analysis |



1. GİRİŞ

Fonksiyonel fermente gıdaların ve içeceklerin gıda endüstrisindeki rolü her geçen gün daha fazla önem kazanmaktadır. Çeşitli beslenme tiplerini benimseyen tüketiciler probiyotik bazlı yapısı ve bağışıklığı destekleyici özellikleri nedeniyle fermente gıda tüketimini tercih etmektedir. Süt ürünlerine yönelik seçenekler son yıllarda tıbbi tavsiyeler veya yaşam tarzı nedeniyle artmıştır. Tipik olarak laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve maya gibi çeşitli simbiyotik türler tarafından fermente edilen kefir, önemli fermente ürünlerden biridir. Kefirin faydalı doğası gereği kefir tüketimi, sindirim sorunu, yüksek kolesterol, obezite ve kanser gibi farklı hastalık türlerini önlemeye yardımcı olmaktadır. Kefir yapımında genellikle inek sütü kullanılsa da manda, keçi ve koyun gibi diğer süt hayvanlarının sütleri de kullanılmaktadır. Bu hayvansal kaynaklı sültere ek olarak kefir içeceklerinin üretiminde soya sütü, hindistan cevizi sütü, yulaf sütü, fındık sütü ve pirinç sütü gibi bitkisel kaynaklı süt ürünleri de tercih edilmektedir.

Vejetaryen/vegan tüketicilere yönelik gıda pazarları, birçok ülkede önemli bir büyüme göstermiştir ve tüketicilerin yaklaşık %20'si bitki bazlı ürünlerin tüketimini artırma eğilimindedir. Ayrıca, fermente süt ürünü olmayan içecekler, süt proteinlerine aşırı duyarlı (Berciano ve Caro 2008), laktoz intoleransı olan tüketicilerin beslenmesinde önemli bir rol oynamaya başlamıştır (Varela-Moreiras ve diğ. 2013). Gıda endüstrisi, bu tüketicilere hitap eden yeni ürünler ve içerikler geliştirmeye yardımcı olan araştırma ve teknolojiler geliştirmektedir. Bunlardan biri, fermente kefir üretiminde süt ürünü olmayan bir substrat (bitki bazlı sülter) kullanılarak hayvansal olmayan kefir üretimidir. İnek sütüne alternatif popüler bir süt ürünü olmayan soya sütü, besin lifi, izoflavonlar ve yüksek kaliteli protein içermektedir. Buna ek olarak, soya sülünü laktik asit bakterileri ile birleştirmek, müşteri tercihlerini karşılayan işlevsel bir ürün yaratmak için uygun bir yoldur. Bitki bazlı süt kullanmanın en büyük dezavantajı ise inek sülünün tüm temel bileşenlerini sağlayamamasıdır.

Mikroalgler, besin değeri yüksek kaliteli gıdaların üretiminde fonksiyonel içerik olarak kullanılabilir. En dikkate değer mikroalglerden biri olan *Haematococcus pluvialis* astaksantin adı verilen en zengin doğal antioksidan kaynağı olarak bilinmektedir. Astaksantin insan sağlığına oldukça faydalıdır, bu yüzden insanların tüketimi için çeşitli gıda ürünlerine

eklenebilir (Guerin ve diğ. 2003; Higuera-Ciapara ve diğ. 2006; Martínez ve diğ. 2019). *Haematococcus pluvialis* yüksek ışık, tuzluluk ilavesi, azot ve fosforun ortamdaki çekilmesi gibi stres koşulları altında hücre içinde biriktirdiği kuru ağırlığının %2-5'i arasında değişen astaksantin pigmenti üretmesi ile önem taşımaktadır. *H. pluvialis* mikroalg türü doğal astaksantin en iyi kaynaklarından biri olarak nutrasötik pazarında talep artışına sahip olan bir antioksidandır ve insan sağlığı için besleyici gıda desteği olarak tüketimi ve pazarlanması Avrupa ülkelerinde de onaylanmıştır. Doğal antioksidan maddeler aracılığı ile beslenme yaklaşımı bağışıklık sistemini güçlendirerek kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok farklı hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır.

Gerçekleştirilen çalışmada ilk kez *Haematococcus pluvialis* mikroalg ve bu mikroalgden izole edilen astaksantin pigmenti ile zenginleştirilmiş fonksiyonel su kefir ve vegan (soya sütü) kefir üretilerek hayvansal süt eksikliğinden kaynaklı protein, şeker, mineral ve vitamin eksikliğinin karşılanması hedeflenerek; astaksantin pigmenti ile zenginleştirilmiş su kefir ve soya sütü kefirinin mikrobiyal çeşitlilik, protein ve yağ asidi açısından analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen tezde astaksantin pigmenti ilave edilerek yapılan kefir fermentasyonu sonucunda ilave edilmeyen kontrol kefir numunesi ile metagenomik analizler kullanılarak mikrobiyal çeşitlilik üzerinde etkisi tür düzeyinde kıyaslanmıştır. Bu sayede kefir fermentasyonu sırasında kullanılan astaksantin pigmentinin kefirde yer alan mikrobiyal çeşitliliğe katkısı ve hangi probiyotik türler üzerinde nasıl bir etki yaptığının incelenmesi yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı, vegan kefir olarak adlandırılan bitkisel bazlı soya sütü kefir ve su kefir; protein içeriği yüksek, çeşitli vitamin ve mineralleri içeren hatta güçlü bir antioksidan olan astaksantin pigmenti ile zenginleştirmektir. Bu çalışma ile, vejetaryen/vegan beslenme tipini benimsemiş ya da hayvansal kaynaklı fermente ürünlere karşı intoleransı/alerjisi olan tüketicilere fonksiyonelliği, besleyiciliği ve mikrobiyal çeşitliliği arttırılmış vegan kefir üretimi amaçlanmaktadır. |

2. GENEL KISIMLAR

Günümüzde insanların sağlık açısından faydalı olan gıda ürünlerinin tüketimine olan yönelimleri artmaktadır. Lif ve protein içeriği alımını artırmak için farklı alternatifler en önemlisi gıda alternatifleri dikkat çekmektedir. Bu anlamda kefir tüketimi konakçıya sağlık yararları sağlayan canlı mikroorganizmalardan oluşan probiyotik bir ürün olduğu için, diyetin besin içeriğini artırmaya yönelik bir seçenektir (De Sainz ve diğ. 2020); bu nedenle tüketimi sağlık yararları ile ilişkilidir. Genel olarak kefir taneleri %10'dan daha az yağ içerir ve laktik asit bakterilerinin varlığı yağın azalmasını destekler. Yapılan bir çalışmada kefirde bulunan laktik asit bakterilerinin yağ asitlerini metabolize edebildiği belirtilmiştir (Ahmed ve diğ. 2013). Ayrıca kefir fermentasyonu sırasında proteinler, asit pıhtılaşması ve proteolize sahip olarak kolayca sindirilebilir hale gelmektedirler. Kefirin besin değeri ve mikrobiyal bileşimi, tanelerinin orijini ve mikrobiyolojik tür çeşitliliği, fermentasyon, depolama süresi ve sıcaklığı gibi birçok faktöre göre önemli ölçüde değişmektedir (Blasche ve diğ. 2021; Guzel-Seydim ve diğ. 2021).

Su kefir, kuru meyvelerin eklendiği sakkaroz çözeltisinin su kefir taneleri ile fermente edilmesiyle üretilen, köpüklü, hafif asidik, fermente edilmiş bir içecektir. Bu içecek, tipik olarak süt kefir taneleri kullanılarak sığır sütü ile üretilen süt veya süt kefirine benzer ancak ondan farklı önemli faydalı özellikler taşımaktadır. Su kefirinin jelatinimsi taneleri, birincil olarak polisakkarit matrisine gömülmüş farklı bakteri ve maya türlerinden oluşan simbiyotik bir karışımdır. Bu mikroorganizmalar arasında laktik asit bakterileri, mayalar ve asetik asit bakterileri en öne çıkan mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmaların çoğunluğunu probiyotik mikroorganizma oluşturmaktadır. Bu durum da içeceğin insan sağlığı ve bağışıklık sistemi üzerinde olumlu bir etki yaratmasını sağlamaktadır (Gulitz ve diğ. 2011; Martínez-Torres ve diğ. 2017). Diğer yandan bu fermante içecek bir süt ürünü içermediğinden veganlar ve süt ürünlerine alerjisi olanlar için oldukça yararlı probiyotik ve prebiyotik kaynağı konumuna gelerek daha geniş bir tüketici çeşitliliğine hitap etme avantajı vardır (Sanchez ve diğ. 2019). Su kefir su kefir taneleri kullanılarak üretilen bir fermentasyon ürünüdür. Ana substrat bir sükröz çözeltisidir. Bu su fermentasyonuna azot kaynağı olarak kuru meyve veya meyve özleri gibi çok çeşitli substrat alternatifleri ile fermente edilebilmektedir. Su kefir taneleri, 5 ila 20 mm çapında ve düzensiz, karnabahar benzeri bir şekle sahip jelatinimsi yapı göstermektedir (Waldherr ve diğ. 2010). Fermentasyonlar, su kefir tanelerinin, kurutulmuş

