

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Gözde KONURAY ALTUN

ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus coagulans* SUŞLARININ PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MAKARNA ÜRETİMİNDE KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2022

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus coagulans*
SUŞLARININ PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE
MAKARNA ÜRETİMİNDE KULLANIM OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Gözde KONURAY ALTUN

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 30/09/2022 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN ÇAKMAKÇI
ÜYE

.....
Prof. Dr. M. Sertaç ÖZER
ÜYE

.....
Prof. Dr. Hüseyin ERTEN
ÜYE

.....
Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2017-8813

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus coagulans* SUŞLARININ PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MAKARNA ÜRETİMİNDE KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Gözde KONURAY ALTUN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Yıl: 2022, Sayfa: 210
Jüri : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN ÇAKMAKÇI
: Prof. Dr. M. Sertaç ÖZER
: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN
: Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN

Bu çalışmada, bitkisel kaynaklardan izole edilerek tanımlamaları yapılan ve *Bacillus coagulans* olduğu saptanan dört farklı izolatın (SC, SD, SPi ve STp) bazı özellikleri belirlenmiş olup, yüksek sıcaklığa (80°C, 90°C ve 100°C) ve düşük pH'ya (1, 2, 3 ve 4), safra tuzu ve lizozime dirençli oldukları tespit edilmiştir. İzolatların çalışmada kullanılan antibiyotiklere duyarlı, biyofilm üretme özelliğine ve *B. cereus*, *Escherichia coli* NCTC 12241, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Salmonella* spp. üzerinde inhibe edici etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca enterotoksin genlerinin bulunmadığı, enterotoksin üretiminin, hemolitik ve lesitinaz aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir. Sonuçlar, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile kıyaslanmış ve probiyotik olarak kullanım için uygun özelliğe sahip oldukları belirlenmiştir. *B. coagulans* suşları kullanılarak üretilen probiyotik makarnaların 0. gün ve 6 ay oda koşullarında depolama süresi sonunda kalite ve mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır. 6 ay sonunda *B. coagulans* sayısının 6 log kob/g değerinden yüksek olması ile üretilen örneklerin probiyotik ürün olma özelliğini koruduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Bacillus coagulans*, probiyotik, karakterizasyon, makarna

ABSTRACT

PhD THESIS

DETERMINATION OF PROBIOTIC ACTIVITY OF *Bacillus coagulans* STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCES AND THEIR USE IN PROBIOTIC PASTA PRODUCTION

Gözde KONURAY ALTUN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

Supervisor : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Year: 2022, Page: 210
Jury : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN ÇAKMAKÇI
: Prof. Dr. M. Sertaç ÖZER
: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN
: Assoc. Prof. Dr. Emel ÜNAL TURHAN

In the present study, four different *Bacillus coagulans* strains (SC, SD, SPi and STp) were isolated from plant-based sources, characterized and screened for the different properties. All the strains had the properties of resistance to heat treatment (80°C, 90°C and 100°C), low pH (1, 2, 3 and 4), bile salts and lysozyme, were antibiotic-sensitive and able to produce biofilm and had antibacterial activity against test cultures (*B. cereus*, *Escherichia coli* NCTC 12241, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 and *Salmonella* spp.). The safety of these strains was confirmed as no enterotoxin genes were present and enterotoxins were not detected. Hemolytic activity and lecithinase production did not occur. The results were compared with *B. coagulans* GBI-30, 6086 and it has been determined that the isolates were suitable for use as probiotics. The quality and microbiological characteristics of probiotic pasta samples produced with *B. coagulans* addition were determined at production day and after 6 months of storage at room temperature. Due to the *B. coagulans* count of pasta was above 6 log CFU/g, the samples can be considered as a probiotic product after 6 months of storage at room temperature.

Keywords: *Bacillus coagulans*, probiotic, characterization, pasta

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu çalışmada, bitkisel kaynaklardan *Bacillus* spp. izole edilerek, geleneksel ve moleküler yöntemlerle tanımlamaları yapılmış ve *Bacillus coagulans* olduğu saptanan izolatların; gelişim koşulları, probiyotik özellikleri ve toksikolojik özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra, ticari probiyotik *B. coagulans* GBI-30, 6086 ve izole edilen 4 farklı *B. coagulans* kullanılarak probiyotik makarna üretimi gerçekleştirilmiş olup, makarnalar 6 ay depolanmıştır. Makarna örneklerinin üretildikleri gün ve oda sıcaklığında 6 ay depolanmalarından sonra kalite karakteristikleri belirlenerek mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmiştir.

Gram-pozitif, sporlu, basil, katalaz pozitif, organik asit üreten ve nişastayı hidrolize edebilen özellikleriyle, taksonomik olarak *B. coagulans* olduğu saptanan izolatlar, moleküler tanımlama yöntemiyle doğrulanmıştır. Toplamda 4 izolat ve ticari *B. coagulans* GBI-30, 6086 kullanılarak yüksek sıcaklık, düşük pH, safra tuzu ve lizozime direnç, biyofilm ve ekzopolisakkarit üretimi, antibakteriyel aktivite, agregasyon özellikleri ve antibiyotik direnç özellikleri araştırılmıştır. Enterotoksin genlerinin varlığı ve enterotoksin üretimi incelenmiş olup, hemolitik aktivite ve lesitinaz üretimi araştırılmıştır. İzolatların karakteristikleri, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile kıyaslanmıştır.

B. coagulans sporlarının sıcaklık dirençleri 80°C, 90°C ve 100°C’de incelenmiş ve en yüksek spor kaybı STp ve SPi suşlarında 100°C’de 30 dk sonunda tespit edilmiştir. SD ve SPi sporlarının 80°C’deki canlılık oranlarının diğerlerine göre önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Ortam pH’sının 1 olduğu durumda, SD ve STp suşlarının, pH 2 olan ortamda ise sadece STp suşunun canlılık oranının *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile benzer olduğu tespit edilmiştir. SC suşunun canlılık değeri ise, pH 2 olan ortamda önemli ölçüde düşmüştür.

Safra tuzu konsantrasyonu %0.3 olan ortamda, 1 saat inkübasyon sonunda en düşük canlı kalma oranı SC suşunda, (%48.5) gözlenmiş olup diğer bakterilerin

canlı kalma oranlarının birbiriyle benzer olduğu bulunmuştur. Safra tuzu konsantrasyonu %0.3 olan ortamda, 3 saat inkübasyon sonunda ise canlı kalma oranlarının benzer olduğu tespit edilmiştir. Safra tuzu konsantrasyonu %0.5 olan ortamda ise, 1 saat inkübasyon sonunda SC suşunun, 3 saat inkübasyon sonunda ise hem SC hem de SPi suşlarının canlılıkları tespit edilememiştir.

B. coagulans suşlarının tamamının, lizozime karşı dirençliliklerinin birbirinden önemli ölçüde farklı olduğu tespit edilmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile SC, SPi ve STp suşlarının biyofilm üretim özellikleri açısından benzer oldukları gözlenmiştir. Adhezyon özelliklerinin de biyofilm üretimleri ile benzer olduğu tespit edilmiştir. Suşların, otoagregasyon özelliklerinin 2 saat inkübasyon sonunda benzer olduğu sonucuna varılmıştır. Koagregasyon özellikleri incelendiğinde, bütün suşların kullanılan test bakterileriyle (patojen ve patojen olmayan) agregasyon yeteneklerinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi amacıyla kullanılan kültürlerin (*B. cereus*, *E. coli* NCTC 12241, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *Salmonella* spp.) üzerinde bütün *B. coagulans*'ların inhibe edici etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

Antibiyotik direnç test sonuçlarına göre tüm *B. coagulans* suşlarının araştırmada kullanılan antibiyotiklere (ampisilin, eritromisin, gentamisin, kanamisin, klindamisin, kloramfenikol, rifampin, siprofloksasin, streptomisin, tetrasiklin ve vankomisin) duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Kültürlerde enterotoksin genlerinin (*bceT*, *ces*, *entFM* ve *cytK*) bulunmadığı tespit edilmiş olup, Hbl ve nhe enterotoksinlerinin üretiminin de olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca kültürlerin hemoliz negatif olduğu ve lesitinaz aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir.

Ayrıca izole edilen kültürler ve *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 kullanılarak probiyotik makarna üretimi gerçekleştirilmiş ve 6 ay kilitli poşet içerisinde oda koşullarında depolama sonunda makarnaların kalite özellikleri değerlendirilmiştir. Örneklerin duyuşal özellikleri ile *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnalarla benzer olmasının yanı sıra, 6 ay depolama sonunda

probiyotik kültür konsantrasyonunun 6 log değerinin üzerinde olduğu tespit edilmesiyle üretilen makarnaların probiyotik ürün özelliğini koruduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada izole edilen ve probiyotik olarak kullanım amacıyla belirli özellikleri değerlendirilen ve probiyotik fonksiyonel ürün üretimi amacıyla probiyotik makarna üretiminde kullanılan kültürlerin potansiyel probiyotik özelliklere sahip oldukları, ayrıca üretim ve hazırlama aşamalarında sıcaklık uygulanan probiyotik gıda üretiminde kullanımlarının da elverişli olduğu tespit edilmiştir. Ancak, bu kültürlerin probiyotik olarak tüketime sunulabilmesi için *in vivo* zelliklerinin de belirlenmesi, sonraki aşamalarda bu alanda çalışmaların yapılması gerekmektedir.



TEŞEKKÜR

Öncelikle bana kendisi ile birlikte çalışma şansını tanıyan ve çalışmalarımın her aşamasında desteğini gördüğüm değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zerrin Erginkaya'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezi jüri üyelerinden Prof. Dr. Aynur Gül Karahan Çakmakçı'ya ve Prof. Dr. M. Sertaç Özer'e tez izleme komitesinde yer alarak, çalışmamın tüm aşamalarında yönlendirici ve olumlu katkılarından dolayı, ayrıca değerli hocalarım Prof. Dr. Hüseyin Erten ve Doç. Dr. Emel Ünal Turhan'a değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın önemli bir bölümünü laboratuvarlarında gerçekleştirme olanağı bulduğum Prof. Dr. Thomas Wiegert ve ekibine (Zittau/Görlitz Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Almanya), Doç. Dr. B. Devrim Özcan'a ve Biyolog Elif Dikkaya'ya teşekkürlerimi sunarım. Tezim sırasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım Ar. Gör. G. Nil Yazıcı ve Ar. Gör. Tansu Taşpınar'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında sonsuz desteklerini gördüğüm sevgili ailem annem Şükran Konuray, babam Ahmet Konuray, abim Mehmet Konuray'a ve sevgili eşim Deniz Altun'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya maddi olanak sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi'ne (Proje No: FDK-2017-8813) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Probiyotikler	7
2.2. Probiyotik Mikroorganizmaların Taşınması Gereken Özellikler.....	13
2.3. Probiyotik Gıdalar ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	17
2.4. Bakteri Sporları ve Genel Özellikleri.....	22
2.4.1. <i>Bacillus</i> Sporları İle İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	24
2.5. <i>Bacillus</i> Türlerinin Probiyotik Olarak Kullanımı ve Yapılan Çalışmalar	26
2.6. <i>Bacillus coagulans</i>	36
2.6.1. <i>B. coagulans</i> 'ın Probiyotik Özellikleri Üzerine Yapılmış Çalışmalar.....	42
2.6.2. <i>Bacillus coagulans</i> 'ın Toksikolojik Özellikleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	48
2.6.3. <i>Bacillus coagulans</i> 'ın Antimikrobiyel Aktivitesi ve Antibiyotik Direnci ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	50
2.7. Makarna	52
2.7.1. Makarnanın Kalite Karakteristikleri.....	56
2.7.2. Makarnanın Yapısal Karakteristikleri.....	61

2.7.3. Makarna ile İlgili Yapılmış Bazı Çalışmalar	63
3. MATERYAL VE YÖNTEM	69
3.1. Materyal	69
3.1.1. Mikroorganizmalar	69
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri	69
3.1.3. Makarna Üretiminde Kullanılan Materyaller	69
3.2. Yöntem	69
3.2.1. Araştırma Planı	69
3.2.3. Bakteri Kültürlerinin İzolasyonu ve Stok Kültürlerinin Hazırlanması	70
3.2.4. Bakteri Kültürlerinin Tanımlanması	71
3.2.5. İzolatların Moleküler Olarak Tanımlanması	73
3.2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu	73
3.2.5.2. DNA Miktarının Tayini	74
3.2.5.3. Amplifikasyon	74
3.2.5.4. Elektroforez	75
3.2.5.5. PCR ürünlerinin Saflaştırılması ve Sekans Analizi	77
3.2.6. Bakterilerin Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması	77
3.2.7. Bakterilerin Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması	78
3.2.8. İzolatların Bazı Gelişim ve Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	79
3.2.8.1. Sıcaklık Toleranslarının Belirlenmesi	79
3.2.8.2. Termal Ölüm Eğrilerinin Belirlenmesi	79
3.2.8.3. Düşük pH Ortamlarında Gelişim Özelliklerinin Belirlenmesi	80
3.2.8.4. Safra Tuzuna Karşı Dirençliliklerinin Belirlenmesi	81
3.2.8.5. Lizozime Karşı Dirençliliklerinin Belirlenmesi	81
3.2.8.6. Biyofilm Üretme Özelliklerinin Belirlenmesi	82
3.2.8.7. Ekzopolisakkarit Üretme Özelliklerinin Belirlenmesi	82

3.2.8.8. Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi	82
3.2.8.9. Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi	83
3.2.8.10. Agregasyon Özelliklerinin belirlenmesi	83
3.2.8.11. Toksikolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	85
3.2.9. Probiyotik Makarna Üretimi.....	92
3.2.10. Makarna Örneklerinde Yapılan Analizler	93
3.2.10.1. Nem Tayini	93
3.2.10.2. Kül Tayini	94
3.2.10.3. Pişme Süresi Tayini	94
3.2.10.4. Su Absorpsiyonu Analizi	94
3.2.10.5. Pişme Kaybı Analizi	95
3.2.10.6. Tekstür Analizi.....	95
3.2.10.7. Renk Analizi	96
3.2.10.8. Duyusal Analiz.....	97
3.2.10.9. Mikrobiyolojik Analizler	98
3.2.11. İstatistiksel Analizler	99
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	101
4.1. <i>Bacillus coagulans</i> 'ın Tanımlanması.....	101
4.2. Sıcaklık Toleransları	102
4.3. Bakterilerin D Değerleri.....	106
4.4. <i>Bacillus coagulans</i> Suşlarının Düşük pH'larda Gelişim Özellikleri.....	108
4.5. <i>B. coagulans</i> Kültürlerinin Safra Tuzuna Karşı Dirençlilikleri	110
4.6. Lizozim dirençlilikleri	113
4.7. Biyofilm Üretim Özellikleri.....	113
4.8. Ekzopolisakkarit Üretme Özellikleri	114
4.9. Antibakteriyel Özellikleri	115
4.10. Antibiyotik Dirençlilikleri.....	119
4.11. Agregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi.....	122
4.11.1. BATH Testi	122

4.11.2. Otoagregasyon Özellikleri.....	124
4.11.3. Koagregasyon Özellikleri.....	125
4.12. Toksikolojik Özellikleri.....	128
4.12.1. Bakterilerde Enterototoksin Üretimi	128
4.12.2. Enterotoksin Genlerinin Varlığı	129
4.12.3. Hemoliz ve Lesitinaz aktiviteleri.....	130
4.13. Probiyotik Makarna Örneklerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	131
4.13.1. Nem ve Kül İçerikleri.....	131
4.13.2. Pişme Süresi Tayini	132
4.13.3. Su Absorpsiyonu Analizi.....	134
4.13.4. Pişme Kaybı Analizi.....	135
4.13.5. Tekstür Analizi	136
4.13.6. Örneklerde Renk Analizi	138
4.13.7. Duyusal Analiz	142
4.14. Probiyotik Makarna Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	145
4.14.1. Pişmiş Örneklerin <i>B. coagulans</i> Sayısı.....	148
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	151
KAYNAKLAR	157
ÖZGEÇMİŞ	201
EKLER.....	202

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	10
Çizelge 2.2. <i>Bacillus coagulans</i> içeren probiyotik gıda takviyeleri	39
Çizelge 2.3. <i>B. coagulans</i> ile laktik asit üretimi	41
Çizelge 3.1. Örneklerin DNA konsantrasyonları.....	90
Çizelge 3.2. DNA çözeltilerinin hazırlanması	90
Çizelge 3.3. Toksin primerleri (Mohkam ve ark, 2020)	91
Çizelge 4.1. İzole edilen <i>B. coagulans</i> suşlarının tanımlamaları	102
Çizelge 4.2. Farklı sıcaklık ve sürelerde <i>B. coagulans</i> sporlarının canlı kalma miktarları (log kob/mL)	103
Çizelge 4.3. Sporların farklı sıcaklıklarda ve sürelerde D değerleri.....	106
Çizelge 4.4. <i>B. coagulans</i> sporlarının k (sa ⁻¹) değerleri.....	107
Çizelge 4.5. <i>B. coagulans</i> suşlarının pH dirençleri (log kob/mL)	109
Çizelge 4.6. <i>B. coagulans</i> suşlarının safra tuzu dirençleri (log kob/mL).....	111
Çizelge 4.7. Bakterilerin lizozim dirençleri.....	113
Çizelge 4.8. Bakterilerin biyofilm üretimleri.....	114
Çizelge 4.9. <i>B. coagulans</i> 'ların antibakteriyel etkinliği (log kob/mL)	116
Çizelge 4.10. Bakterilerin test kültürleri üzerindeki inhibisyon etkileri (%).....	117
Çizelge 4.11. Suşların inhibisyon zonları	119
Çizelge 4.15. Örneklerin kül ve nem içerikleri.....	132
Çizelge 4.16. Örneklerin su absorpsiyon miktarları	134
Çizelge 4.17. Makarna örneklerinde pişme kaybı (%)	135
Çizelge 4.18. Pişmiş makarnaların tekstür analiz sonuçları	137
Çizelge 4.19. Kuru ve pişmiş makarna örneklerinin renk değerleri	139
Çizelge 4.20. Kuru ve pişmiş makarna örneklerinin Hue ve Chroma değerleri ..	141
Çizelge 4.21. Probiyotik makarnaların üretim aşamalarında mikrobiyolojik analiz sonuçları (log kob/g)	145

Çizelge 4.22. Farklı pişme sürelerinde örneklerde bulunan <i>B. coagulans</i> sayıları (log kob/g).....	149
--	-----



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1. Spor yapısı	23
Şekil 3.1. <i>B. coagulans</i> kolonileri	71
Şekil 3.2. Bakteri sporlarının incelenmesi	72
Şekil 3.3. Katalaz testi	72
Şekil 3.4. Örneklerin PCR ile amplifikasyonu.....	75
Şekil 3.5. Elektroforez düzeneği.....	76
Şekil 3.6. Örneklerin jelde yürütülmesi	76
Şekil 3.7. Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme cihazı.....	77
Şekil 3.8. BCET-RPLA sonuçlarının değerlendirilmesi.....	86
Şekil 3.9. Duopath cereus enterotoksin kitinde pozitif (sol) ve negatif (sağ) sonuç	87
Şekil 3.10. Makarna üretimi.....	92
Şekil 3.12. Makarnaların tekstür analizi	96
Şekil 4.1. Gram-pozitif bakteriler	102
Şekil 4.2. <i>B. coagulans</i> sporlarının 80°C’de termal ölüm eğrileri (Bc: <i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086)	104
Şekil 4.3. <i>B. coagulans</i> sporlarının 90°C’de termal ölüm eğrileri (Bc: <i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086)	104
Şekil 4.4. <i>B. coagulans</i> sporlarının 100°C’de termal ölüm eğrileri (Bc: <i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086)	105
Şekil 4.5. Antibiyotik direnç testi	120
Şekil 4.6. % Otoagregasyon özellikleri (Bc: <i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086) ^{a,b,c} Her bakteri için farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak (p<0.05) birbirinden farklıdır.....	124
Şekil 4.7. BCET-RPLA kiti ile yapılan analiz.....	128
Şekil 4.8. Duopath kitleri ile yapılan analiz.....	129
Şekil 4.9. <i>B. coagulans</i> suşlarından izole edilen DNA	130

Şekil 4.10. Yetersiz pişme süresi	133
Şekil 4.11. Pişmiş makarna	133
Şekil 4.12. Örneklerin 0. günde yapılan duyuşal analiz sonuçları	143
Şekil 4.13. Örneklerin 6 ay depolama sonunda duyuşal analiz sonuçları	144



SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
BATH	: Hidrokarbonlara bakteriyel adhezyon
Bc	: <i>Bacillus coagulans</i> GBI-30, 6086
BHI	: Brain heart infusion
BLAST	: Temel yerel hizalama aracı
bp	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
CGY	: Caseinhydrolysate glucose yeast extract
CTAB	: Cetyltrimethylammonium bromide
dk	: Dakika
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EFSA	: Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
g	: Gram
GRAS	: Genellikle güvenli olarak kabul edilir
GYE	: Glucose yeast extract
IAA	: İzomil alkol
kob	: Koloni oluşturan birim
L	: Litre
M	: Mol
mg	: Miligram
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre

mM	: Milimolar
MRS	: de Man Rogosa Sharpe
MRSA	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MYP	: Mannitol egg yolk polymyxine agar
NA	: Nutrient agar
NB	: Nutrient broth
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	: Pikomol
PS	: Pişme süresi
QPS	: Nitelikli güvenlik karinesi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RVA	: Rapid visco analyzer
sa	: Saat
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
SM	: Sporlu mikroorganizma
SNA	: Zenginleştirilmiş nutrient agar
TAMB	: Toplam aerob mezofil bakteri
TBE	: Tris, borik asit ve EDTA
TOM	: Toplam organik madde miktarı
TPA	: Tekstür profil analizi
TSB	: Tryptic soy broth
UV	: Ultraviyole
VRE	: Vankomisine dirençli <i>Enterococcus</i>

1. GİRİŞ

Günümüzde tüketicilerin insan sağlığına olumlu etkileri olan, besin değeri yüksek ve güvenli fonksiyonel gıdalara yönelmesiyle birlikte probiyotiklere olan ilgi artmakta ve bu konuda yapılmakta olan çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir (Prado ve ark, 2008; Kesenkaş ve ark, 2016). Probiyotikler, yeterli miktarda tüketildiklerinde, sağlık üzerinde olumlu etkiler gösteren, canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Salvetti ve ark, 2016). Probiyotikler, sağlığa olan etkilerinin yanı sıra, biyoteknolojik özellikleriyle de ilgi çekmektedirler (Dib ve ark, 2019). Artan tüketici talebi sayesinde, probiyotik gıda pazarı küresel olarak oldukça hızlı bir şekilde büyümektedir. Dünyada toplam fonksiyonel gıda pazarının %60-70'ini, probiyotik gıdalar oluşturmaktadır. Küresel olarak probiyotik gıda pazarı, 2011 yılında 24.8 milyar euro iken, 2015 yılında 31.1 milyar euroya yükselmiştir. 2020 yılında bu değerin 43 milyar euroya ulaşması beklenirken, 2023 yılıyla birlikte 69.3 milyar dolar olması beklenmektedir (Aspri ve ark, 2020; Ilango ve Anthony, 2021).

Fonksiyonel gıdalar, sağlık üzerinde yararlı etkilere sahip olan gıdalar olarak tanımlanmakta olup, geleneksel gıdaların sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin artırılması amacıyla modifiye edilerek üretilen ürünlerdir (Kaur ve Das, 2011). Probiyotik mikroorganizmalar kullanılarak fonksiyonel bir ürünün üretilmiş olduğundan bahsedilebilmesi için, probiyotik özellikleri, yapılan çalışmalarla kanıtlanmış kültürlerin kullanılması, kültürlerin ürünün üretimi ve olgunlaşması boyunca canlılıklarını sürdürebilmesi ve ürünün kompozisyonu, tekstürü ve duyuşsal özelliklerini olumsuz yönde etkilememesi gerekmektedir. Probiyotiklerin fizyolojik etkinliği doza bağlı olduğundan tüketime sunulacak ürünlerde canlı probiyotik mikroorganizma sayısı, özel önem gerektiren bir husustur. Bu bakımdan probiyotik mikroorganizmaların gıdanın depolama ya da olgunlaşma periyodu boyunca canlılıklarını sürdürebilmeleri önemlidir (Heenan ve ark, 2004; Kesenkaş ve ark, 2016).

Probiyotik ürünler, genellikle fermente süt veya yoğurt formunda piyasada yerini almaktadır; fakat çok sayıdaki laktoz intolerans hastaları, yüksek yağ içeriği, kolesterol seviyesinin yüksek olması gibi dezavantajlar, vejetaryenlikteki artış ile birleşince vejetaryen probiyotik ürünlere talep oluşmuştur ve bu talep giderek artmaktadır. Bu sebeple, araştırmacılar süt ürünü içermeyen meyve, sebze ve tahıl bazlı gıdalarda probiyotik bakterilerin kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır (Fadhil ve Akın, 2016; Landry ve ark, 2018; Aspri ve ark, 2020). Süt ürünü olmayan probiyotik gıdalara olan eğilimin diğer sebepleri ise, çeşitli fonksiyonel gıdalar üretebilme fırsatı ve bunların soğuk zincire ihtiyaç duyulmadan transfer edilebilecek olmalarıdır. Taşıma sırasında soğuk zincire ihtiyaç duymayan, mikrobiyolojik açıdan güvenli ve canlı kalabilme yetenekleri yüksek probiyotik ürünlerin üretilmesi önem taşımaktadır. Bu sayede, maliyetin büyük miktarda düşürülebileceği düşünülmektedir (Adibpour ve ark, 2019). Günümüzde marketlerde süt ürünü içermeyen birçok probiyotik gıda bulunmaktadır (Aspri ve ark, 2020).

Bağırsak mikrobiyotasında doğal olarak bulunan probiyotik bakteriler, hastalıklara karşı insan sağlığını koruyucu etkiye sahip mikroorganizmalardır. Probiyotiklerin sağlık üzerinde yararlı etki göstermesinde etkili olan özellikleri arasında, sindirim sistemi mikrobiyotasını etkileyen fermentasyon ürünleri üretebilmeleri de bulunmaktadır. Probiyotikler tarafından üretilen ve konağın sindirim sistemi mikrobiyotasını stabilize ederek olumlu etkileyen antimikrobiyel bileşenler bakteriyosinler, hidrojen peroksit ve laktik ve asetik asit gibi organik asitlerdir (Kalkan, 2016; Shinde ve ark, 2020).