meyve veya meyve özleri olsun veya olmasın, bir sükröz ortamına yerleştirilmesiyle 21 ila 30 °C sıcaklıkta 30 saat ile 2 gün arasından değişen fermentasyon bekletmek süreleriyle gerçekleştirilebilir. Su kefir taneleri, fermente edilmiş sıvıdan süzülerek geri kazanılabilir ve şekerli su içeren saklama ortamında bekletilerek yeniden kullanılabilir. Karbon kaynağı olarak sofr şeker veya esmer şeker (sakkaroz) kullanılırken, azot kaynağı olarak taze veya kuru meyveler eklenir. Bu amaçla limon dilimleri, taze veya kuru incirler en yaygın şekilde fermentasyon ortamına eklenmektedir. Meyvenin tamamının eklenmesi yerine meyve özlerinin hazırlanması tercih edilebilir; bu tür ekstraktlar standart bir şekilde hazırlanabilir ve pastörizasyon mümkündür. Aksi takdirde, meyvenin cinsine, nasıl işlendiğine (örneğin kurutulmuş), nasıl paketlenildiğine (örnek olarak koruyucu önlemlili veya koruyucu önlemsiz) ve su kefir üretim sürecine (örneğin meyvelerin hazırlanması sırasında haşlanması) bağlı olarak, meyveden su kefirine (potansiyel olarak istenmeyen) örneğin Enterobacteriaceae ve/veya *Pseudomonas* gibi mikroorganizmaların mikrobiyal komünite içinde çoğalmasına sebep olabilir (Randazzo ve diğ. 2016). İncir gibi meyveler tipik su kefir fermentasyon substratları olarak kullanılırken; havuç, zencefil, rezene ve soğan gibi sebzeler, süt ürünleri substratlarda farklı çalışmalarda denenmiştir (Fiorda ve diğ. 2017). İncir kullanılarak hazırlanan su kefir ile ilgili literatürde birçok bilimsel çalışma yer almaktadır (Gulitz ve diğ. 2011; Laureys ve de Vuyst 2014; Verce ve diğ. 2019). Yapılan bir çalışmada incirin diğer meyvelerle karşılaştırıldığında en optimum su kefir fermentasyonu sağlandığını bulmuşlardır (Reifl, J. 1990). İncirin fermentasyon prosesinden çıkarılmasının glikoz tüketimini ve dolayısıyla fermentasyon hızını önemli ölçüde yavaşlattığını; kuru üzüm, hurma ve erik gibi diğer kuru meyveler kullanılarak su kefir fermentasyonunun elde edilmesinin ise fermentasyon prosesi sırasında laktik asit ve asetik asit üretim hızını değiştirdiği bulunmuştur.

Üretilen su kefirinin kalitesinin kontrolünde kullanılan tipik parametreler arasında pH, titre edilebilen asitlik (TTA), şeker konsantrasyonu ve alkol bulunur. Ayrıca birçok çalışmada bu analizlere ilave olarak organik asit ve şeker türevleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya yüksek performanslı anyon değiştirme kromatografisi (IC) ile ölçülmektedir. Ayrıca lezzet ve aroma bileşikleri, kütle spektroskopisi (GC–MS veya LC–MS) ile birleştirilmiş gaz veya sıvı kromatografisiyle ölçülerek kontrol edilebilir (Corona ve diğ. 2016; Randazzo ve diğ. 2016; Laureys ve De Vuyst, 2017). Su kefirinin pH'ının fermentasyonunun başlangıcında tipik olarak pH 4,5'in altında olması ve genellikle sonrasında daha da düşmesi laktik asit ve asetik asit üretimine eşlik etmiştir (Laureys ve de Vuyst, 2014; Laureys ve diğ. 2018, 2019).

Bu düşük pH değerlerinde istenmeyen mikroorganizmaların üreme riski düşüktür (De La Fuente-Salcido ve diğ. 2015). Bu pH değişimi özellikle kuru incir kullanırken gözlemlenmiş olup; farklı meyve türlerinin kullanımı bu kadar düşük bir pH ve dolayısıyla koruma sağlamayabilir (Randazzo ve diğ. 2016). Su kefiri tüketici alışkanlıklarının değiştiği ve süt ürünlerinin tüketiminin azaldığı bir dönemde süt kefirine umut verici bir alternatif teşkil etmektedir. Su kefirinin bilimsel ve ticari potansiyelinden tam olarak yararlanmak için mikrobiyal bileşiminin dinamiklerinin ve üretim süreçlerinin kapsamlı bir şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Son yıllarda bitki bazlı proteinlerin tüketimine olan ilgi önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca buna bağlı olarak probiyotikle zenginleştirilmiş bitki bazlı süt ürünlerine olan talep her geçen gün hızla artmaktadır. Birçok bitki bazlı süt çeşidi olmasına rağmen, soya sütü, pirinç sütü ve hindistancevizi sütü probiyotik gıda geliştirmede kullanılan ana taşıyıcı matrislerdir. Genel olarak, bu ürünler tüketim için güvenlidir ve ürünün raf ömrü boyunca yeterli probiyotik seviyelerini koruma yeteneklerinden dolayı probiyotiklerin çoğalması için uygun bir araç olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, bu ürünlerdeki probiyotiklerin fonksiyonel etkinliğinin gastrointestinal ortamda varlığını sürdürmesi, bağırsak epiteline yapışma ve immünomodülasyona olan etkilerinin değerlendirilmesine yönelik çalışmalar oldukça azdır ve bu yönlerin daha fazla çalışmada bilimsel olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Bitkisel bazlı sütler inek sütü ile karşılaştırıldığında, bileşimlerinin oldukça farklılık gösterdiği görülmektedir. Örneğin, süt laktozu, kalsiyum ve diğer minerallerin biyoyararlanım yeteneğini arttırırken; glikoz, sükroz, maltoz ve nişasta gibi yaygın olarak bulunan diğer gıda şekerleri bu yeteneğe sahip değildir. Ayrıca kazeinler, kalsiyumun biyoyararlanımını artırıp fosforu stabilize ederek bağırsak emiliminin artmasına neden olmaktadır. Vegan sütlerde laktoz ve kazein bulunmadığından bu özelliklerden yoksundur. Fakat fermentasyon prosesi, besin maddelerinin içeriğini ve biyoyararlanımını artırarak vegan sütlerinin besinsel özelliklerini iyileştirmede umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir (Kaczmarzka ve diğ. 2018; Pam Ismail ve diğ. 2020; Sá, Moreno ve Carciofi 2020).

Mikroalgler, geleceğin önemli bitkisel protein kaynağı içeren gıda alternatifleri olarak dikkat çekmektedir. Güçlü karbon tutma kabiliyetleri, yüksek fotosentez verimliliği gibi avantajlara sahip olduklarından yakın gelecekte yeni gıda tedarik sisteminde ve dünya karbon nötrleşme sürecinde önemli bir rol oynayacakları öngörülmektedir. Mikroalgler, doğada fotosentetik

etkinliği en yüksek olan organizma türüdür. Mikroalglerin fotosentetik etkinliği %10-20 iken bu da çođu karasal bitkiden (%1-2) ok daha fazladır (Singh ve Ahluwalia 2013). Son yıllarda, mikroalglerin kullanıldığı gıda uygulamaları giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Mikroalgler birçok farklı besin kaynağı içermeleriyle farklı gıda ürünlerinin besin değerini artırmak için kullanılabilme potansiyelleri taşıtmaktadırlar (Bernaerts ve diğ. 2018). Mikroalgleri insan beslenmesi açısından özellikle ilginç kılan, sadece protein veya lipit içerikleri değil, ürettikleri protein ve lipitlerin kalitesi ve ayrıca sağlığı geliştirici özelliklere sahip biyoaktif bileşikler üretme ve biriktirme potansiyelleridir. Mikroalgler, gıda için doğal antioksidanlar sağlayabilir. Gıdalarda artan doğal antioksidan içeriği ile ilişkili potansiyel sağlık yararları da vardır. Giderek daha fazla deneysel kanıt, bu bileşiklerin insan hastalıklarını önlemede önemli bir koruyucu rol oynayabileceğini göstermektedir (Guedes ve diğ. 2011; Li ve diğ. 2019). Bazı araştırmacılar ayrıca mikroalglerin probiyotiklerin büyümesini destekleyebileceğini ve fermente gıdalara mikroalglerin eklenmesinin probiyotiklerin canlılığını artırabileceğini ve fermentasyon süresini kısaltabileceğini göstermektedir (Barkallah ve diğ. 2017). Mikroalgler; karotenoidler, fenolik bileşikler, vitaminler ve fitosteroller dahil olmak üzere doğal antioksidanlar açısından zengindirler. Mikroalglerin yüksek antioksidan içermeleri ile gıda ürünlerine ilavesinin gıda ürünlerinin raf ömrünün uzamasında en önemli nedeni olarak kabul edilir (Velázquez ve diğ. 2021). Ayrıca mikroalgler, gıda ürünlerinin su tutma kapasitesini ve yağ tutma kapasitesini önemli ölçüde iyileştirebilen diyet lifi açısından zengindir (Ben Atitallah ve diğ. 2019). Bu da fermente gıdalardaki probiyotik çeşitliliğinin sağlanması ve depolama sırasında canlılığını arttırabilmesinde önem taşıtmaktadır (Bianco ve diğ. 2022). Mikroalgler güçlü fotosentetik kapasiteleri ile hızlı büyüme avantajlarına sahip olmalarıyla yakın gelecekte ekonomik ve evre dostu bir gıda kaynağı olacakları öngörülmektedir.