Probiyotik mikroorganizmaların sağlığa yararlı etkileri olması için, yeterli miktarlarda vücuda alınmalı, faaliyet gösterecekleri bölgeye canlı olarak ve belirli bir sayıda ulaşabilmeleri gerekmektedir (Sultana ve ark, 2000). Probiyotiklerin çeşitli etki mekanizmaları bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi konak mikrobiyotasının metabolik aktivitelerini etkilemek olarak belirtilmiştir (Metlakunta ve Soman, 2020). Probiyotik mikroorganizmaların etkileri üzerine

farklı formülasyonlar ve çeşitli hastalıklardan koruma amaçlı birçok çalışma yapılmıştır (Sultana ve ark, 2000; Karri ve ark, 2016).

Genel olarak, ticari olarak kullanılmakta olan probiyotiklerin önemli bir kısmı vejetatif hücre formunda olup ısı, nem, mide asidi ve gıdanın işleme aşamalarında canlı kalma oranları düşük olmaktadır. Fakat spor formundaki probiyotikler ise mide asidi, antibiyotik ve yüksek sıcaklık gibi faktörlere dirençli, depolama süresi boyunca canlılığını yitirmeyen özelliktedir. Ancak bazı probiyotik mikroorganizmaların spor formu yoktur (Aşan Özüsağlam, 2010). Probiyotikler canlılıklarını ve kolonize olma özelliklerini sindirim sisteminde koruyamazlarsa konak sağlığı üzerindeki olumlu etkilerini gösterememektedirler (Horie ve ark, 2018).

Ticari olarak kullanımda olan birçok probiyotik mikroorganizmanın yanı sıra, spor oluşturma özelliği ile *Bacillus* türleri, vejetatif hücrelere kıyasla endosporların sahip olduğu çevresel faktörlere karşı gösterdiği direnç ile dikkat çekmektedir (Salveti ve ark, 2016). *Bacillus* türlerinin, probiyotik olarak gastrointestinal enfeksiyonları engelleme amacıyla gıdalarda ve yemlerde kullanımı bulunmaktadır (Duysburgh ve ark, 2019; Sasaki ve ark, 2020). *Bacillus* cinsi içinde bulunan *B. coagulans*, *B. clausii* ve *B. subtilis* probiyotik olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Metlakunta ve Soman, 2020). Bu bakterilerin dışında, *B. racemilacticus*, *B. laevolacticus* ve *Sporolactobacillus* cinsine ait bazı türlerin de probiyotik amaçlı kullanımları bulunmaktadır. Söz konusu bu bakterilerin; hızlı gelişebilme, organik asit üretme ve diğer spor oluşturan bakterilere göre, ısıya daha dirençli spor formlarına sahip olma gibi özellikleri probiyotik olarak kullanımlarında avantaj sağlamaktadır (Hyronimus ve ark, 2000). *Bacillus* türleri topraktan yaygın olarak izole edilebilmekte olup, buna ek olarak su, hava ve bazı gıdalarda da bulunmaktadır. Spor oluşturma özellikleri *Bacillus* cinsinin çevresel strese sahip ortamlarda ve zor koşullarda canlı kalabilmeleri için çok önemlidir (Metlakunta ve Soman, 2020). Ayrıca, *Bacillus* sporlarının depolanabilmesi için buzdolabı koşullarına ihtiyaç duyulmamaktadır (Sasaki ve ark, 2020). *Bacillus*

türlerinin ısıya dirençli sporlarının sindirim sisteminde, zorlu gıda üretim koşullarında ve depolama sıcaklıklarında canlılıklarını korumaları gibi özellikleri araştırmacıların ilgisini çekmektedir. *Bacillus* türlerinin immün sistemi uyarmaları ve antimikrobiyel peptit üretmeleri ile iltihabı hafifletmeleri gibi özellikleriyle sağlığa yararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir (Shinde ve ark, 2020). Yapılan çalışmalarda çeşitli *Bacillus* türlerinin insan ve hayvan sindirim sisteminden izole edilebilmeleri, komensal mikrobiyotada nadir de olsa bulunabildiklerini göstermektedir (Honda ve ark, 2011).

Canlılıkları ve stabiliteleri üzerine etki eden faktörler nedeniyle ısıtma işlemi uygulanan ürünler genellikle probiyotik amaçlı kullanılmamaktadır. Bunun nedeni ise halen ticari olarak kullanılan çoğu probiyotik mikroorganizmaların ısıya duyarlı olmalarıdır. Fakat spor oluşturan bir tür kullanılarak bu kısıtlamanın üstesinden gelinebileceği belirtilmiştir. *B. coagulans* ısıya dirençlidir ve probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların özelliklerini taşımaktadır (Karri ve ark, 2016). Popüler bir probiyotik olan *B. coagulans*'ın laktik asit bakterileriyle aynı özelliklere sahip olup zor koşullara daha iyi adapte olabilmesi sayesinde hayvancılık alanında kullanılan *Lactobacillus*'ların yerini alabileceği ileri sürülmektedir (Xing ve ark, 2020). Ticari olarak GanedenBC30TM markasıyla bilinmekte olan *B. coagulans* GBI-30, 6086, spor oluşturma özelliği olan ve laktik asit üreten bir bakteridir. Sindirim sistemi gibi zorlu çevresel faktörlere karşı dirençli ve ürünün raf ömrü süresince stabil yapıda kalabilmektedir (Hyronimus ve ark, 2000; Maathuis ve ark, 2010).

Türk Gıda Kodeksi Makarna Tebliğine göre makarna; “*Triticum durum* buğdayından üretilen irmiğe su katılıp tekniğine uygun yoğrularak hazırlanan hamurun şekillendirilip kurutulmasıyla elde edilen bir ürün olup; sade, tam buğday, çeşnili, zenginleştirilmiş, güçlendirilmiş makarna ile vitamin ve mineral ilaveli makarna” olarak tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi, 2005).

Makarna, çoğu kültürde temel gıda maddesi olmakla birlikte, üretiminin ve hazırlanmasının kolay olması, besinsel değeri, düşük maliyetli olması ve uzun süre

depolanabilmesi gibi avantajlarıyla dünya çapında yaygın olarak tüketilen temel bir gıda maddesidir (Fuad ve Prabhasankar, 2010; Kadam ve Prabhasankar, 2010; Bustos ve ark, 2015; Palavecino ve ark, 2017). 2012 ve 2014 yılları arasında Avrupa Birliği'nde üretilen makarna miktarı 4544 kton/yıl'dan 4572 kton/yıl'a çıkmış olup, makarna tüketim miktarı ise 3315 kton/yıl'dan 3637 kton/yıl'a çıkmıştır (Recchia ve ark, 2019). Dünya çapında ise 2014 yılında makarna üretiminin yıllık olarak 14.3 milyon ton olduğu ve üretimin en çok İtalya, ABD, Brezilya, Türkiye ve Rusya'da olduğu belirtilmiştir (Russo ve ark, 2021). 2017 yılında Avrupa'da makarna üretim miktarı 5.4 milyon tona, tüketimi ise 3.4 milyon tona çıkmıştır. 2019 – 2023 yılları arasında bu miktarın yıllık olarak %4.4 artması beklenmektedir (Saget ve ark, 2020). Türkiye'de ise makarna tüketiminin hane başına 5.65 paket/ay olduğu belirtilmiştir (Uzundumlu ve ark, 2018). Yapılan çalışmalarla makarnanın besinsel olarak zenginleştirilmesi, daha iyi pişme kalitesi, renk ve tekstüre sahip olması üzerine odaklanılmıştır. Bu amaçla kullanılabilecek maddelerin hamurun işlenebilirliğini geliştirmesinin yanı sıra son ürünün kalitesini de iyileştirmesi gerekmektedir (Fuad ve Prabhasankar, 2010).

Bu çalışmada, çeşitli kaynaklardan *B. coagulans* izole edilerek, bu izolatların tanımlanması, probiyotik ve toksikolojik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca uygun özelliklere sahip olduğu belirlenen izolatlar ile *B. coagulans* GBI-30, 6086'nın özelliklerinin kıyaslanarak değerlendirilmesi hedeflenmiş olup, bu izolatlar ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 kullanılarak, probiyotik makarna üretiminin gerçekleştirilmesi ile üretilen makarnaların üretim günü ve 6 ay kilitli poşette depolanmalarının ardından kalite özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Probiyotikler

Probiyotik terimi, günümüzde kullanıldığı anlamıyla ilk kez Parker tarafından 1974 yılında, hayvan yemlerinde yer alan ve konağın sindirim sistemi mikrobiyotasının dengesine katkıda bulunan organizmalar ve maddeler olarak tanımlanmıştır. Bu tanımda maddeler kelimesinin kullanılması, antibiyotikleri de içeren geniş bir çağrışım ile sonuçlanmıştır. Bu tanıma iyileştirmek amacıyla, 1989 yılında Fuller tarafından “Konağın sindirim sistemi mikrobiyotasını geliştirerek olumlu etkileyen canlı mikrobiyel yem takviyesi” şeklinde yeni bir tanım yapılmıştır. Bu tanım, probiyotiklerin canlı olması gerektiğini vurgulamakta ve hayvan olarak belirtilen konak üzerinde olumlu etki göstermesi gerektiğini belirtmektedir. 1992 yılında Havenaar tarafından bu tanım genişletilerek; insanlara ya da hayvanlara uygulanabilen ve konak mikrobiyotasını geliştirerek olumlu etkiler sağlayan bir ya da birden fazla mikroorganizma kültürü olarak tanımlanmıştır. Daha geniş bir anlam ile Havenaar ve Huis In’t Veld probiyotikleri konak mikrobiyotasını değiştiren (implantasyon veya kolonizasyon ile) ve böylece konak sağlığı üzerinde olumlu etkiler sağlayan canlı mikroorganizmaların yeterli sayıda bulunduğu ürün olarak tanımlamıştır (Schrezenmeir ve de Vrese, 2001).

Günümüzde probiyotikler, düzenli ve yeterli miktarda tüketildiklerinde, sindirim sistemindeki mikrobiyel dengeyi oluşturarak ve geliştirerek tüketici sağlığına olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (Gonzalez-Aguilar ve ark, 2010; Fadhil ve Akın, 2016; Karri ve ark, 2016). Probiyotik gıdalardan beklenen yararların sağlanabilmesi için, içerdikleri canlı mikroorganizma sayısının en az 10^6 - 10^7 kob/g olması gerektiği çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir (WHO/FAO, 2002; Atraki ve Azizkhani 2021; Pimentel ve ark, 2022). Gıda endüstrisinde bu değer 10^6 kob/g olarak kabul edilmektedir. Bu sayede, günlük olarak 100 g probiyotik gıda tüketimi sayesinde 10^8 - 10^9 canlı hücre alımının gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir (Sidira ve ark, 2014).

Probiyotikleri insan sağlığı için kullanma fikri neredeyse 100 yıldır düşünülmekte olup, son zamanlarda ilgi büyük miktarda, probiyotiklerin sindirim sistemi ve bağışıklık sistemine olan etkileri ile hassas bağırsak sendromu, kanser, egzama, alerjiler, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu gibi bazı hastalıkların önlenmesi ya da tedavi edilebilmesine kaymıştır (Endres ve ark, 2009; Kahraman ve Karahan, 2018; Kahraman ve ark, 2022; Yalçinkaya ve ark, 2022). İnsan sağlığı üzerine olumlu yönde etki gösteren gıda maddelerinin kompleks yapısında probiyotiklerin önemli bir rolü olduğu belirtilmektedir (Fadhil ve Akın, 2016).

Günümüzde tüketicilerin gıda kaynaklı hastalıkları engelleyebilecek gıdalara geçmiş yıllara kıyasla daha ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu günlerde en büyük sağlık endişesi obezite ve fazla kilo olup; kan basıncı ve kolesterolün pandemik boyutlara ulaşması sebebiyle kalp sağlığını yüksek miktarda etkilemektedir (Bustos ve ark, 2015). Son yıllarda tüketicilerin gıda endüstrisinden talepleri oldukça değişmiştir. Günümüzde gıdalar sadece açlığı gidermek ve gerekli besin maddelerini karşılamak amacıyla değil, bunlara ek olarak beslenmeyle ilişkilendirilen hastalıkları önlemek ve fiziksel ve ruhsal yarar sağlamak amacıyla tüketilmektedir (Foschia ve ark, 2013).

Tüketiciler fonksiyonel gıda ürünlerini seçerek tat, elverişlilik veya kaliteli hayat tercihlerinden taviz vermemekte, sağlık üzerinde olumlu etkileri olan gıdaları tercih etmekte ve buna ek olarak bu gıdaların geleneksel gıdalarda alışılmış olan kalitede olmalarını istemektedirler (Bustos ve ark, 2015). Ayrıca, günümüz modern dünyasında, hayvansal kaynaklı ürünlerden uzak durmayı tercih eden tüketici sayısı giderek artmakta olup, sürdürülebilirlik, diyet tercihleri, sosyal veya politik görüşleri ve sağlık üzerine olumu etkilerinden dolayı vegan ürünleri tercih etmektedirler (Pimentel ve ark, 2021).

Fonksiyonel gıdaların üretiminde sık sık kullanılmakta olan pastörizasyon, sterilizasyon, haşlama, pişirme, kızartma, mikrodalga uygulaması gibi zorlu koşullar gıdalarda bulunan biyoaktif bileşenleri ve probiyotikleri etkilemekte olup

sporlu probiyotik mikroorganizmaların kullanımıyla bu sorunun üstesinden gelinebileceği belirtilmiştir (Majeed ve ark, 2020).

İnsan vücudu, hem aerob hem de anaerob olan çeşitli komensal mikrobiyota gruplarını içermektedir. Bu mikroorganizma grupları içinde en büyüğü yetişkinlerde 400 bakteri türünden fazla kolonizasyonu içeren sindirim sisteminde bulunmaktadır (Gaudana ve ark, 2010). İnsan varlığı önemli bir şekilde mikrobiyotaya bağlı olmakla birlikte, sağlığın merkezini oluşturan mikrobiyel kolonizasyon, konak için hayatsal öneme sahip birçok fayda sağlamaktadır. İnsan mikrobiyotasının sabit olmadığı ve diyet, antibiyotik ve stres gibi çevresel faktörlerle değiştiği belirtilmektedir (Berer ve Krishnamoorthy, 2012; Carding ve ark, 2015). Komensal bakteriler sindirim sistemindeki epitel hücrelerin gelişimini ve fonksiyonlarını desteklemekte olup, bu etkileşimler arasında en ufak bir engel olması durumunda hastalık durumuyla karşılaşılabilir (Gaudana ve ark, 2010).

Probiyotiklerin türü, suşu ve gıda üretiminde kullanılan formülasyon, tüketici üzerindeki etkisini belirleyici rol oynamaktadır (Ringel ve ark, 2012). Sindirim sisteminde mikrobiyel dengenin sağlanması probiyotiklerin insan sağlığı üzerinde sağladığı yararlarından biridir (Boricha ve ark, 2019). Çeşitli çalışmalar sonucunda, bağırsak mikrobiyotasının insan fizyolojisi, metabolizması, beslenmesi ve immün fonksiyonları üzerinde etki gösterdiği tespit edilmiştir. Vagus siniri, immün sistemi, kısa zincirli yağ asitleri ve triptofanı da içeren birden fazla yolla beyin ve bağırsak arasında iletişimin sağlandığı düşünülmektedir (Majeed ve ark, 2018). Yapılan yeni çalışmalarla beyin ve bağırsak arasındaki iletişime bağırsak duvarının bütünlüğü, bağırsak mikrobiyotasının bileşimi/çeşitliliği ve ayrıca bağırsak mikrobiyotası tarafından nörotransmitterlerin, hormonların ve nöropeptitlerin üretimi gibi faktörlerin de etkili olduğu belirtilmektedir (De Palma ve ark, 2014; Steenbergen ve ark, 2015; Moschopoulos ve ark, 2018).

Çizelge 2.1’de probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar verilmiştir. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*

ve *Bacillus* gibi birçok bakteri cinsinde potansiyel probiyotik özelliğe sahip türler bulunmaktadır (Saroj ve Gupta, 2020).

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Cins	Tür	Kaynak
<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. cereus</i>	Yang ve ark, 2020
	<i>B. coagulans</i>	Cao ve ark, 2020
	<i>B. clausii</i>	Paparo ve ark, 2020
	<i>B. licheniformis</i>	Amoah ve ark, 2021
	<i>B. pumilus</i>	Liu ve ark, 2020
	<i>B. subtilis</i>	Paytuví-Gallart ve ark, 2020
	<i>B. tequilensis</i>	Rani ve ark, 2017
	<i>B. polyfermenticus</i>	Heo ve ark, 2021
	<i>B. velezensis</i> (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	Sun ve ark, 2021
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>B. adolescentis</i>	Slizewska ve ark, 2021
	<i>B. breve</i>	Rohith ve Halami, 2021
	<i>B. bifidum</i>	Din ve ark, 2020
	<i>B. infantis</i>	Sheng ve ark, 2020
	<i>B. lactis</i>	Slizewska ve ark, 2021
	<i>B. longum</i>	Partrick ve ark, 2021
<i>Clostridium</i> spp.	<i>C. butyricum</i>	Slizewska ve ark, 2021
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. faecium</i>	Agüero ve ark, 2020
	<i>E. faecalis</i>	Tao ve ark, 2020
	<i>E. hirae</i>	Goubet ve ark, 2021
<i>Lacticaseibacillus</i> spp.	<i>L. casei</i>	Agüero ve ark, 2020
	<i>L. rhamnosus</i>	Agüero ve ark, 2020
<i>Lactiplantibacillus</i> spp.	<i>L. plantarum</i>	Mohtashami ve ark, 2020
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>L. acidophilus</i>	Jayani ve ark, 2020
	<i>L. bulgaricus</i>	Theegala ve ark, 2021
	<i>L. cellobiosus</i>	Kaur ve ark, 2021
	<i>L. delbrueckii</i>	Slizewska ve ark, 2021
	<i>L. johnsonii</i>	Xin ve ark, 2020
	<i>L. gasseri</i>	Xu ve ark, 2020
	<i>L. helveticus</i>	Agüero ve ark, 2020
	<i>L. lactis</i>	Slizewska ve ark, 2021
	<i>L. paracasei</i>	Agüero ve ark, 2020
	<i>L. pentosus</i>	Slizewska ve ark, 2021
<i>Lactococcus</i> spp.	<i>L. lactis</i>	Ayyash ve ark, 2020

Çizelge 2.1. devamı

<i>Latilactibacillus</i> spp.	<i>L. curvatus</i>	Choi ve ark, 2021
<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>L. mesenteroides</i>	Matsuzaki ve ark, 2021
<i>Levilactobacillus</i> spp.	<i>L. brevis</i>	Hojjati ve ark, 2020
<i>Ligilactobacillus</i> spp.	<i>L. salivarius</i>	Slizewska ve ark, 2021
<i>Limosilactobacillus</i> spp.	<i>L. fermentum</i>	Slizewska ve ark, 2021
	<i>L. reuteri</i>	Agüero ve ark, 2020
<i>Paenibacillus</i> spp.	<i>P. polymyxa</i>	Amoah ve ark, 2021
	<i>P. acidilactici</i>	Mikulski ve ark, 2020
<i>Pediococcus</i> spp.	<i>P. cerevisiae</i>	Kaur ve ark, 2021
	<i>P. pentosaceus</i>	Slizewska ve ark, 2021
<i>Propionibacterium</i> spp.	<i>P. acidopropionici</i>	Slizewska ve ark, 2021
	<i>P. freudenreichii</i>	Gaucher ve ark, 2020
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. dentisani</i>	Ferrer ve ark, 2020
	<i>S. diacetylactis</i>	Kanwar ve Thakur, 2020
	<i>S. salivarius</i>	Vesty ve ark, 2020
	<i>S. thermophilus</i>	Theegala ve ark, 2021
Fungi	<i>Aspergillus niger</i>	Lin ve ark, 2020
	<i>A. oryzae</i>	Konishi ve ark, 2021
	<i>Kluveromyces marxianus</i>	Tseng ve ark, 2020
	<i>Sachharomyces boulardii</i>	Hernández-Gómez ve ark, 2021
	<i>S. cerevisiae</i>	Ogbuewu ve ark, 2020
	<i>Zygosaccharomyces sapae</i>	Okada ve ark, 2021

İnsan sindirim sistemi mikrobiyotasından izole edilmiş olan probiyotikler, sağlık üzerinde gösterdikleri birçok olumlu etki sayesinde fermente süt ürünlerinin yanı sıra, bebek maması gibi çeşitli ürünlerde kullanılmaktadır (Kalkan, 2016). Özellikle, fermente süt ürünlerinde en yaygın kullanılmakta olan probiyotikler; *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* olsa da *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* Nissle 1917 ve *S. boulardii*, *S. cerevisiae* gibi probiyotik mikroorganizmaların da kullanımı bulunmaktadır (Cencic ve Chingwaru, 2010; Ringel ve ark, 2012). Fakat bu probiyotiklerin bazıları, midenin düşük pH ve safra tuzlarından oluşan normal fizyolojik ortam şartlarına oldukça duyarlılardır. Ayrıca, fonksiyonel gıdaların (pişmiş gıdalar, içecekler ve meyve konserveleri gibi) üretim

proseslerinden, depolama ve taşınmasından oldukça etkilenmekte ve canlılıklarını koruyamamaktadırlar (Endres ve ark, 2009; Majeed ve ark, 2016a; Ünal Turhan, 2021). Bu olumsuz özellikleri gidermek amacıyla, probiyotik bakterileri mikroenkapsüle ederek, gıdanın üretimi süresince ve sindirim sisteminde zorlu ortam koşullarından korumak, canlı kalan hücre sayısını arttırmak üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Fakat bu işlemler, maliyeti arttırdığı için üretim sırasında zorlu koşullara dirençli, taşıma ve depolama aşamaları sırasında gerekli sayıda canlı mikroorganizma sayısını koruyabilen probiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır (Musikasang ve ark, 2009; Todorov ve ark, 2012; Majeed ve ark, 2016a; Erginkaya ve ark, 2019; Ünal Turhan, 2019).

Sağlığa olumlu etkileri olan probiyotik gıda ürünlerine olan talepleriyle vegan tüketiciler, gıda endüstrisi için büyük önem taşımaktadır. Vegan probiyotik ürünlerin lipid profili, diyabet ve immün sistem üzerinde iyileştirici etkileri olabilmekte, *H. pylori* kaynaklı hastalıkları azaltıcı etki, antikarsinojenik etki gösterebilmekte ve tüketicinin genel sağlık durumunu iyileştirebilmektedir. Vegan probiyotik ürünler arasında, fermente ve fermente olmayan içecekler gelmektedir. Probiyotikler, vegan ürünlerin kimyasal kompozisyonunu, asitliğini, rengini, kabul edilme oranını etkileyebilmekte olduğundan bu ürünlerin üretiminde kullanılan probiyotiklerin uygun canlı kalma özelliğine sahip, fizikokimyasal karakteristiklere, teknolojik özelliklere ve duyuşal özelliklere sahip olması gerekmektedir. Günümüzde izole edilmiş probiyotiklerin çoğunun sebzelerden izole edilmemiş olması sebebiyle, bu probiyotiklerin üretimde kullanılmasıyla üretilecek ürünün vegan statüsü tehlikeye girebilmektedir. Bu nedenle pazarlama stratejilerinin sadece vegan ürünlere değil, hayvansal kaynaklı ürünlerin tüketimini azaltmak isteyen tüketicilerin isteklerine de odaklanması ve hayvansal kaynaklı olmayan suşların izolasyonuna gereken önemi vermesinin büyük önem taşıdığı bildirilmiştir (Pimentel ve ark, 2021).

Fırıncılık ürünleri, fonksiyonel ürün üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kadam ve Prabhasankar, 2010). Buğdaydan elde edilen unun

doğal prebiyotik bileşenlere sahip olması sayesinde probiyotik mikroorganizmaların sindirim sisteminde canlılığını korumasına yardım etmekte ve kolonizasyonu arttırmaktadır. Ayrıca tahılların, probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonunda kullanılarak canlılıklarını ve fonksiyonlarını devam ettirmelerini sağladığı belirtilmiştir (Martins ve ark, 2013). Bunlara ek olarak, fonksiyonel bileşenlerin eklenmesiyle son ürünün maliyeti artmakta ve bu da ekmek gibi kısa raf ömürlü gıda ürünlerinde sorunlara yol açmaktadır. Bisküviler, kurabiyeler ve kekler oldukça popüler ürünlerdir, çünkü elverişli ve uzun raf ömrüne sahiplerdir. Fakat karbonhidrat içeriği bakımından zengin olması ve yüksek glisemik indeksi sebebiyle fonksiyonel bileşenlerin ilave edilmesiyle ürün kalitesindeki gelişmeye rağmen son ürünün besinsel kalitesi üzerinde şüphe uyandırmaktadır (Foschia ve ark, 2013). Buna rağmen makarna, besin değeri, düşük glisemik indeksi, uzun raf ömrü ve tüm sosyal gruplar tarafından tüketilen bir ürün olması gibi özellikleri sayesinde fonksiyonel ürün üretiminde ideal bir matriks olarak görülmektedir (Marti ve Pagani, 2013).

Fonksiyonel gıdalar gıda endüstrisinin gelişmekte olan ve en ümit vadeden bölümünü oluşturmakta olup makarna da bu sektörün dışında kalmamaktadır. Dünya çapında yürütülmekte olan araştırmalarla iyi pişme, renk ve tekstür özelliklerine sahip besin değeri geliştirilmiş makarnalar üzerinde durulmaktadır. Halen hamur kalitesini ve son ürünün kalitesini geliştirecek bileşenlerin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Yine de her fonksiyonel bileşenin kolay bir şekilde mikro yapısına uyum sağlayamayacağı belirtilmelidir (Bustos ve ark, 2015).