Astaksantin bilinen diğer doğal bileşiklerden çok daha yüksek orandan antioksidan kapasitesine sahiptir. Mikroalg türevi astaksantin, gıda ve hayvan yemi üretiminde, ayrıca kozmetik ve farmasötik ürünlerde pigment olarak kullanılmaktadır. Astaksantin, kimyasal sentez ve *Haematococcus pluvialis* gibi mikroalg türlerinin biyokütlesinden ekstraksiyon yoluyla üretilen yüksek değerli bir karotenoiddir. *Chlorella zofingiensis* gibi diğer mikroalglerde astaksantin kaynağı olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Sentetik ve mikroalg türevli olarak üretilen astaksantin biyoaktivitelerinde önemli farklılıklar bulunmaktadır (Lafarga, 2019). Astaksantin, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde önem taşıtmaktadır (Turrin ve Rivest 2006). Kontrolsüz inflamasyon reaksiyonları, konak hücre ve dokularda hasara neden olur ve

birçok nörodejeneratif durumda önemli bir rol oynar. Astaksantin inflamasyonun başlamasını durdurabilir ve bu nedenle merkezi sinir sistemi bozukluklarının önlenmesinde önemli bir rol oynayabileceği görülmektedir (Grimmig ve diğ. 2017; Galasso ve diğ. 2018). Astaksantin tüketimi, diğer bozuklukların yanı sıra Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, depresyon ve nöropatik ağrıyı hafifletmek için potansiyel bir strateji olarak rol oynayacağı düşünülmektedir (Fakhri ve diğ. 2018).

Bu doğrultuda, gerçekleştirilen çalışmada; vegan kefir olarak adlandırılan bitkisel ve su bazlı kefiri; protein içeriği yüksek, çeşitli vitamin ve mineralleri içeren mikroalg ve güçlü bir antioksidan olan mikroalg türevli astaksantin pigmenti ile zenginleştirmektedir. Böylelikle, vejetaryen/vegan beslenme tipini benimsemiş ya da hayvansal kaynaklı fermente ürünlere karşı intoleransı/alerjisi olan tüketicilere fonksiyonelliği, besleyiciliği ve mikrobiyal çeşitliliği arttırılmış vegan kefir alternatifleri üretilmesi hedeflenmiştir. *Haematococcus pluvialis*'in projede eş zamanlı olarak bitkisel bazlı kefir ve su kefirine inokülasyonu gerçekleştirilecek olup, proje sonucunda elde edilecek olan farklı kefirlerin fizikokimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyal komite analizleri sonucunda aralarındaki anlamlı farklılıklar ve benzerlikler değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışma ile besin değerleri açısından tüketicinin sağlıklı seçimler yapmasını desteklemek, çeşitli beslenme tiplerinden kaynaklı ürün skalasını genişletmek ve probiyotik ve prebiyotik özelliği yüksek yeni fermentatif içecek alternatifleri sağlanacaktır. |

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* MİKROALGLERİNİN KÜLTÜRE ALINMASI VE LİYOFİLİZASYON İŞLEMLERİ

H. pluvialis (SCCAP 34/7), İskoç Deniz Enstitüsü'nden (İskoçya, Birleşik Krallık) alınıp 3N-BBM+V besiyeri kullanılarak fotobiyoreaktörde kültüre edilmiştir. 20 günlük inkübasyon periyodundan sonra mikroalg kütlesi toplanarak kurutulmuştur. Mikroalg kütlesi daha sonra bir havanda toz haline getirilmiş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Mikroalg türevli astaksantin, besin yokluğuna yol açan stres koşulları oluşturularak mikroalgal hücrelerinden izole edilmiştir.

3.2. KEFİR FERMANTASYONU

Soya sütü İstanbul'daki yerel bir marketten bitki bazlı kefir kültürü ve su mayası kültürü Danem Süt ve süt ürünleri Ltd. Şti'den temin edilmiştir.

Su kefiri üretimi için 500 mL suya, 4 gr su kefiri tanesi, 10 gr esmer şeker, 5 gr incir kurusu kullanılarak Şekil 3.1'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Su kefiri üretiminde takviye için *H. pluvialis*'in liyofilize formu ve astaksantin pigmentinin farklı konsantrasyonları eklenerek su kefiri fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Su kefiri fermantasyonunda W (Kontrol), W1 (% 0.25 oranında mikroalg ilavesi), W2 (% 0.50 oranında mikroalg ilavesi), W3 (şeker ilavesiz % 0.50 oranında mikroalg ilavesi), W4 (şeker ilavesiz %0.50 oranında astaksantin ilavesi) olarak 4 farklı kombinasyonda üretilmiştir. İnkübasyon 25 °C' de 30 saat olarak gerçekleştirilmiş ve daha sonra analize kadar 4 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1: Su kefir yapımı

Soya sütü ile bitkisel bazlı kefir üretiminde S (Kontrol), S1 (% 0.25 oranında mikroalg ilavesi), S2 (% 0.50 oranında mikroalg ilavesi), S3 (%0.50 oranında astaksantin ilavesi) olarak 3 farklı kombinasyonda üretilmiştir Şekil 3.2’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. *Haematococcus pluvialis* yukarıda bahsedilen oranlarda pastörize soya sütüne eklendikten sonra, bitkisel bazlı kefir kültürü inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. Pastörize soya sütüne *H. pluvialis* ilave edilmiştir. Örneklerle bitki bazlı kefir kültürü (4 g:100 ml, kefir taneleri: soya sütü) eklenip cam kaplara aktarılmıştır. İnkübasyon 25 °C’de 24 saat gerçekleştirilmiş ve daha sonra analize kadar 4 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.2: Soya sütü kefir yapımı

3.3.FİZİKOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Mikroalg ve astaksantin pigmenti ile zenginleştirilmiş soya sütü ve su kefir örneklerinin pH değeri kalibrasyonu yapıldıktan sonra pH metre (NMKL 179, 2005) ile ölçülmüştür. Numunelerin toplam titre edilebilir asitlik değerleri TS 1330 standartlarına göre belirlenmiş ve sonuçlar laktik asit içinde g/100 mL olarak ifade edilmiştir.

3.3.1. pH ölçümlerinin yapılması

Mikroalg ve astaksantin pigmenti ile zenginleştirilmiş vegan ve su kefir örneklerinin pH değerleri, pH değeri kalibrasyonu yapıldıktan sonra, su içeren veya suyla karıştırılabilen tüm gıdaların pH'ını ölçmek için kullanılan 'pH. Determination in foods. (NMKL 179, 2005)' yöntemi ile ölçülmüştür.

3.3.2.Toplam titre edilebilir asitlik (TTA) tayini

Mikroalg ve astaksantin pigmenti ile zenginleştirilmiş vegan ve su kefir örneklerinin titre edilebilir asitliği, elde edilen kefir örneklerinin 0.1 M NaOH çözeltisi ile titre edilerek sonuçlar yüzde şeklinde ifade edilmiştir.

3.4.BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

3.4.1.Toplam protein içeriği analizi

Astaksantin pigmenti ile zenginleştirilmiş soya sütü ve su kefir örneklerinin protein içerik analizleri Dumas yöntemi (ISO/TS 16634-2:2009) kullanılarak yapılmıştır (Termo bilimsel flaş EA1112 CHNS-O element analiz cihazı). Sonuçlar '% Ham Protein' olarak hesaplanmıştır.

3.4.2.Toplam Yağ Analizleri

Kefir örneklerinin toplam lipid içeriği analizleri NMKL 160 Gravimetrik Yöntem ile belirlenmiştir. Bu yöntemde kefir örnekleri, bağlı yağları serbest bırakmak ve yağ asitlerinin tuzlarını serbest asitlere dönüştürmek için seyreltik hidroklorik asitte kaynatılmıştır. Filtreleme ve kurutmadan sonra tortu, yağ eteri veya heksan ile özümленmiştir. Çözücü damıtılıp tortunun kütlesi belirlenmiştir. Numunelerin yağ içeriği '% Lipid' olarak belirtilmiştir.

3.4.3.Şekerlerin HPLC analizi

Kefir numunelerinin şeker içerik analizleri, ISO 22662:2012 standartlarına uygun olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Kefir numunelerindeki şekerler, bir kırılma indisi dedektörü (RID 10A) kullanılarak tespit edilmiştir. Mobil faz olarak asetonitril ve su (75:25, v/v) kullanılmış ve ayırma 30°C'de, 1.1 mL/dk sistem akışında, 20 µL enjeksiyon hacminde ve 20°C'lik bir çalışma süresinde gerçekleştirilmiştir. Örneklerin şeker (laktoz) miktarları '%, Kuru Ağırlık' olarak verilmiştir.

3.4.4.GC-MS analizi ile kefirin uçucu-organik bileşik profilinin çıkarılması

Uçucu organik bileşikler bir gaz kromatografisi (Agilent 8890-5977B GC-MS) üzerinde ayrılmış ve Agilent 19091S 433UI HP-5ms ultra inert silika kapiler kolonu (30 m x 0.25 µm x 0.25 µm) kullanılmıştır.

Ayırma, aşağıdaki sıcaklık programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir:

İlk 1 dakika ile 40°C, daha sonra her bir dakikada 10°C arttırılarak 240°C'ye yükseltip 1 dakika tutulmuştur. Toplam çalışma süresi ise 27.1 dakika olarak kaydedilmiştir. Enjektör sıcaklığı 240 °C'de tutulmuş ve enjeksiyon hacmi süreksiz modda 1 µL ve toplam akış 16 mL/dakika olarak kaydedilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak, 1.0 mL/dk sabit akış hızında ve 7 psi' basıncında helyum gazı kullanılmıştır. MS parametreleri aşağıdaki gibidir:

650 dakikalık çalışma zamanında m/z 40-600'den taranan normal tarama modu kullanılmıştır. İyon kaynağı sıcaklığı, 70 eV'lik bir iyonlaştırıcı enerji ile 230°C olarak kaydedilmiştir.

Uçucu organik bileşiklerin tanımlanması, Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) referans kitaplığı kullanılarak ve alıkonma sürelerinin ve standartların kütle spektrumlarının karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir.

3.4.5.Yağ asidi profilinin GC-MS analizi

Yağ asidi profili, gaz kromatografisi (Agilent 8890-5977B GC-MS) ile analiz edilmiş ve Agilent 19091S-433UI HP-5ms ultra inert silika kapiler kolonu (30 m x 0.25 µm x 0.25 µm) kullanılmıştır. Serbest yağ asitleri, aşağıdaki sıcaklık programı ile sabit akışta ayrılmıştır:

(1) 1 dakika boyunca 100 °C'de, (2) her bir dakikada 10°C arttırılarak 180°C'de 1 dakika, (3) her bir dakikada 2 °C arttırılarak 220 °C'de 1 dakika , (4) her bir dakikada 30 °C arttırılarak 270 °C'de 7 dakika boyunca tutulmuştur. Toplam çalışma süresi 34.3 dakika olarak kaydedilmiştir. Enjektör sıcaklığı 250 °C'de tutulmuş ve süresiz modda enjeksiyon hacmi 1 µL ve toplam akış 19 mL/dk olarak kaydedilmiştir.

3.5. MİKROBİYAL TOPLULUK ANALİZİ

3.5.1. Moleküler numune hazırlama ve sıralama

DNA ekstraksiyonu ve analizi için W, W1, W2, W3, W4 ve S, S1, S2, S3 olarak isimlendirilen farklı fermentasyon şişelerinden kefir örnekleri alınmıştır. Üreticinin talimatlarına göre tüm genomu izole etmek için Genomik DNA İzolasyon Kiti (Norgen Biotek. Corp., Kanada) kullanılmıştır. 16S rRNA'yı çoğaltmak için farklı bölgelerin genleri (Bakteri 16S rRNA, V1-V9 bölgesi, 1400 bp) hedeflenmiştir. Oxford Nanopor teknolojisi ile oluşturulan kütüphanenin Nanopor barkod DNA dizileri, hedefe özel primer çiftlerinin 5' ucuna eklenmiştir. 16S rRNA'ya özgü hedefe özgü primer-konnektör sekansları, ileri primer için TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC - AGRGTTTGATYHTGGCTCAG -3' ve ters primer için 5'-ACTTGCCTGTCGCTCTCTATCTTC - TACTTGTTAYGACTT -3' şeklindedir. İlk PCR, DNA Polimeraz 2x Reaksiyon Karışımı ve her bir primerden 200 nm kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR cihazında aşağıdaki termal döngü programı izlenmiştir:

95°C'de 3 dakika; 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 72°C'de 90 saniye 25 döngü; 72°C'de 5 dakika. PCR ürünü, boyutunu (~1450 bp) doğrulamak için agaroz jel üzerinde yürütülmüştür ve PCR ürünü saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

SQK-LSK108; amplikon kitaplıkları oluşturmak için Oxford Nanopor Teknolojileri Ligasyon sıralama kiti 1D kullanılmıştır ve amplikon kitaplığı MinION'a (Oxford Nanopore Technologies) yüklenmiştir. Adaptör ligasyon aşaması için toplam 0.2 pmol uç hazırlanmıştır, 50 µl Blunt/TA ligaz master karışımına (New England Biolabs) DNA eklenmiştir ve 20 µl adaptör karışımı ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. DNA kitaplığını elde etmek için son saflaştırma, Adaptör Bead Binding tamponu (SQK-LSK108 kitinde sağlanır) ve 0.5X Agencourt AMPure XP boncukları (Beckman Coulter) kitleri kullanılarak tamamlanmıştır. MinION™ kontrol yazılımı, MinKNOW™ sürüm 0.46.1.9 (R9.4) kullanılarak

48 saatlik (R9.4) bir sıralama protokolü uygulanmıştır. Okuma verileri 1.2.2 rev 1.5 iş akışına ve yazılım Metrichor™ aracısına (sürüm 0.16.37960) dayalı olarak elde edilmiştir.

3.5.2. Biyoinformatik analizi

Diziler kimerik yapılardan saflaştırılıp, hizalanmış ve benzerlik matrisi ile aralarındaki mesafeler ölçülerek okumaların %99'dan fazla benzerlikle kümelenmesiyle OTU'lar oluşturulmuştur. Oluşturulan OTU'lar RDP 16S rRNA veri tabanına göre karşılaştırılarak taksonomik açıklamalar yapılmış ve aynı cins olarak tespit edilen OTU'lar ilişkilendirilerek istatistiksel sonuçlar elde edilmiştir. Minitab ve R programları kullanılarak çeşitli istatistiksel analizlerle grafikler oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

4.1.TOPLAM PROTEİN, LİPİD, PH VE TİTRE EDİLEBİLİR ASİTLİK TAYİN SONUÇLARI

Proteinler büyüme, gelişme, hücrelerin onarımı ve sağlıklı yaşam için gerekli olan besin öğelerindendir. Bitkisel protein kaynakların zengin besleyici içeriğine sahip olması, vegan, vejetaryen gibi özel tüketici grupları tarafından tercih edilmesi, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması, bitkisel proteinlerin gıda uygulamalarında kullanılması için iyi bir alternatif kaynak olmasını sağlamıştır. Tablo 4.1’de kefir tanelerinin biyokütlesindeki protein, yağ, pH ve titre edilebilir asitlik tayin sonuçları yer almaktadır.

Tablo 4.1: Kefir tanelerinin biyokütlesindeki protein, lipid, pH ve titre edilebilir asitlik tayin

Fermentasyon Türü	Protein (%)	Lipid (%)	pH	Asitlik
Soya sütü kontrol (S)	2,89	1,99	4,70	0,65
Soya sütü %0.25 mikroalg (S1)	2,98	1,44	4,41	1,04
Soya sütü %0.50 mikroalg (S2)	3,52	1,31	4,64	0,74
Soya sütü %0.50 Astaksantin (S3)	3,18	0,75	4,70	0,65
Su kefiri kontrol (W)	0,36	0,39	3,67	0,9
Su kefiri %0.25 mikroalg (W1)	ND	0,10	3,28	0,50
Su kefiri %0.50 mikroalg (W2)	0,57	0,09	3,51	0,38
Su kefiri şekeriz %0.50 mikroalg (W3)	ND	0,05	3,39	0,49
Su kefiri %0.50 Astaksantin (W4)	ND	0,08	3,94	0,14

pH, etkili bir asitlik tayinidir yani; asitlik derecesini, başka bir ifade ile asitliğin gücünü tanımlamak için kullanılır. pH bir çözeltideki aktif hidrojen iyonları konsantrasyonunu verir.

Soya sütü kefirleri kendi eitleri ile karşılaştırıldığında kontrol grubu 4.70 pH değerine sahip iken S1, S2, S3 değerleri sırasıyla 4.41, 4.64, 4.70 pH verileri saptanmıştır. Kontrol grubundaki pH'a en yakın değer %0.50 astaksantin eklediğimiz S3 kefir numunesi olmuştur. Hazırlanan farklı su kefirlerinin pH değerlerini karılatırdığımızda ise kontrol grubunun pH değeri 3.67 iken W1, W2, W3, W4 pH değerlerinin sırasıyla 3.28, 3.51, 3.39, 3.94 şeklinde olduğu bulunmuştur. Ölçülen pH değerlerine bakıldığında kontrole en yakın pH değeri %0.50 mikroalg ilaveli W2 su kefiri numunesi olduğu grlmtur. Gıdalarda birçok organik asit bulunmaktadır. Bunlar, ya doğal olarak yapısal bir bileşik halinde gıdalar da bulunur ya da fermentasyon yoluyla oluşurlar. Gıdalardaki organik asitler, bazı gıdaların tat-aroma, renk parlaklığı, stabilite ve kalitesinin korunmasında önemli bir rol almaktadırlar. Fermente gıdaların fonksiyonel özellik ve davranışlarını tayin etmek amacıyla asitlik tayini yapılmaktadır. Titre edilebilir asitlik, asidin zayıf veya kuvvetli olduğuna bakılmaksızın toplam asit miktarını gösterir. Titre edilebilir asitlik tayini analiz sonuçları değerlendirildiğinde soya sütü ile hazırlanan titrasyon asitliği kontrolde 0.65 olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonda mikroalg ve astaksantin ilave ederek yaptığımız deneyde soya sütünün titrasyon asitliğinin S1, S2, S3 kefir numuneleri için sırasıyla 1.04, 0.74, 0.65 olduğu gözlemlenmiştir. Su kefiri ile yapılan analiz sonuçlarında su kefirinin titrasyon asitliği kontrolde 0.9 olarak bulunmuştur. Yaptığımız deneyde su kefirinin titrasyon asitliğinin W1, W2, W3, W4 kefir numuneleri için sırasıyla 0.50, 0.38, 0.49, 0.14 olduğu analiz edilmiştir.

4.2.YAğ ASİDİ PROFİLİNİN GC-MS ANALİZ SONUÇLARI

Temel gıda bileşenlerinden olan yağlar, sadece yüksek enerji kaynağı olmayıp, içerdikleri yağ asitlerinin özelliklerine bağlı olarak beslenme ve sağlık üzerinde çok önemli rollere sahiptir. Tablo 4.2'de yağ asidi ve uçucu-organik bileşikler profilinin GC-MS analiz sonuçları yer almaktadır.