2.2. Probiyotik Mikroorganizmaların Taşınması Gereken Özellikler

Mikroorganizmaların probiyotik olarak tanımlanabilmeleri için, taşınmaları gereken bazı özellikler vardır. Bunlardan başlıcaları; pankreatik enzim, asit ve safra tuzlarına direnç göstermesi, intestinal ekosistemde canlılığını devam ettirebilmesi, intestinal mukozaya adhezyon, insan kaynaklı olması, güvenlik, kullanım ve

depolama sırasında özelliklerini koruyabilme, teknolojik olarak iyi özelliklere sahip olma bunların başlıcalarıdır. Probiyotik olarak seçilen mikroorganizmaların taşınması gereken en önemli özellikler şunlardır;

- Patojen ve toksijenik olmama,
- İnsan kaynaklı olma,
- Taksonomik sınıflandırmasının kesin olması,
- Konakçının sağlığına olumlu katkı yapma,
- Mide asidi, safra tuzu ve pankreatik enzimlere dirençli olma,
- Bağırsak hücre epiteline tutunabilme,
- Sindirim sisteminde geçici olarak kolonize olabilme,
- Antimikrobiyel madde üretimi,
- Patojen bakterilere karşı antagonistik aktivite gösterebilme,
- Kanser oluşumunu teşvik eden bakterilere karşı antagonizma,
- Canlılarda büyümeyi teşvik etme ve geliştirme,
- Teknolojik proseslere direnç gösterme,
- İmmun sistemi stimüle etme, immün cevabı düzenleme,
- Önemli metabolik aktivitelere sahip olma (vitamin sentezleme, disakkaridaz ve laktaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu gibi),
- Sağlık üzerinde olumlu etki yaptığı düşünülen ürünlerin üretilmesinde değişim meydana gelmemesi,
- Toksik metabolitler üretmemeleri, genetik açıdan stabil olmaları,
- İşlem esnasında ve depolama süresince canlılığını koruması ve aktif olduğu bölgede çoğalabilmesi (Taranto ve ark, 2006; Toprak Kavas, 2007; Musikasang ve ark, 2009; Konuray ve Erginkaya, 2017).

Bunlara ek olarak, probiyotik bakterilerin lizozime ve hayvan beslenmesinde ve tedavisinde kullanılan antibiyotiklere dayanıklı olması gerektiği belirtilmiştir. Midedeki yüksek asitlik ve bağırsaktaki safra tuzu bileşenlerinin

yüksek konsantrasyonu, suş seçimini etkileyen konak faktörleridir (Hyronimus ve ark, 2000). Ayrıca sağlık üzerindeki potansiyel olumlu etkilerini de göz önüne alarak probiyotiklerin seçiminde iki önemli faktörün değerlendirildiği belirtilmiştir. Bunlar: Tüketim sırasındaki canlılığı ile konsantrasyonu ve sindirim sisteminde canlı kalma oranıdır (Vera-Pingitore ve ark, 2016). Bunlara ek olarak, probiyotik mikroorganizmanın hammaddede gelişimi, stabilitesi ve canlılığı ve bulunduğu ortamdaki duyuşal özellikleri de göz önünde bulundurulan karakteristiklerdendir (Ilango ve Anthony, 2021).

Çoğu probiyotik mikroorganizmanın aktivite alanı kalın bağırsaktır. Etkili olabilmesi için probiyotik mikroorganizmanın bu bölgeye yeterli bir sayıda ve canlı olarak ulaşması gerekmektedir. Sindirim sistemi boyunca probiyotik mikroorganizma sayısında kayıplar olmaktadır. Bu kayıplar üzerinde en çok rol oynayan faktörlerin midenin asidik ortamı ve oniki parmak bağırsağında bulunan safra tuzunun olduğu bilinmektedir. *In vivo* çalışmaların çok kompleks olmaları nedeniyle, yeni izole edilen mikroorganizmalardan potansiyel probiyotik seçiminde ve gıda matrislerinde kullanımında davranışlarının belirlenmesinde tercih edilen ilk analizler *in vitro* analizlerdir (Mainville ve ark, 2005).

İnsan sindirim sisteminde her gün yaklaşık olarak 2.5 L sindirim sıvısı ve 1 L safra salgılanmaktadır. Dolayısıyla, probiyotik suşların düşük mide pH'sında, sindirim enzimlerinin ve safra tuzlarının olduğu ince bağırsakta canlılığını koruması gerekmektedir (Boricha ve ark, 2019). İnce bağırsakta safraya maruz kalan probiyotik bakterilerin hücre geçirgenlikleri artmakta, böylece hücrede üretilen laktaz ile yutulan laktoz arasındaki temas artmakta ve sindirim kolaylaşmaktadır (Sekhavatizadeh ve ark, 2019). Ayrıca, *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* ve *B. coagulans* laktik asit üretmeleri sayesinde ortam pH'sının düşmesini sağlamakta ve birçok bakteri ve maya türünün gelişemeyeceği ortam oluşturmaktadır (Urgesi ve ark, 2014).

Probiyotik suşların yüzey özellikleri probiyotiklerin sindirim sisteminde canlı kalma oranını, konak dokularına adhezyonunu, kendi türüyle ve diğer

bakterilerle olan ilişkisini etkilemektedir. Bu faktörlerin de probiyotikler ile konak sindirim sistemi ve sindirim sistemi mikrobiyotası arasındaki ilişki üzerinde etkileri bulunmaktadır. Hücre adhezyonu bakteri hücre zarı ve etkileşimde olduğu yüzey arasındaki karmaşık bir prosestir. Probiyotiklerin adhezyonu genellikle hidrofobisite ve hücre dışı bileşenler ve protein yapı gibi hücre yüzey özellikleri ile ilişkilendirilmektedir. Yüksek hidrofobikliğe sahip olan hücreler genellikle mukozal hücrelerle kuvvetli etkileşimlerde bulunmaktadır. İlk etkileşim zayıf olabilmekte ve sıklıkla ters çevrilebilmektedir. Bir sonraki aşama ise hücre yüzey proteinleri ve lipoteikoik asitleri içeren daha spesifik mekanizmalarla gerçekleştirilmektedir. Probiyotik bakterilerin yararlı etkilerini gösterebilmesi için adhezyon özelliğinin yanı sıra yeterli miktarda agregasyon özelliğine sahip olması gerekmektedir. Probiyotiklerin agregasyonu ile biyofilm bariyeri oluşturulmakta ve biyofilmler yüksek konsantrasyonda bakteri içermektedir. Bu tabaka konağa koruyucu bir tabaka sağlayarak patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonunu önlemektedir (Ünal Turhan ve Erginkaya, 2019; Mohanty ve ark, 2019).

Probiyotikler, tüketime izin verilmeden önce yapılan birçok *in vitro* ve *in vivo* analizler ile detaylı olarak incelenmektedir (Nithya ve Halami, 2013; Konuray Altun ve Erginkaya, 2021). Potansiyel probiyotik mikroorganizmaların güvenilirliklerinin değerlendirilmesinde birçok analiz yapılmakta ve immünolojik etkileri, kullanım şekilleri, tüketim dozu ve süresi, hedef tüketici popülasyonu belirlenmektedir. Mikrobiyel olarak ise virülans faktörü, transfer edilebilen antibiyotik direnç geni gibi EFSA tarafından belirtilen diğer özellikleri de değerlendirilmektedir (Salveti ve ark, 2016).

Patojenlerin inhibisyonunda, probiyotik mikroorganizmaların çeşitli etki mekanizmalarına sahip olduğu bilinmektedir. Bu amaçla; laktik asit üretimi ile ortam pH'sının düşürülmesi, antimikrobiyel özelliğe sahip madde üretimi, bağırsak geçirgenliğini azaltma, besin kaynağı için rekabet etme, serum ve bağırsak lümenindeki sekretuvar immünoglobulin A (IgA) üretimini arttırmak, immün sistemi uyarmak gibi çeşitli katkılar sağlamaktadır (Erginkaya ve ark, 2011;

Kalkan, 2016; Erginkaya ve Konuray, 2017; Yapıcıoğlu Yıldızdaş, 2016). Antimikrobiyel etkilerinin yanı sıra bağışıklık sistemini güçlendirdikleri, dış çürümesini önledikleri, antikarsinojenik özellik gösterdikleri, koroner kalp hastalıklarına karşı etkili oldukları ve serum lipit seviyesini düşürdükleri de tespit edilmiştir (Aşan Özusağlam, 2010; Heydari ve ark, 2018; Fan ve ark, 2020). Probiyotiklerin bağırsak geçirgenliğini normale dönüştürmesi ve bağırsak mikrobiyotasını değiştirmesi gibi özellikleri, bağırsaklarda savunma bariyerini uyarıcı etkiye sahip olması ile ilişkilendirilmekte olup, bu etkinin de sindirim sistemi IgA yanıtını arttırması ve intestinal inflamatuvar yanıtı hafifletmesi ile ilgili olabileceği belirtilmektedir (Bozkurt ve Aslım, 2004).

2.3. Probiyotik Gıdalar ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Oliveira ve arkadaşları (2012) yaptıkları bir çalışmada, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* (*Lactobacillus casei*-01), *B. lactis* (BB12), *L. acidophilus*, *Lacticaseibacillus paracasei* (*L. paracasei*) ve *B. lactis* kullanılarak Brezilya'ya özgü, keçi sütünden üretilen yarı sert bir peynir olan coalho peyniri üretilmiştir. Kullanılan probiyotik bakteriler tekli ve karışık kültür olarak peynirlere ilave edilmiştir. Peynirlerin fizyokimyasal ve teknolojik analizleri yapılmıştır. Duyusal analizde elde edilen sonuçlarda, probiyotiksiz üretilen peynirlere göre, tek kültür ve karışık kültür ilave edilen peynirlerin çok daha kabul edilebilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Klu ve Chen (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotik fıstık ezmesi üretimi yapılmış ve probiyotiklerin sindirim sisteminde canlı kalma durumu gözlenmiştir. Probiyotik olarak *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus thermophilus* kullanılarak çeşitli karışımlar yapılmış ve mikroorganizma konsantrasyonu 10^7 kob/g olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışma sonunda elde edilen verilere göre fıstık ezmesinin sindirim sistemi koşullarında probiyotik bakterileri koruyucu bir etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Majeed ve arkadaşları (2016a) tarafından yapılan bir çalışmada, çeşitli fonksiyonel gıdaların üretiminde *B. coagulans* MTCC 5856 kullanılarak üretim ve depolama aşamalarında *B. coagulans* MTCC 5856'nın stabilitesi tespit edilmiştir. 12 ay depolama süresince muffinlerinde %92, wafflelarda %86 oranında canlı kalabildikleri tespit edilmiştir. 90°C'de 2 dk demlenen kahvedeki canlılığı %87 iken, 77°C'de 4 sa sonunda %66'ya düşmüştür. Çikolatalı krema, fıstık ezmesi, çilek konservesi ve bitkisel yağ gibi ürünlerin oda sıcaklığında 12 ay depolanmaları sonunda canlılığın %95 oranında olduğu tespit edilmiştir. Elma suyunda buzdolabı koşullarında 6 aya kadar, konsantre glikoz şurubunda 24 aya kadar stabil olduğu tespit edilmiştir.

Vera-Pingitore ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, bitkisel fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılan mikroorganizmaların probiyotik olarak kullanılabilme potansiyelleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla kinoa ve amaranttan izole edilen laktik asit bakterileri *in vitro* olarak antibiyotiklere direnç, sindirim sistemi koşullarına tolerans ve bağırsak epitellerine adhezyon özellikleri açısından incelenmiştir. İzole edilen bakterilerin hepsinin lizozim ve safra tuzuna dirençli olduğu ve adhezyon özelliklerinin benzer olduğu belirtilmiş olup, bunlardan sadece beşinin antibiyotik profillerinin probiyotik amaçlı kullanım için uygun olduğu tespit edilmiştir. Düşük pH'ya tolerans açısından en iyi *in vitro* özelliklere sahip olduğu tespit edilen *L. plantarum* Q823 fermente kinoa içeceğinde starter kültür olarak kullanılmış ve *in vivo* olarak insanlarda analiz edilmiştir. Yapılan çalışmada bu bakterinin ürün kullanımının sona ermesinden sonra yedi güne kadar sindirim sisteminde canlılığını koruduğu ifade edilmekte olup, *L. plantarum* Q823'ün kinoa bazlı fermente ürün üretiminde uygun bir starter ve probiyotik olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Saglam ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotik içecek üretimi amacıyla *L. plantarum* AA1-2 ve *S. boulardii* ayrı ayrı ve birlikte olacak şekilde peyniraltı suyuna ilave edilmiş ve fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre %2 *L. plantarum* AA1-2 ilavesi ile üretilen

içeceğin iyi kalitede ve kabul edilebilir olduğu, %2 *L. plantarum* AA1-2 ve %2 *S. boulardii* karışımının da içeceklerde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Ünal Turhan ve arkadaşları (2017a) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. rhamnosus*'un mikroenkapsüle ve serbest halde bulunan hücrelerinin ilavesi ile sucuk üretimi gerçekleştirilmiştir. Mikroenkapsülasyon işlemi ile *L. rhamnosus*'un olumsuz ortam koşullarında canlı kalma miktarının arttığı belirtilmiştir. Çalışmada *L. rhamnosus* ilavesi ile üretilen sucuk örneklerinin tekstürel, fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri açısından geleneksel sucuklar ile benzer olduğu tespit edilmiştir.