Tablo 4.2: Yağ asidi profilinin GC-MS analiz sonuçları

Yağ asidi bileşikleri	S	S1	S2	S3	W	W1	W2	W3	W4
Tetradekanoik asit	0,83	0,17	0,49	-	1,65	0,572	1,059	-	-
Palmitoleik asit	0,092	0,801	1,061	0,15	-	3,187	2,379	1,774	0,349
Cis-10-Heptadekanoik asit	-	-	-	-	0,284	0,441	-	0,316	-
Heptadekanoik asit	0,062	0,103	0,099	0,061	-	-	-	-	-
Γ-Linolenik asit	-	2,171	3,244	-	-	6,525	3,88	3,299	-
(Z,Z)-9-12 Oktadekanoik asit	-	43,824	35,852	35,462	1,722	6,096	3,484	3,003	5,309
Oleik asit	15,348	17,724	13,918	12,432	3,256	1,511	1,415	1,657	4,057
Elaidik asit	1,077	1,243	1,011	0,888	0,658	0,65	0,415	0,518	0,297
Oktadekanoik asit	2,635	2,888	2,26	1,731	1,622	1,501	1,469	1,211	0,996

Gıda ürünlerinde yer alan γ-Linolenik Asit varlığı ve miktarı beslenme açısından önem taşımaktadır. %0.25 mikroalg ilaveli su kefirinde (W1) en yüksek oranda üretildiği gözlenmiştir. (Z,Z)-9,12- Oktadekadienoik asit doymamış bir yapıdadır. %0.25 mikroalg ilaveli soya sütünde (S1) en yüksek oranda sentezlediği görülmüştür. En yüksek yağ asidi üretim sonucu %0.25 mikroalg ilaveli soya sütü ile yapılan kefirde ve su kefirinde gerçekleşmiştir. Bu çoklu doymamış yağ asitleri, hücre zarı fosfolipidlerinin önemli bileşenleridir ve hücrel fiziksel özelliklerin düzenlenmesi ile ilişkilidir. Birkaç çoklu doymamış yağ asidinin kanser hücrelerine karşı sitotoksikite gösterdiği bildirilmiştir. Palmitoleik asit olarak da bilinen Omega-7, yağ oranı yüksek, bazı gıdalarda bulunan bir yağ asitidir, kolesterolü düşürmek gibi insan sağlığına birçok yararı bulunmaktadır. Su kefirleri arasında en iyi sonucu W1 ile ifade edilen %0.25 mikroalg ilaveli numunede gözlenirken soya sütü kefirleri arasından en iyi sonucu S2 vermektedir. Palmitoleik asit gruplarında toplam kolesterol, LDL seviyelerinde artış, HDL düzeylerinde azalma söz konusudur. Oleik asit, doğada pek çok bitki yağında ve % 30 oranında hayvansal yağlarda gliserin esteri olarak bulunan tekli doymamış yağ asitidir. Yapılan

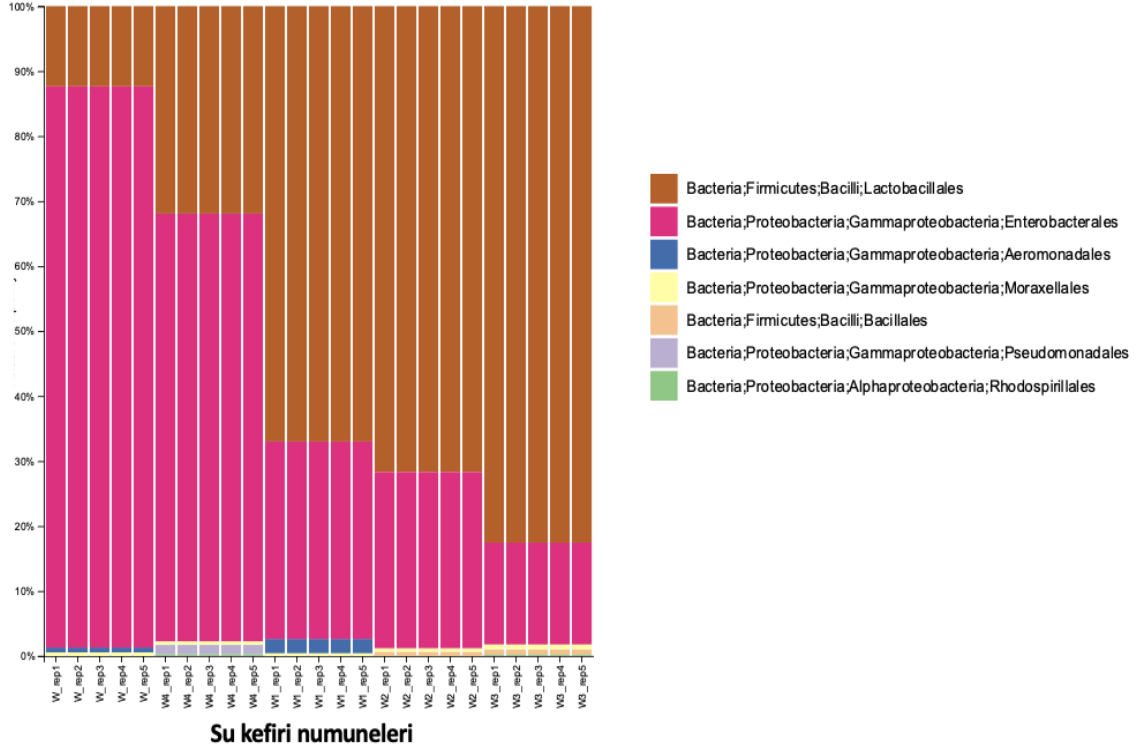
araştırmalar da elaidik asit ve oktodekanoik asitin tekli doymamış yağ asidi olarak yüksek tansiyon riskini azalttığı, kolesterolü dengeleyerek kalp ve damar hastalıklarına karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca şeker hastalarının insülin ihtiyacını azaltmakta ve kanser türlerine karşı koruyucu etki yapmaktadır. Bu yağ asitleri yine en yüksek %0.25 mikroalg ilaveli su kefir (W1)'de, soya sütü kefirleri arasından ise S1'dedir. Su ve soya sütü ile hazırlanan kefir örneklerine baktığımızda en iyi sonuç %0.25 mikroalg ilaveli W1 ve S1 numunelerinde olduğu gözlenmiştir.

4.3. FARKLI FERMANTASYON TÜRLERİ VE KOşULLARINDA DEğİşEN MİKROBİYAL TOPLULUK ANALİZ SONUÇLARININ DEğERLENDİRİLMESİ

Su kefir ve bitkisel temelli sütlerden olan soya sütünden üretilen kefirin mikrobiyal popölasyon yapısı üzerindeki etkileri yeni nesil dizileme yöntemlerinden Nanopor Dizileme Teknolojisi kullanılarak analiz edilmiştir.

4.3.1. Su kefir fermentasyonu sırasında değişen mikrobiyal komünite analiz sonuçları

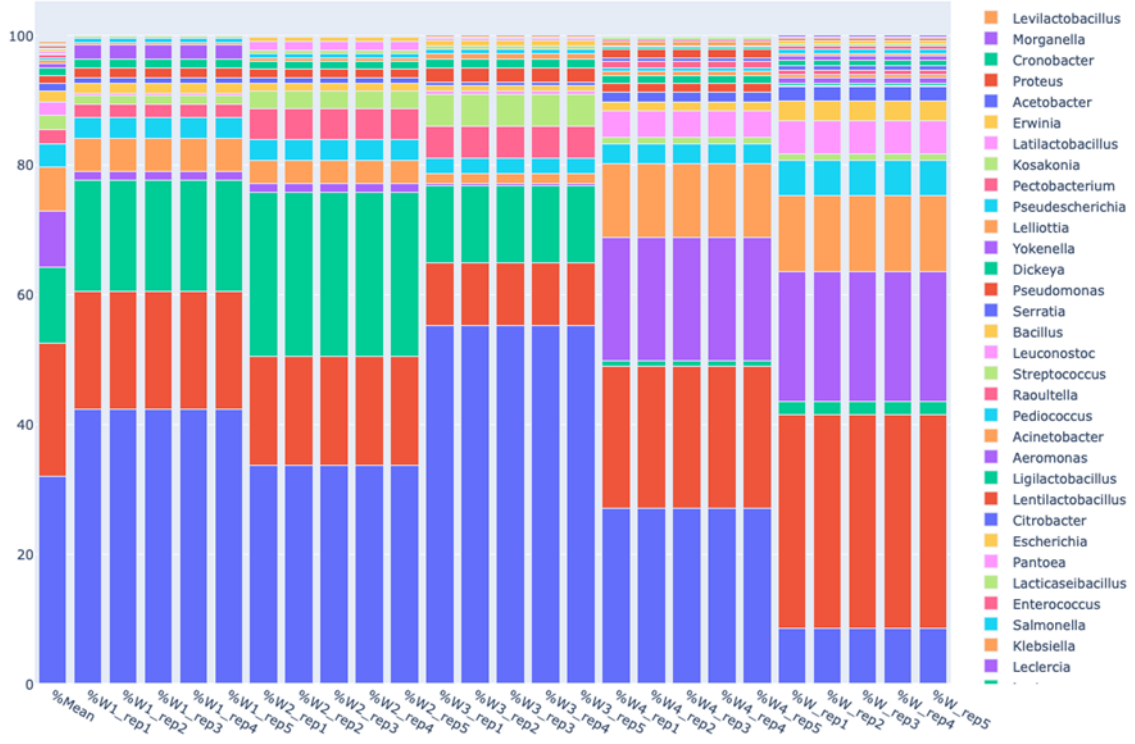
Su kefir fermentasyonu sonrasında alınan örneklerdeki mikrobiyal komünite değişimi Nanopor Dizileme Teknolojisi kullanılarak gerçekteştirilip sonuçları şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: Su kefir ile yapılan kefire mikroalg ve astaksantin ilave edilmesi sonucunda mikrobiyal komünitede oluşan Filum, Sınıf, Takım ve Aile dağılımları