Adibpour ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, yeni şekerli bir fonksiyonel gıda üretmek amacıyla probiyotik özelliğe sahip bakteriler (*L. plantarum* UBLP-40, *L. plantarum* A₇, *B. coagulans* Unique IS-2 ve *B. subtilis* UBBS-14) kullanılarak nabat (İran'a özgü bir şeker) üretilmesi amaçlanmıştır. Üretimin ardından 6 ay depolanan örneklerde probiyotik spor sayısının %90 civarında olduğu tespit edilmiştir.

Kobus-Cisowska ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotik bitter çikolata üretmek amacıyla *B. coagulans* kullanılmıştır. Üretilen probiyotik çikolataların polifenol içeriklerinin kontrol örneğine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin duyuşal analiz sonuçlarının benzer olduğu belirtilmiştir. Örneklerin depolama aşamasında ve ardından sindirim sistemi boyunca probiyotik bakterilerin yüksek oranda canlı kaldığı tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *B. coagulans* kullanılarak üretilen probiyotik çikolataların özellikle çocuklar için probiyotik gıda takviyesine yeni bir alternatif olacağı belirtilmektedir.

Majeed ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* MTCC 5856 sporları kullanılarak çay ve kahve demleme aşamalarındaki stabilitesi ve ardından sindirim sistemindeki gelişimleri değerlendirilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre *B. coagulans* MTCC 5856 sporlarının demleme aşamasından sonra kahvede %94.94, çayda ise %99.76 oranında canlılıklarını korudukları belirtilmektedir. Sindirim sisteminde de çay ve kahveyi beslenme

madde olarak kullanabildikleri ve bu ortamda gelişebildikleri tespit edilmiştir. *B. coagulans* MTCC 5856'nın oda sıcaklığında 24 ay depolama sonunda canlılığını %99 oranında koruduğu, probiyotik çay ve kahve üretiminde kullanılabileceği belirtilmektedir.

Sekhvatizadeh ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* kullanılarak kashk (İran'a özgü geleneksel bir fermente süt ürünü) üretimi yapılmıştır. 24 günlük depolama sonunda üründe bulunan canlı *B. coagulans* sayısının probiyotik gıdalarda tavsiye edilen en düşük miktardan yüksek olduğu belirtilmiştir. *B. coagulans* ilave edilen örneklerin duyu analizi sonuçlarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmediği belirtilmiştir.

Soares ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. paracasei* PXN 37, *L. acidophilus* La-5, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, *B. breve* PXN 25, *B. subtilis* PXN 21, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ve *B. coagulans* MTCC 5856 ilavesi ile peynir, pastörize portakal suyu ve ekmek üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre üretilen bütün gıdalarda *Bacillus* suşları *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* suşlarına göre büyük miktarda canlılıklarını korumuşlardır.

Miranda ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ilavesi ile juçara (bir palmye türü) ve çarkıfelek meyvesi içeren şekerlemelerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada üretilen jöleli şekerlerin 90 gün raf ömrü süresince fizikokimyasal karakteristikleri, antioksidan kapasitesi, mikrobiyolojik özellikleri, probiyotik canlılığı, probiyotik bakterinin yapay sindirim sistemindeki canlılığı ve duyu karakteristikleri analiz edilmiştir. 90 gün depolama sonunda *B. coagulans* GBI-30, 6086 canlılığının 6.4 log kob/g'ın üstünde olduğu ve *in vitro* sindirim sistemi koşullarında *B. coagulans* GBI-30, 6086 canlılığının 6.82 log kob/g olduğu tespit edilmiştir. Üretilen şekerlerden 30 g tüketmenin 7.82 log kob/g probiyotik bakteri alımını ve sağlığa yararlı etkileri sağlayacağı belirtilmiştir. Juçara ve çarkıfelek meyvesinden üretilen jöle şekerlerin *B. coagulans* GBI-30, 6086 için iyi bir taşıyıcı olduğu rapor edilmiştir.

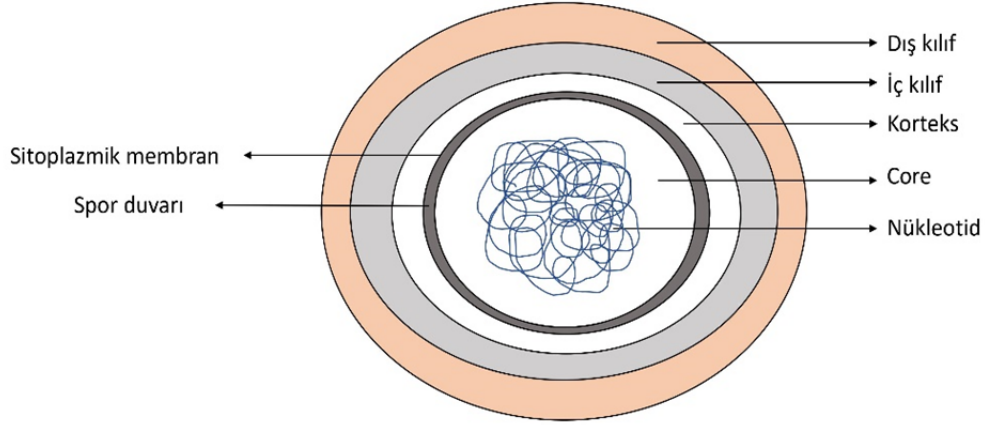
Bagkar ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* LBSC kullanılarak probiyotik gıda (upma olarak bilinen kalın irmik lapası, tatlı mısır çorbası tozu, erişte keki, bitter çikolata, dondurma), alkolsüz sıcak içecekler (masala çayı, yeşil çay, limon çayı, çözünebilir kahve, lassi olarak bilinen yoğurt bazlı içecek) ve alkolsüz soğuk içecek (limonlu soğuk çay tozu) üretimi gerçekleştirilmiş olup ayrıca içime hazır soğuk kahve, portakal suyu, mango suyu, nar suyu, sporcu içecekleri ve hindistan cevizi suyuna karıştırılmıştır. *B. coagulans* LBSC'nin işleme ve depolama aşamalarında çok iyi stabilitede olduğu, düşük ve yüksek sıcaklıkları tolere edebildiği belirtilmiştir. Yüksek kalorili gıdalarda gelişerek gıdanın kalorisini *in vitro* olarak düşürebildiği ve gıdalarda kullanımıyla obezite, yaşlanma ve diğer sağlık risklerinin daha iyi yönetilebilmesi için fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Mirković ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, normal ve sprej-kurutma yapılmış probiyotik *Lactiplantibacillus plantarum* 564 ve *Lactiplantibacillus plantarum* 299v kullanılarak üretilen probiyotik yoğurt ve peynirlerin duyuşal karakteristikleri ve probiyotiklerin depolama süresince canlılığı değerlendirilmiştir. Ürünlerin duyuşal analiz sonuçlarında oldukça iyi durumda oldukları belirtilmiştir. Sprej-kurutma yapılmış olan bakterilerin canlı kalma oranlarının diğerlerine göre oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Sprej-kurutma yapılmış probiyotikler ile peynirin uzun vadede canlılığa sahip olduğu ve probiyotik taşıyıcısı olarak kullanımının başarılı olduğu belirtilmiştir.

Almada-Erix ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* GBI-30, 6086 sporları kullanılarak beyaz ve tam buğday ekmeği üretimleri gerçekleştirilmiştir. Sporların ekmek üretim ve 10 gün depolama süresince dirençlilikleri değerlendirilmiş olup üretilen ekmeklerin fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086 sporlarının ilavesinin nem, hacim, tekstür, renk, su aktivitesi ve pH değerlerini etkilemediği belirtilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, *B. coagulans* GBI-30, 6086 sporlarının ekmek üretiminde kullanılabileceği ifade edilmiştir.

2.4. Bakteri Sporları ve Genel Özellikleri

Bakteriyel sporlar, vejetatif hücrelerin ölmesine yol açacak zorlu ortam şartlarında uzun süre canlılıklarını korumalarını sağlamaktadır (Nicholson ve ark, 2000). Spor oluşumu genellikle ortamda bulunan besin maddelerinin azalmasıyla gerçekleşmektedir. Bu koşullarda bakteri, yaklaşık 8 saat sonunda spor oluşumu ile sonuçlanan, ters çevrilemeyen bir reaksiyona girmektedir (Errington, 2003). Bakteri endosporunun merkezinde yoğun halde inaktif kromozom bulunmaktadır (Şekil 2.1). Peptidoglukan içeriği bakımından zengin kabuk (korteks) ve protein içeriğine sahip bir veya daha fazla tabaka gibi sporu çevreleyen ek katmanlar bulunmaktadır (Henriques ve Moran, 2007). Bu katmanlar birlikte, UV radyasyonu, yüksek sıcaklık, çözücüler, hidrojen peroksit ve enzimlere (lizozim gibi) maruz kalma durumlarına karşı sporu korumaktadır (Nicholson ve ark, 2000). Spor dehidre olmuş bir yapıdadır. Eğer uygun besinler ortamda bulunursa germinasyon gerçekleşmekte ve böylece sadece birkaç dakika içinde sporun içine su geçişine izin verilmekte, sporu çevreleyen tabakalar uzaklaştırılmakta ve vejetatif hücre büyümeye başlamaktadır (Moir, 2006). Sporların germinasyonu ile bakteriyosin gibi antimikrobiyel maddelerin üretimi başlayabilmekte, böylece patojenlerin inhibisyonuna katkı sağlanabilmekte ve probiyotik aktiviteyi olumlu etkileyebilmektedir (Duc ve ark, 2004).



Şekil 2.1. Spor yapısı (Setlow, 2006; McKenney ve ark, 2013)

Türe bağlı olarak değişmekle birlikte sporlar, küre ya da elips şeklinde, 0.8-1.2 μm uzunluğunda, negatif yükle yüklü yüzeye sahip ve kısmen hidrofobiktirler. Spor oluşturan bakteriler genellikle 2 cinsten oluşmaktadırlar: *Bacillus* ve zorunlu anaerobik *Clostridia* (Ricca ve Cutting, 2003; Cutting, 2011).

Bakteri sporları, üzerinde en çok araştırma yapılan ve dünyadaki en dayanıklı canlılardan biridir. Sporların, uzun süreler boyunca zorlu ortam koşullarında canlı kalabilmeleri sayesinde çok dirençli oldukları kabul edilmektedir. Kaynama ya da donma sıcaklığına, iyonlaştırıcı veya iyonlaştırıcı olmayan radyasyona, yüksek veya alçak basınca, çeşitli kimyasallara (alkol veya diğer yaygın biyosidler gibi) dayanıklıdırlar. Sporlar hakkında ilgi çeken bir diğer konu ise dormant haldeyken çevresel uyarıcılara karşı aktif olmaları ve karşılık verebilmeleridir (Thomas ve ark, 2014).

Ortamdaki kolayca metabolize edilebilen karbon, nitrojen veya fosfatın eksikliği ile tetiklenerek vejetatif hücreden spor formu oluşmaktadır. Dormant fazında tespit edilebilecek bir metabolizma sergilemeyen spor çeşitli fiziksel etkenlerle inaktif hale getirilmeye karşı direnç göstermektedir. Metabolik inaktivliklerine rağmen, ortamdaki besin miktarını izleyerek uygun koşullara ulaşıldığı durumda germinasyon ile vejetatif fazına geçmektedirler. Spor oluşumu,

bakterinin elverişsiz ortam koşullarından geçici olarak kaçmasını ifade etmektedir. Ayrıca spor formunda iken rüzgar, su, canlı konak gibi çeşitli faktörlerle yerlerinin değiştirilmesi de söz konusu olabilmektedir (Nicholson ve ark, 2000).

Dormant fazdaki sporlar uzun ömür sergiledikleri gibi dünyanın her bir köşesinde bulunabilmektedir. Yüz bin yıllık örneklerde sporların canlılıklarını koruduğu hatta 25-40 milyon yıllık fosil haldeki bir arının bağırsağında canlı *B. sphaericus* sporlarının bulunduğu rapor edilmiştir (Nicholson ve ark, 2000).

Dirençleri üzerinde spor kılıfı önemli bir rol oynamaktadır. Peptidoglikolitik enzimlerin spor korteksine ulaşmasını engellemekte ve hidrojen peroksit gibi bazı kimyasallara karşı dirençli olmasını sağlamaktadır. Sporlarda bulunan iki membranın da geçirgenliği kısıtlama özelliğine sahip olabileceği belirtilmektedir. Spor kabuğu, spor kılıfı ve ekzosporyumun su içeriği gelişmekte olan bir hücrenin su içeriği ile benzerdir (toplam ağırlığın %75-80'i kadar). Spor merkezinin su içeriği ise oldukça düşüktür (toplam ağırlığın %28-50'si kadar). Spor merkezinin su içeriğinin sporun ıslak-ısı direnciyle ters orantılı olduğu belirtilmektedir (Nicholson ve ark, 2000).

2.4.1. *Bacillus* Sporları İle İlgili Yapılmış Çalışmalar

Bacillus sporlarının olumsuz koşullarda uzun süre canlılıklarını sürdürebilmeleri üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır.

Morgan ve Reed (1954) tarafından yapılan bir çalışmada, gama ışınlarının *Clostridium* spp. ve *B. coagulans* sporları üzerine etkisi araştırılmıştır. *C. botulinum* sporlarının diğer sporlara göre daha dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Condon ve arkadaşları (1992) yaptıkları bir çalışmada, mikroorganizmaların spor oluşturma safhalarının uzunluğunun ve ortamda bulunan mineral madde konsantrasyonunun, spor tabakalarının kalınlığına ve bu tabakaların kimyasal bileşimine farklılıklar kazandırdığını belirtmişlerdir. Ortamda bulunan metal iyonlarının spor oluşum safhalarında kullanılmasının ardından spora

uygulanacak ısıtma işleminin, metal iyonlarının daha yoğun ısı tutma özellikleri sebebiyle letal etki yapmasına neden olduğu rapor edilmiştir.

Horneck ve arkadaşları (1994) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. subtilis* sporları 6 yıl boyunca uzay koşullarına maruz bırakılmış ve ardından canlı kalma durumları incelenmiştir. Sporların zorlu uzay koşullarında canlılıklarını önemli ölçüde korudukları, ortamda bulunan glikoz ve tampon tuzları gibi bileşenlerin kimyasal koruyucu olarak işlev gördüğü belirtilmiştir.

Simmonds ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* cinsi bakteri sporlarının yüksek hidrofobik özellikleri sayesinde üretim proseslerindeki alet ve ekipmanlara kontamine olarak ısıtma işlem basamaklarından sonra da canlı kalabildikleri kanıtlanmıştır.

Thomas (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. pumilus* üzerine alkolün etkisi araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki (%25, %50, %70, %80, %90) etanol içerisinde 26°C'de 1-24 sa bekletildikten sonra Nutrient Agar besiyerine ekimleri yapılmıştır. En yüksek öldürücü etkinin %90 konsantrasyonunda elde edildiği tespit edilmiştir. %70 etanol konsantrasyonunda 4 ay sonunda hücre sayısında %25-50 gibi bir azalma gözlemlendiği belirtilmiştir.

Thomas (2012), *Bacillus* türleri üzerinde etanolün etkisini belirlemek amacıyla yaptığı bir çalışmada, çeşitli kaynaklardan izole edilen *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. fusiformis* ve *B. flexus*'u kullanmıştır. Bakteriler farklı etanol konsantrasyonlarına (%25, %50, %60, %70, %80, %90) maruz bırakılmıştır. Vejetatif hücreler ve sporlar üzerindeki etkisi göz önüne alındığında en yüksek bakterisit ve sporisit etkiyi %90 konsantrasyonundaki etanolün gösterdiği belirtilmiştir. Sporların boyutunun ve sertliğinin suya, kültürün tazelik durumuna, gelişme koşullarına ve diğer faktörlere bağlı olarak değişmekte olduğu ve spor formundaki organizmaların alkol toleranslarını belirlediği tespit edilmiştir.

Spor katmanlarının geçirgenliği, spor merkezine iletilecek su ve mineral madde miktarı ile ilişkilidir. Spor merkezinin su içeriği uygulanacak ısıtma işleminin öldürücü etkisini arttırmaktır. Spor merkezinin su miktarı ısıtma işlem sırasında ısı

taşıyıcısı gibi görev yaparak ısının, sporun genetik materyaline kadar taşınmasını sağlamaktadır. Genetik materyalin ısı işlem ile zarar görmesi ise canlılık faaliyetlerinin kısıtlanmasına neden olmaktadır (Setlow, 2011).

B. coagulans MTCC 5856 sporlarının, fonksiyonel gıdaların zorlu üretim ve depolama koşullarında ve sindirim sisteminde canlı kalabildikleri, immün sistemi uyardıkları ve klinik diyare tedavisinde olumlu etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Shinde ve ark, 2020).

2.5. *Bacillus* Türlerinin Probiyotik Olarak Kullanımı ve Yapılan Çalışmalar

Bacillus türleri ilk olarak 1958 yılında *B. clausii* sporları içeren İtalyan Enterogermina® markası ile kullanıma sunulmuştur. *Bacillus* türleri üzerine bilimsel olarak 2000’li yıllarda yoğunlaşmıştır. *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* ve *B. licheniformis* en çok çalışılan türler olduğu bildirilmiştir (Cutting, 2011). Sporların ısıya dayanıklı olmaları ve düşük pH’da canlılığını koruyabilmeleri sayesinde diğer spor oluşturmeyen *Lactobacillus* spp. gibi bakterilere kıyasla canlılıklarını yitirmeden oda sıcaklığında depolanabilmesi, sindirim sisteminde canlı kalabilmesi gibi bir çok avantaja sahiptirler (Spinosa ve ark, 2000; Barbosa ve ark, 2005; Tuohy ve ark, 2007). Bu sayede sporlar soğutmaya ihtiyaç duymadan depolanabilmekte ve tüketilen bakteri miktarının tümü ince bağırsağa ulaşabilmektedir (Cutting, 2011).

Bacillus spp., sağlık üzerinde gösterdiği önemli etkilerden dolayı, insanlar için üretilen gıda takviyelerinde ve hayvan beslenmesinde kullanılması son zamanlarda büyük ilgi çekmektedir. Bu nedenle yeni potansiyel probiyotik suş kaynaklarının aranmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Mohkam ve ark, 2016).

Spor forma sahip probiyotikler insanlarda takviye edici gıda olarak, hayvanlarda büyümeyi teşvik edici ve rekabetçi ajan olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca su ürünlerinde de büyümeyi teşvik edici ve hastalıklara karşı koruyucu özelliğe sahip olması amacıyla kullanımı mevcuttur. *B. coagulans*’ın bakteriyosini olan Coagulin enterik patojenlere karşı yüksek miktarda

etkiye sahiptir (Cutting, 2011). Spor oluşturan basiller, H_2O_2 , O_2^{2+} , O_2^{2-} ve OH^{-7} gibi oksijen moleküllerinin ya da serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltan katalaz üreticilerindendir. Bu moleküller metabolik prosesler sırasında üretilmekte ve konak sağlığına zarar vermektedirler. Bu nedenle, spor oluşturabilen basil probiyotik mikroorganizmalar iyi derecede proteaz üretimlerinin yanı sıra antioksidanlara iyi bir alternatif olarak düşünülebilmektedir (Mohkam ve ark, 2016).

Bacillus türlerinden GRAS (Genellikle güvenli olarak kabul edilir) olarak tanımlanan ilk bakterinin GanedenBC³⁰ olarak tanınan *B. coagulans* olduğu belirtilmiştir. Bazı kaynaklarda *B. subtilis* var. *natto*'nun GRAS olduğu rapor edilmiştir. Fakat söz konusu GRAS tanımlamasının bakteri için değil, bakterinin ürettiği enzim için yapılmış olan bir tanımlama olduğu belirtilmiştir. Ganeden firması tarafından GanedenBC³⁰ adı ile satışa sunulan *B. coagulans* suşunun yaygın olarak kullanımı bulunmaktadır (Cutting, 2011).

Topraktan kolaylıkla ve çok fazla izole edilmeleri sebebiyle, *Bacillus* türleri yaygın olarak toprak kaynaklı olarak kabul edilmektedir. Ancak, vejetatif bakterilerin topraktan izolasyonunun sorun yaratabilmesinin yanı sıra sporların yapısı göz önünde bulundurulduğunda, sporları tüketen hayvanların sindirim sisteminde canlı kalabilmek üzere dizayn edildikleri düşünülmektedir. Bu bakış açısı, konu üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre tüketilen *B. subtilis* sporlarının %10'undan fazlasının ince bağırsakta çimlenerek gelişmesi, çoğalması ve tekrar spor üretimi özelliğine sahip olması sebebiyle ortaya çıkmaktadır. Bağırsakta peristaltik hareketler sebebiyle sporlar dışkıyla birlikte dışarı atılmakta ve toprakta bulunabilmektedir. Sporlu mikroorganizmaların bağırsaklarda bulunması, sporların neden böcek, hayvan ve insanların sindirim sisteminde bulunabildiğini açıklamaya yardımcı olmaktadır (Cutting, 2011).

Yapılan bazı çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, biyopsi ile ve dışkıdan alınan örnekler ile basillerin insan sindirim sisteminden izole edilebildiği tespit edilmiştir (Fakhry ve ark, 2008; Hong ve ark, 2009a). Bir başka çalışmada

ise, topraktan ve insan dışkılarından alınan örnekler değerlendirilmiş ve *Bacillus* sporlarının sırasıyla yaklaşık olarak 10^6 ve 10^4 spor/g konsantrasyonunda bulunduğu tespit edilmiştir. Dışkıda tespit edilen spor sayısının topraktan kontamine olmuş gıda ile alınabilecek spor miktarından oldukça fazla olduğu belirtilmektedir (Hong ve ark, 2009b).

Yapılmış birçok çalışmaya göre, farelerin sindirim sisteminde sporların çimlenmesi sonucu immün sisteminin harekete geçtiği belirtilmiştir. Sporların probiyotik etki göstermesinin sebebinin, immün sisteminin harekete geçtiği bu durumdan kaynaklanabildiği belirtilmiştir (Cutting, 2011).

Bacillus türlerinin güvenliğinin ayrıntılı olarak araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. *Bacillus* kaynaklı hastalıkların çoğunun fırsatçı enfeksiyonlardan kaynaklandığı ya da yanlış tanı olduğu belirtilmektedir (Cutting, 2011). *B. subtilis* var. *natto*, *B. indicus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* 2336, *B. subtilis* 2335 kullanılarak hayvanlar üzerinde yapılan akut ve sub-kronik toksisite testleri ile *in vitro* araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda olumsuz etkilerinin tespit edilemediği belirtilmiştir (Hong ve ark, 2008; Sorokulova ve ark, 2008; Endres ve ark, 2009).

Duc ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, ticari probiyotik karışımlarından elde edilen *B. cereus*, *B. clausii* ve *B. pumilus* sporları kolonizasyon özellikleri, immün sistemi uyarıcı etki ve antimikrobiyel aktivite açısından incelenmiştir. *B. cereus* suşlarının farelerin sindirim sisteminde 18 güne kadar kalabildiği tespit edilmiş olup, bu durumun *B. cereus* suşlarının kolonize olabildiklerini gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan *B. cereus* suşlarından birinin sindirim sistemi koşullarına ve sindirim sistemi sıvılarına oldukça duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Test edilen bütün bakteri sporlarının fareler üzerinde immün sistemi uyarıcı etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca antimikrobiyel aktiviteye sahip oldukları da tespit edilmiştir. Fakat çalışmada kullanılan *B. cereus* suşlarının Hbl ve Nhe enterotoksinlerini ürettikleri belirlenmiş olduğundan insan tüketimi için uygun olmadığı belirtilmiştir.

Sudha ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* IS-2'nin yeşil bataklık yaprakları ve insan dışkısı ile kontamine olmuş topraklardan izolasyonu yapılmış ve probiyotik özellikleri değerlendirilmiştir. Gram boyama ve spor boyamanın ardından hareketlilik testi ve biyokimyasal karakterizasyonu analiz edilmiştir. 16S rRNA analizi ile *B. coagulans* olduğu belirlenen izolatın asidik pH ve safra tuzuna direnci, adhezyon özelliği, antibiyotik direnci ve antibakteriyel özellikleri belirlenmiştir. Bakterinin pH'sı 1.5 olan ortamda canlı kalabildiği belirtilmiş olup bu ortamda 2 log değerinde bir düşüş olduğu, pH 2 ve 3 olan ortamlarda ise 1 log değerinde düşüş gözlemlendiği belirtilmiştir. Safra tuzu konsantrasyonunun %3 olduğu ortamda hücre sayısında 2 log değerinde, %1 ve %2 konsantrasyonda olduğu ortamda ise 1 log değerinde düşüş gözlenmiştir. Bakterinin hücre yüzey hidrofobikliğinin %32 olduğu, analizde kullanılan antibiyotiklerden basitrasin, kolistin, metisilin, metronidazol ve streptomisine dirençli olduğu, patojenlerden *E. coli* NCDC 135 ve *B. cereus* NCDC 240 üzerinde inhibe edici aktiviteye sahip olduğu fakat *Shigella flexneri* MTCC 1457 gelişimi üzerinde antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı belirtilmiştir.