Analiz sonuçlarında Firmicutes ve Proteobacteria bakteriyel filumlarının en yaygın olarak bulunduğu gözlenmiştir. Su kefir ile yapılan literatürdeki çalışmalarla bu sonuçlar benzerlik taşımakta olup bu baskın filumlara ek olarak Actinobacteria ve Pseudomonadota (ağırlıklı olarak Zymomonas) filumlarının içerdiğini gösterilmiştir (Marsh ve diğ. 2013; Gulitz ve diğ. 2013; Yerlikaya ve diğ. 2022). W1, W2, W3 ile isimlendirilen su kefir numunelerindeki genetik analiz sonuçları bakteri topluluğu esas olarak % 67, % 72, % 83 olan Firmicutes filumundan oluşurken, W ve W4'teki topluluğun çoğunluğu sırasıyla %88 ve %68 Proteobacteri'lerden oluştuğu bulunmuştur. Mikroalg ve mikroalg türevli astaksantin ilavesiyle Proteobacteri'ler azalırken, Firmicutes W'de W1, W2 ve W3'e kıyasla önemli ölçüde ($p < 0.05$) artış gösterdiği görülmektedir. Firmicutes, ağırlıklı olarak Lactobacillales takımından olan gram pozitif bakteriler içermektedir. Ayrıca bu filumun lignoselülozik biyokütlenin parçalanması ile ilgili selüloolitik enzimler ürettiği bilinmektedir. Kontrol grubunda (W) ve % 0.50 astaksantin (W4) ilavesi ile gerçekleştirilen su kefir üretiminde Gammaproteobacteria sınıfında önemli bir artış meydana gelmiş olup nispi bolluğu sınıfların kontrolde %86,3 ve W4'de %65,8'e ulaştığı gözlenmiştir. Enterobacteriaceae hem W (% 78) hem de W4'te (% 61)

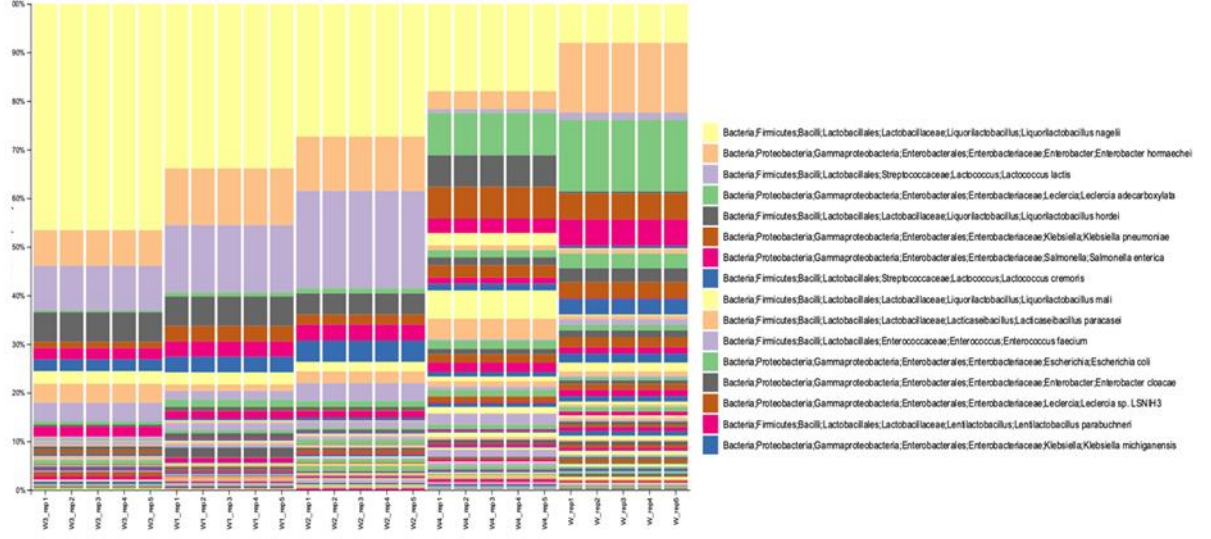
baskın aile iken, Lactobacillaceae ve Streptococcaceae W1 (% 47, % 18), W2 (% 41, % 26), W3'te (% 65, % 13) baskın aile olarak görülmektedir. Ayrıca, Enterococcaceae familyası W1 (% 2), W2 (% 5), W3 (% 5)'de çok az miktarda yer aldığı bulunmuştur.



Şekil 4.2: Su kefir ile yapılan kefire mikroalg ve astaksantin ilave edilmesi sonucunda mikrobiyal komünitede oluşan cins düzeyindeki dağılımları

Şekil 4.2’de su kefir örneklerinde alınan baskın cins dağılımları göstermiştir. Mikroalg ve mikroalg türevli astaksantin eklendiğinde mikrobiyal komünitenin cins düzeyindeki dağılımları önemli ölçüde değişti gözlenmiştir. *Liquorilactobacillus* yapılan W1 (%42,4), W2 (%33,7), W3 (%55,3) ve W4'te (%27,0) numelerinde mikrobiyal komünitede baskın cins olmasına rağmen kontrol W numesinde *Enterobacter*’in %32.9 ile baskın cins olarak yer aldığı bulunmuştur. *Liquorilactobacillus*, W’de %8.6 nispi bollukta mevcut iken şeker ilavesi yapılmaksızın %0.50 mikroalg ilave edilen W3'te %55.3 ile mikrobiyal komünitedeki oranının büyük ölçüde arttığı bulunmuştur. *Lactococcus*, W1 (%17,2), W2 (%25,3), W3 (%11,9)'de en çok bulunan ikinci cinsti; ancak kontrol olarak hazırlanan W (%2) ve şekersiz astaksantin ilavesi ile hazırlanan W4'te oranı büyük ölçüde (%0,7) azalmıştır. Kontrol numunesindeki (W) mikrobiyal komünite de *Enterobacter* %32 oranında baskın cinsi oluştururken farklı miktarlardaki mikroalg ve

astaksantin ilave ile baskınlığının önemli ölçüde azaldığı W1 (18.1%), W2 (16.8%), W3 (9.6%) ve W4 (22%) görülmüştür. Ayrıca *Leclercia* (19%) ve *Klebsiella* (11%) yüzdesi W ve W4'de benzer oranlarda bulunurken W1(1.2%; 5.1%), W2(1.3%; 3.5%) ve W3(0.4%; 1.4%) numunelerinde nispi bollukları anlamlı bir şekilde ($p < 0.05$) azaldığı gözlenmiştir.



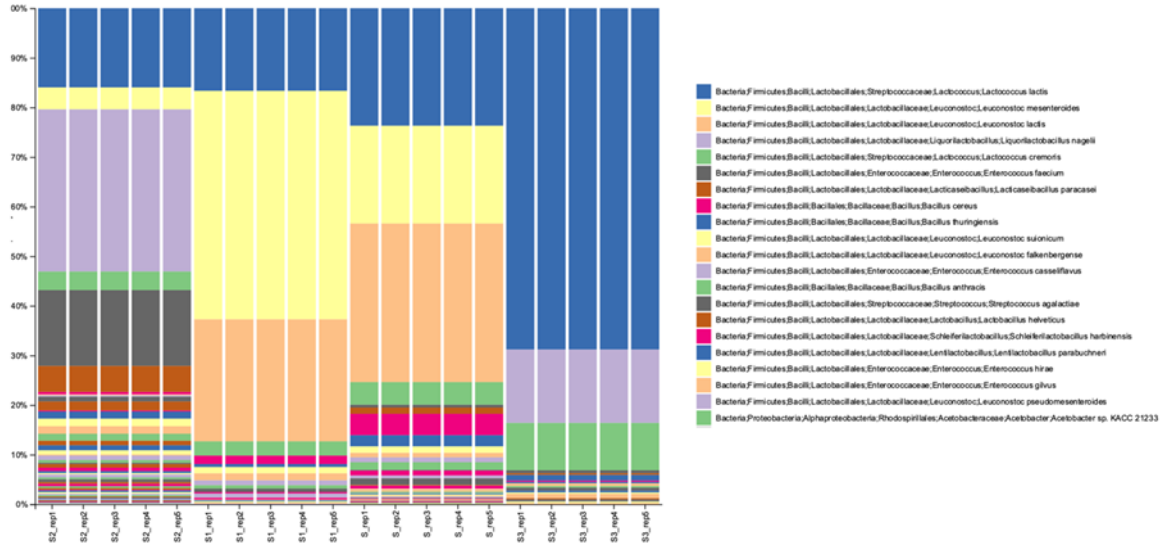
Şekil 4.3: Su kefir ile yapılan kefire mikroalg ve astaksantin ilave edilmesi sonucunda mikrobiyal komünitede oluşan tür düzeyindeki dağılımları

Mikroalg ve mikroalg türevli astaksantin pigmentinin su kefirine ilavesi bakteri taksonlarının tür düzeyindeki nispi bolluğunda anlamlı değişiklikler yarattığı Şekil 4.3'te gösterilmektedir. *Liquorilactobacillus nagelii* türü W1 (% 33,8), W2 (% 27,3) ve W3 (% 46,6)'den alınan örneklerinde baskın olarak yer alırken W (%8) ve W4 (%18) örneklerindeki mikrobiyal popülasyondaki yüzdesinin önemli ölçüde azaldığı ($p < 0,05$) görülmüştür. *L. nagelii* ekzopolisakkarit biyosentezi gerçekleştiren bir tür olup gıda biyoteknolojisinde oldukça önem taşımaktadır. Yapılan farklı çalışmalar bu laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin prebiyotik ve antioksidan özelliğe sahip olabileceği gösterilmiştir. Bu laktik asit bakteri türleri insan sağlığı açısından güvenli olduklarından risk taşımadan ekzopolisakkarit üretme yeteneğindedirler. Ayrıca üretilen bu ekzopolisakkarit sentezi antikanser ve immün modülatör etki göstermektedirler (Bechtner ve diğ. 2021). *Lactococcus lactis*, W2 (% 20.034), W1 (% 13.8) ve W3 (% 9.181) numunelerinde yüksek bir nispi bolluğa sahip iken kontrol (W) (%1.52) ve W4 (%0.77) örneklerinde önemli oranda azalan bir değişim

göstermiştir. *Lactobacilli*, antimikrobiyal maddeler salgılayarak patojen büyümesini baskılamaktadır.

4.3.2. Soya sütü kullanılarak hazırlanan kefir fermentasyonu sırasında değişen mikrobiyal komünite analiz sonuçları

Bitkisel temelli soya sütü ile hazırlanan kefir fermentasyonu sonrasında alınan örneklerdeki mikrobiyal komünite değişimi Nanopor Dizileme Teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilip sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4: Soya sütü ile yapılan kefire mikroalg ve astaksantin ilave edilmesi sonucunda mikrobiyal komünitede oluşan tür düzeyindeki dağılımları

S (Kontrol) numunesindeki mikrobiyal komünite S1 (% 0.25 oranında mikroalg ilavesi), S2 (% 0.50 oranında mikroalg ilavesi) ve S3 (%0.50 astaksantin ilavesi) ile karşılaştırıldığında önemli miktarda farklılıklar gözlemlendiği görülmektedir. Kontrol numunesi olarak hazırlanan S'nin mikrobiyal bileşimi *Leuconostoc lactis* (%31,98), *Lactococcus lactis* (%23,68), *Leuconostoc mesenteroides* (%19,72), daha düşük miktarlarda *Lactococcus cremoris* (%4,55) vardır. Kontrol soya sütü kefirinde ayrıca düşük oranda faydalı olmayan bağışıklık sistemi düşük hastalarda hastalığa sebep olabilecek fırsatçı patojen bakteri türlerini de içerdiği görülmektedir. Kontrol de bu oran %4,32 olarak belirlenmiştir. Farklı oranlarda ilave edilen mikroalg ve astaksantin konsantrasyonları S1, S2 ve S3 kefir numunelerindeki fırsatçı patojenlerin

kolonizasyonunun önlenmesinde etkili olduğu gözlenmektedir. Astaksantin ilavesi anlamlı bir şekilde *Lactococcus lactis* miktarına etki ettiği gözlenmiştir. Astaksantin ilave edilen soya sütü kefiri numunelerinde (S3) *L. lactis* % 68.797 oranında yüksek bir nispi bolluğa sahip iken kontrol (S) (%23.67), S1 (%16.64) ve S2 (%15.96) örneklerinde S3 ile kıyasla azalan bir değişim göstermiştir. S1'in mikrobiyal bileşimi S ile benzer faydalı mikrobiyal türlere sahip olduğu görülmektedir. S1 kefirine % 0.25 mikroalg ilavesiyle *Leuconostoc mesenteroides* miktarının anlamlı miktarda arttığı (%46.06) gözlenmiştir. Bakteriyosinler, *Leuconostocmesenteroides* tarafından üretilen ribozomal olarak üretilen antimikrobiyal peptidlerin veya proteinlerin büyük ve çeşitli bir grubudur. Gıda şirketleri, gıdayı kontaminasyona karşı koruyabilen ve/veya bakteri üremesini önleyebilen mikroorganizmalar tarafından bakteriyosinlerin sentezi ile ilgilenmektedir. % 0.50 mikroalg ilave edilen S2 kontrol ve S1 ile kıyaslandığında daha zengin bir mikrobiyal çeşitlilik içerdiği gözlenmiştir. S2 kefir numunesi *Liquorilactobacillus nagelii* (%32,70), *Lactococcus lactis* (%15,96), *Enterococcus faecium* (%15,29), *Lacticaseibacillus paracasei* (%5,22), *Leuconostoc mesenteroides* (%4,42), *Lactococcus cremoris* (%3,73) içermektedir. S2'deki *Enterococcus faecalis* bakteri miktarındaki artış S ve S1 kefirine göre oldukça fazladır. *Enterococcus faecalis*, sahip olduğu özelliklerden dolayı fermente süt ve et ürünlerinin olgunlaşması sırasında diğer laktik asit bakterileriyle birlikte başlangıç kültürü olarak önem taşımaktadır. |

|

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fermente gıda ürünleri, sağlık açısından önemli olan laktik asit bakterilerinin tür çeşitliliği açısından zengin bir kaynak oluşturmaktadır (You ve diğ. 2022). Metagenomik dizileme ve biyoinformatik teknolojisindeki ilerlemeler sayesinde fermentasyon sırasında yer alan mikrobiyal bileşimi, bunların sağlık açısından önemi, farklı fermentasyon süreçleriyle üretilen gıdaların özellikleri ve bunlarda yer alan önemli aktif bileşikler daha iyi anlamamızı sağlamıştır. Yeni mikrobiyal kaynakların keşfi ve izolasyonu, farklı fermente gıda ürünlerinde yer alan mikrobiyal çeşitliliğin yeni nesil dizileme analizleri ile incelenmesiyle daha çok anlaşılır hale gelmiştir (Alejandra Villarreal-Soto ve diğ. 2020). *Haematococcus pluvialis* mikroalg ve bu mikroalg türünün ürettiği astaksantin pigmenti takviyesi, su kefiri ve soya sütü kefiri örneklerinde mikrobiyal komüniteyi probiyotikler yönünden teşvik edici ve yer alan mikrobiyal komünitenin sentezlediği bileşenlerle prebiyotik bir etkiye sahiptir ve vegan kefirlerin besleyici ve biyoaktif özelliklerini arttırmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmada *Haematococcus pluvialis* mikroalg ve bu mikroalgin ürettiği astaksantin pigmentinin farklı fermentasyon ürünlerine eklenmesi, üretilen fonksiyonel kefirin mikrobiyal topluluk yapısını önemli ölçüde değişimine yol açmıştır. Özellikle su kefiri ve soya sütü kefirine ilave edilen mikroalg konsantrasyonu fermentasyonda yer alan *Liquorilactobacillus nagelii* miktarını anlamlı bir şekilde artışı sağlayarak farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip dekstranlar üreten laktik ait bakterileri için önemli bir kaynak yaratmaktadır.

L. nagelii bu farklı yapıdaki ekzopolisakkarit biyosentezi sağlık açısından önem taşımaktadır. Yapılan farklı çalışmalar bu laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkarit biyosentezinin prebiyotik ve antioksidan özelliğe sahip olabileceği gösterilmiştir. Ekzopolisakkaritler, doğada yaygın olarak bulunur ve bakteri, maya, mantar, küf ve mavi-yeşil algler dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilir. Fakat bu laktik asit bakteri türleri insan sağlığı açısından güvenli olduklarından risk taşımadan ekzopolisakkarit üretme yeteneğindedirler (Bechtner ve diğ. 2021; Tan ve diğ. 2022; Yetimen ve Ortakçı 2022). Fiziksel-kimyasal çalışma, dekstranın yüksek konsantrasyonda, düşük sıcaklıkta ve asidik pH'ta olağanüstü termal stabiliteye ve yüksek viskoziteye sahip olduğunu ortaya çıkarmış olup, bu da onu termal olarak işlenmiş gıdalar ve asidik gıda fermentasyonunda kullanım için dikkat çekici kılmaktadır. Ayrıca mikroalg ilavesi ile artan laktik asit bakterileri antimikrobiyal maddeler salgılayarak patojen büyümesini baskılamaktadır. Bu da fermentatif ürünlerin mikrobiyal

florasında bulunması olası olan fırsatçı patojen türlere karşı savunma sağladığı görülmüştür. Su kefiri mikroalgleri ve mikroalglerden üretilen astaksantin kullanımı ile özellikle fırsatçı patojenleri içirme olasılığı yüksek fermentatif gıdaların yaşlılar ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar tarafından güvenle tüketilebileceğini göstermektedir. Ayrıca bitkisel kaynaklı kefir üretimine sağlıklı bir alternatif olarak, %0,50 *Haematococcus pluvialis* mikroalg biyokütlesi ile zenginleştirilmiş soya sütü kefiri, daha yüksek mikrobiyal çeşitlilik, protein indeksi ve daha düşük yağ profili içermesi nedeniyle popülasyonun rutin olarak tükettiği diyet alımını iyileştirmek için uygulanabilir bir seçenektir. Astaksantin ilave edilen soya sütü kefiri numunelerinde (S3) *L. lactis* % 68.797 oranında yüksek bir nispi bolluğa sahip iken kontrol (S) (%23.67), S1 (%16.64) ve S2 (%15.96) örneklerinde S3 ile kıyasla azalan bir değişim göstermiştir. Buna ilave olarak yağ asidi üretim sonuçları eklenen mikroalg miktarı ile değişmekte olup, en yüksek yağ asidi üretimi %0.25 mikroalg ilaveli soya sütü ile yapılan kefirde ve su kefirinde gerçekleşmiştir. Fonksiyonel gıdaların sağlıklı beslenme açısından değeri doğrultusunda bu alanda yeni çalışmaların gerçekleştirilmesi önem taşımaktadır. Mikrobiyal çeşitlilik ile zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdalarında sağlıklı beslenmeye destek sağlayacağı bilinmektedir. Gerçekleştirilen tez çalışması literatüre ve yenilikçi fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi sürecinde beslenme ve gıda alanlarına katkı sağlayacak bir çalışmadır. İleriki çalışmalarda farklı fermente ürünleri farklı özellikte mikroalg türleri ile fermente edilerek mikrobiyal çeşitlilik üzerindeki etkilerinin incelenmesinin yer alan mikrobiyal floradaki probiyotik türler ve bunların ürettikleri ekzopolisakkaritlerin incelenmesi açısından anlamlı farklılıklar taşıyacağı düşünülmektedir. Ayrıca mikroalg türevli astaksantin gibi mikroalglerin ürettiği farklı biyoaktif ve antioksidan değeri yüksek bileşikler fermentatif gıdaların fermentasyon sürecindeki sağlığa etkisinin arttırılması amacıyla incelenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmed, Z. *et al.* (2013) 'Kefir and Health: A Contemporary Perspective', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 422–434. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.540360>.
- Alejandra Villarreal-Soto, S. *et al.* (2020) *Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha*.
- Barkallah, M. *et al.* (2017) 'Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage', *LWT*, 84, pp. 323–330. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.071>.
- Bechtner, J. *et al.* (2021) 'Insights into extracellular dextran formation by *Liquorilactobacillus nagelii* TMW 1.1827 using secretomes obtained in the presence or absence of sucrose', *Enzyme and Microbial Technology*, 143. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109724>.
- Ben Atitallah, A. *et al.* (2019) 'Physicochemical, textural, antioxidant and sensory characteristics of microalgae-fortified canned fish burgers prepared from minced flesh of common barbel (*Barbus barbus*)', *Food Bioscience*, 30. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100417>.
- Berciano, F.Á. and Caro, F.Á. (2008) *Reacciones adversas a alimentos e historia natural de la alergia alimentaria en la infancia*.
- Bernaerts, T.M.M. *et al.* (2018) 'Impact of different sequences of mechanical and thermal processing on the rheological properties of *Porphyridium cruentum* and *Chlorella vulgaris* as functional food ingredients', *Food and Function*, 9(4), pp. 2433–2446. Available at: <https://doi.org/10.1039/c8fo00261d>.
- Bianco, M. *et al.* (2022) 'A new paradigm to search for allergenic proteins in novel foods by integrating proteomics analysis and in silico sequence homology prediction: Focus on spirulina and chlorella microalgae', *Talanta*, 240. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123188>.

- Blasche, S. *et al.* (2021) 'Metabolic cooperation and spatiotemporal niche partitioning in a kefir microbial community', *Nature Microbiology*, 6(2), pp. 196–208. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00816-5>.
- Corona, O. *et al.* (2016) 'Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices', *LWT*, 66, pp. 572–581. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.014>.
- Fakhri, S. *et al.* (2018) 'Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits', *Pharmacological Research*. Academic Press, pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.012>.
- De La Fuente-Salcido, N.M. *et al.* (2015) 'Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M-Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México', *Food Science and Nutrition*, 3(5), pp. 434–442. Available at: <https://doi.org/10.1002/fsn3.236>.
- De Sainz, I. *et al.* (2020) 'Short communication: Effect of different kefir grains on the attributes of kefir produced with milk from Costa Rica', *Journal of Dairy Science*, 103(1), pp. 215–219. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15970>.
- Fiorda, F.A. *et al.* (2017) 'Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review', *Food Microbiology*. Academic Press, pp. 86–95. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>.
- Galasso, C. *et al.* (2018) 'On the neuroprotective role of astaxanthin: New perspectives?', *Marine Drugs*. MDPI AG. Available at: <https://doi.org/10.3390/md16080247>.
- Grimmig, B. *et al.* (2017) 'Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration', *GeroScience*. Springer International Publishing, pp. 19–32. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11357-017-9958-x>.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M. and Malcata, F.X. (2011) 'Microalgae as sources of carotenoids', *Marine Drugs*. MDPI AG, pp. 625–644. Available at: <https://doi.org/10.3390/md9040625>.

- Guerin, M., Huntley, M.E. and Olaizola, M. (2003) 'Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, pp. 210–216. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7).
- Gulitz, A. *et al.* (2011) 'The microbial diversity of water kefir', *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), pp. 284–288. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>.
- Gulitz, A. *et al.* (2013) 'Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis', *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), pp. 1082–1091. Available at: <https://doi.org/10.1111/jam.12124>.
- Guzel-Seydim, Z.B., Gökırmaklı, Ç. and Greene, A.K. (2021) 'A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, pp. 42–53. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>.
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L. and Goycoolea, F.M. (2006) 'Astaxanthin: A review of its chemistry and applications', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 185–196. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>.
- Kaczmarek, K.T. *et al.* (2018) 'Aroma characteristics of lupin and soybean after germination and effect of fermentation on lupin aroma', *LWT*, 87, pp. 225–233. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.080>.
- Lafarga, T. (2019) 'Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products', *Algal Research*. Elsevier B.V. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101566>.
- Lafarga, T. *et al.* (2021) 'Consumer attitudes towards microalgae production and microalgae-based agricultural products: The cases of almería (spain) and livorno (italy)', *ChemEngineering*, 5(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/chemengineering5020027>.
- Laureys, D. and de Vuyst, L. (2014) 'Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water Kefir fermentation', *Applied and Environmental*

Microbiology, 80(8), pp. 2564–2572. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>.

Laureys, D. and de Vuyst, L. (2017) ‘The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process’, *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), pp. 719–732. Available at: <https://doi.org/10.1111/jam.13370>.

Laureys, D. *et al.* (2018) ‘Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process’, *Food Microbiology*, 73, pp. 351–361. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.007>.

Laureys, D. *et al.* (2019) ‘The Buffer Capacity and Calcium Concentration of Water Influence the Microbial Species Diversity, Grain Growth, and Metabolite Production During Water Kefir Fermentation’, *Frontiers in Microbiology*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02876>.

Li, W. *et al.* (2019) ‘Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects’, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., pp. 340–353. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.008>.

Martínez-Torres, A. *et al.* (2017) ‘Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations’, *International Journal of Food Science and Technology*, 52(2), pp. 559–571. Available at: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13312>.

Martínez, J.M. *et al.* (2019) ‘Use of pulsed electric field permeabilization to extract astaxanthin from the Nordic microalga *Haematococcus pluvialis*’, *Bioresource Technology*, 289. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121694>.

Pam Ismail, B. *et al.* (2020) ‘Protein demand: Review of plant and animal proteins used in alternative protein product development and production’, *Animal Frontiers*, 10(4), pp. 53–63. Available at: <https://doi.org/10.1093/af/vfaa040>.

Randazzo, W. *et al.* (2016) ‘Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms’, *Food Microbiology*, 54, pp. 40–51. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.018>.

Reifl, J. (1990) *Metabolic activity of Tibi grains*, *Z Lebensm Unters Forsch.*

Sá, A.G.A., Moreno, Y.M.F. and Carciofi, B.A.M. (2020) 'Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, pp. 170–184. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>.

Sanchez, M.P. *et al.* (2019) 'Sequence-based GWAS, network and pathway analyses reveal genes co-associated with milk cheese-making properties and milk composition in Montbéliarde cows', *Genetics Selection Evolution*, 51(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0473-7>.

Singh, U.B. and Ahluwalia, A.S. (2013) 'Microalgae: A promising tool for carbon sequestration', *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. Kluwer Academic Publishers, pp. 73–95. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11027-012-9393-3>.

Turrin, N.P. and Rivest, S. (2006) 'Introduction Molecular and Cellular Immune Mediators of Neuroprotection', *Molecular Neurobiology*, 221.

Varela-Moreiras, G., Requejo, A. and Ortega, R. (2013) 'Libro blanco de la nutrición en Espana', *Madrid: Fundación Espanola de la Nutrición (FEN) y Agencia Espanola de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN)* [Preprint].

Velázquez, L. *et al.* (2021) 'Natural antioxidants from endemic leaves in the elaboration of processed meat products: Current status', *Antioxidants*. MDPI. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox10091396>.

Verce, M., de Vuyst, L. and Weckx, S. (2019) 'Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species', *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR). Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>.

Verce, M., de Vuyst, L. and Weckx, S. (2020) 'The metagenome-assembled genome of *Candidatus Oenococcus aquikefiri* from water kefir represents the species *Oenococcus sicerae*', *Food Microbiology*, 88. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103402>.

- Waldherr, F.W. *et al.* (2010) 'Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir', *Food Microbiology*, 27(5), pp. 672–678. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.013>.
- Yerlikaya, O., Akan, E., & Kinik, Ö. (2022). The metagenomic composition of water kefir microbiota. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 30, 100621. <https://doi.org/10.1016/J.IJGFS.2022.100621>
- Yetiman, A. E., & Ortakci, F. (2022). Genomic, probiotic, and metabolic potentials of *Liquorilactobacillus nagelii* AGA58, a novel bacteriocinogenic motile strain isolated from lactic acid-fermented shalgam. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.10.008>
- You, L. *et al.* (2022) 'Metagenomic features of traditional fermented milk products', *LWT*, 155. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112945>. |



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	SümeYYe Yıldız
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Necmettin Erbakan Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	12.07.2019

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Biyoteknoloji Programı