Lee ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, tavuk dışkısından izole edilen *B. amyloliquefaciens* KU801'in probiyotik özellikleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla yapay sindirim sıvısı (%1 pepsin, pH 2.5) oluşturulmuş ve *B. amyloliquefaciens* KU801'in toleransı değerlendirilmiştir. *B. amyloliquefaciens* KU801 sporları yüksek tolerans gösterirken, vejetatif hücrelerin ise canlı kalma oranlarının düşük olduğu tespit edilmiştir. *B. amyloliquefaciens* KU801'in enzim üretimi de araştırılmış olup kanserojen bir enzim olan β -glukuronidazı üretmediği, alkalın fosfataz, esteraz ve esteraz lipaz enzimlerini ise üretebildiği belirtilmiştir. *B. amyloliquefaciens* KU801'in nitrik oksit üretimini engellediği, interlökin-1 alfa üretimini arttırdığı, metilnitronitrosoguanidin (MNNG) tarafından DNA'ya verilen zararın önemli ölçüde inhibe edildiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada, *B. amyloliquefaciens* KU801'in kanser önleyici

mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlandığı ve immün sistemi uyarıcı etkisi olduğundan yem katkısı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Nithya ve Halami (2013) yaptıkları bir çalışmada, süt, peynir ve fermente fasülyeden izole edilmiş üç bakteriyosinogenik *Bacillus* sp.'nin (*B. licheniformis* Mel, *B. flexus*, Hk1 ve *B. subtilis* Bn1) *in vitro* probiyotik özelliklerini belirlemiştir. Bu amaçla bakterilerin safra tuzuna ve düşük pH'ya dirençleri, fitaz aktiviteleri, ekzopolisakkarit üretimleri, antibiyotik dirençleri, adhezyon ve otoagregasyon özellikleri ve patojenler üzerindeki inhibe edici özellikleri belirlenmiş ve probiyotik *B. coagulans* ile kıyaslanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, tüm test bakterilerinin *B. coagulans*'a göre daha iyi asit ve safra tuzu direncine sahip oldukları belirtilmiştir. Değişken adhezyon ve otoagregasyon özelliklerine sahip oldukları, antioksidan aktivitelerinin bulunduğu, test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı oldukları belirtilmiştir. Gıda kaynaklı patojenleri (*Listeria monocytogenes* ScottA, *Shigella boydii*, *Micrococcus luteus* ATCC9341) inhibe edici özellikleri olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteriler arasında *B. licheniformis* Mel'in potansiyel probiyotik özelliklere sahip olduğu, özellikle de ticari amaçlarla probiyotik olarak kullanılabileceği, bunun için de öncelikle *in vivo* güvenlik analizlerinin yapılması gerektiği belirtilmiştir.

Algburi ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. amyloliquefaciens* B-1895 ve *B. subtilis* KATMIRA1933'ün güvenlik ve probiyotik özellikleri değerlendirilmiştir. Bakterilerden elde edilen süpernatantlara uygulanan bakteriyel ters mutasyon testi sonuçlarına göre bu bakterilerin mutajenik olmadığı belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan bakterilerin *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile koagregasyon özelliğinin bulunduğu, ayrıca bakteri süpernatantlarının *Streptococcus intermedius* ve *Porphyromonas gingivalis* gelişimlerini inhibe ettiği belirtilmiştir. *B. amyloliquefaciens* B-1895 ve *B. subtilis* KATMIRA1933 sporlarının %0.3 safra tuzuna dirençli olduğu ve 4 saat boyunca pH 2 ve 3 değerlerinde inkübasyon sonunda canlılıklarını koruduğu ifade edilmiştir. Bu iki bakterinin antimikrobiyel bileşen üretim özelliklerinin sağlık

bakım formülasyonlarında, kişisel bakım ürünlerinde, gıdalarda ve hayvan yemlerinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Mohkam ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* türleri çeşitli toprak örneklerinden izole edilmiş ve probiyotik özellikleri belirlenmiştir. Bu amaçla izole edilen bakterilerin spor üretimleri gerçekleştirilmiş, asit ve safra tuzuna dirençleri, antimikrobiyel aktiviteleri, antibiyotik dirençleri, katalaz ve hemolitik aktiviteleri, DNase, gelatinaz ve proteaz üretimleri, hücre yüzeylerinin hidrofobikliği, otoagregasyon özellikleri, biyofilm üretimleri ve sitotoksosite özellikleri araştırılmıştır. Çeşitli bitki ve kök topraklarından alınan örneklerden 21 adet bakteri izole edilmiş olup bunların biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik analizleri yapılmıştır. Gram-pozitif, basil, aerob, sporlu, katalaz üreten ve nitrojensiz ortamda gelişebilen bakterilerin 16S rRNA analizi sonucunda *Bacillus* spp. oldukları sonucuna varılmıştır. Bu bakteriler arasından sadece 7 adedinin düşük pH'ya direnç gösterebilmesi nedeniyle diğer analizlere bu 7 bakteri ile devam edilmiştir. Bakterilerin %4 safra tuzu bulunan ortamda 3 saat inkübasyon sonunda canlılıklarını korudukları, *Staphylococcus aureus* ATCC 1912, *B. cereus* PTCC 1015 ve *L. monocytogenes* PTCC 1163'e karşı inhibe edici özelliklerinin olduğu, *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 25922'ye karşı ise inhibe edici aktivitelerinin tespit edilemediği belirtilmiştir. *Bacillus* spp. izolatlarından üçünün test edilen tüm antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu, birinin ve kontrol probiyotiği olarak kullanılan *B. coagulans*'ın penisilin ve ampisiline dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatlarda, virülans faktörü olarak bilinen DNase üretimi gözlenmemiştir. Bazı izolatların β -hemolitik aktivitesi zayıf olmakla birlikte, bazılarında γ -hemolitik aktivite gözlenmemiş olup, γ -hemolitik aktiviteye sahip suşlar arzu edilir olsa da kan hücreleri sindirim sisteminde bulunmadığından bu özelliğin fazla önemsenmediği belirtilmiştir. Bütün *Bacillus* spp.'nin proteaz, jelatinaz ve katalaz ürettiği belirtilmiş olup, bu enzimlerin patojen bakterilerin inhibisyonunda antagonistik rol oynayabileceği belirtilmiştir. Biyofilm üretimlerinin izolatlara göre değiştiği ve düşük sitotoksositeye sahip oldukları

bildirilmiştir. Çalışmada izole edilen bakterilerden ikisinin *in vitro* olarak iyi probiyotik özelliklere sahip olduğu ve insan ve hayvanlarda kullanım amacıyla potansiyel probiyotik olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir.

Hamdy ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, ballardan ve bal arılarının sindirim kanalından izole edilen *B. subtilis* HMNig-2 ve *B. subtilis* MENO2'nin probiyotik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla bakterilerin ısı dirençleri, NaCl ve H₂O₂ dirençleri, katalaz ve proteaz aktiviteleri, düşük ve yüksek pH'ya dirençleri, pankreatik enzim ve safra tuzu toleransları, antibiyotik dirençleri, antimikrobiyel aktiviteleri, antioksidan aktiviteleri, biyofilm oluşum özellikleri, hemolitik aktiviteleri ve Caco-2 hücrelerine *in vitro* adhezyon özellikleri belirlenmiştir. Bakterilerin 80°C'de %73-87 oranında canlılıklarını koruduğu belirtilmiştir. Bütün izolatların 3 M NaCl içeriğine sahip ortama ve %0.1 H₂O₂ içeren ortama dirençli olduğu, pH 3.5 olan ortamda canlılıklarını korudukları belirtilmiştir. pH 2 olan ortamda ise hücre sayılarında düşüşler gözlenmiştir. İzolatların %0.1 safra tuzu içeren ortamlarda canlılıklarını koruduğu, %0.3 safra tuzu içeren ortamlarda ise canlılıklarında bir miktar düşüş olduğu belirtilmiştir. Bütün izolatlardan biri hariç (N1 suşu) diğerlerinin çalışmada kullanılan antibiyotiklere duyarlı olduğu, N1 suşunun ise ampisilin, kloramfenikol ve eritromisin hariç diğer antibiyotiklere dirençli olduğu tespit edilmiştir. N1 suşu hariç diğer izolatlar *C. albicans* NRRL Y-477, *A. niger* NRRL 599 ve *P. aeruginosa* ATCC 27953 üzerinde inhibe edici aktivite göstermiş olup, çalışmada kullanılan bütün izolatlar *B. cereus* ATCC 10876 üzerinde inhibe edici aktivite göstermiştir. Çalışmada kullanılan bakterilerin antioksidan aktivitelerinin ve hemolitik aktivitelerinin değişken olduğu belirtilmiştir. Bütün izolatların biyofilm üretme özelliklerinin olduğu, izolatların katalaz ve proteaz aktivitelerinin pozitif olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan izolatlardan iki tanesinin potansiyel probiyotik özelliklerine sahip olduğu belirtilmiş olup, farklı endüstriyel proseslerde kullanılabilecek kapasitede oldukları rapor edilmiştir.

Jeon ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, geleneksel bir Kore yemeği olan kimçiden izole edilen *B. subtilis* P223'ün probiyotik özellikleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla bakterinin 16S rRNA ile tanımlanmasının ardından, yapay sindirim sıvısı safra tuzuna dirençleri, HT-29 hücrelerine adhezyon özellikleri, otoagregasyon ve koagregasyon özellikleri, patojenlerin HT-29 hücrelerine adhezyonunu inhibe edebilme özellikleri, enzim üretimleri, antibiyotik duyarlılıkları, hemoliz özellikleri ve toksik genlerin varlığı araştırılmıştır. *B. subtilis* P223 sporlarının yapay sindirim sıvısına (pH 2.5, %0.3 pepsin, 3 sa inkübasyon) ve safra tuzuna (%0.3 oxgall, 24 sa inkübasyon) yüksek direnç gösterdiği belirtilmiştir. *B. subtilis* P223 sporlarının adhezyon yeteneklerinin vejetatif hücrelere göre daha çok olduğu ifade edilmektedir. Yüksek otoagregasyon özelliğine sahip olduğu ve patojenlerle (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *L. monocytogenes* ATCC 15313 ve *E. coli* ATCC 25922) koagregasyon yeteneklerinin kuvvetli olduğu, patojenlerin HT-29 hücrelerine adhezyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Karsinojenik bir enzim olan β -glukuronidazı üretmediği, fakat amilaz ve proteaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan 8 antibiyotik arasından *B. subtilis* P223'ün sadece streptomisine dirençli olduğu belirtilmiştir. *B. subtilis* P223'ün hemolitik aktivitesinin olmadığı ve enterotoksin genlerini barındırmadığı rapor edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, kimçiden izole edilen *B. subtilis* P223'ün probiyotik amaçlı kullanım için potansiyelinin olduğu belirtilmiştir.

Ritter ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotik formülasyonlarda kullanılan *B. subtilis* suşlarının probiyotik özellikleri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Bu amaçla bakterilerin antibakteriyel, antifungal aktiviteleri, DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri, BATH (bakterinin hidrokarbonlara adhezyonu) testi ile hidrokarbonlara adhezyonları, otoagregasyon özellikleri, safra tuzu ve asit dirençleri, ekzopolisakkarit üretimleri, fitaz aktiviteleri, selülitik aktiviteleri, hemolitik aktiviteleri belirlenmiş, sürfaktin ve iturin genleri PCR ile araştırılmış ve sürfaktin üretimleri analiz edilmiştir. En az bir *Bacillus* spp.

tarafından *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, *L. monocytogenes* ATCC 15131, *B. cereus* ATCC 9634 ve *S. aureus* ATCC 1901 üzerinde inhibe edici etki tespit edilmiştir. Fakat *E. coli* ATCC 8739, *S. enterica* subsp. *enterica* ATCC 13076 ve *P. aeruginosa* 4B üzerinde inhibe edici etki gösteren *Bacillus* spp. tespit edilememiştir. Probiyotik kültürlerin antioksidan aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Hidrokarbonlara adhezyon özellikleri %2.2 - %56.4 arasında, otoagregasyon özellikleri ise %4.4 - %52.9 arasında değişmektedir. Genellikle safra tuzuna ve asidik pH'ya dirençli oldukları tespit edilmiştir. Test edilen probiyotik kültürlerin hemolitik aktivite göstermediği, 4 suşun surfaktin üretiminin substrattan bağımsız olmak üzere yüksek olduğu belirtilmiştir.

Talebi ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, turşudan izole edilen *Bacillus* spp.'lerin probiyotik özellikleri değerlendirilmiştir. Bakterilerin yüksek asit direnci ve safra tuzu toleransına sahip oldukları, çeşitli patojenler (*S. aureus* PTCC1431, *B. cereus* PTCC1665, *P. aeruginosa* PTCC1074, *E. coli* PTCC 1330 ve *L. monocytogenes* PTCC 1166) üzerinde antagonistik aktiviteye sahip oldukları, antioksidan, otoagregasyon ve koagregasyon özelliklerinin iyi bilinen probiyotiklerle eşdeğer olduğu, antibiyotiklere duyarlı oldukları belirtilmiştir. PCR ile yapılan analizlerde enterotoksin (*Hbl* ve *NHe*), sitotoksin (*Cyt1*) ve emetik (*Ces*) genlerinin tespit edilemediği, HT-29 hücreleri için toksik özellikte olmadıkları tespit edilmiştir. Çalışmada izole edilen bakterilerin karakteristik ve güvenlik özelliklerine bakıldığında, hayvanlar ve insanlar için probiyotik olarak kullanılma potansiyelinin olduğu belirtilmiştir.

Celandroni ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, marketlerde satılmakta olan ve *Bacillus* spp. sporlarını içerdiği belirtilen probiyotik karışımların içerdiği mikroorganizmalar araştırılmıştır. Bu amaçla bakterilerin tanımlamaları yapılmış ve virülans potansiyelleri belirlenmiştir. Yapılan araştırmada, dört probiyotik formülasyonda, ürünlerin etiketinde belirtilenden farklı olarak kontamine olmuş (*B. licheniformis*, *B. badius*, *Lysinibacillus fusiformis* ve *B. cereus*) bakteri sporlarının da tespit edildiği belirtilmiştir. Üzerinde

çalışılan on formülasyondan sadece ikisinin kalitatif ve kantitatif olarak etikette yazılanlara uyduğu belirtilmiş olup, probiyotik ürünlerin daha sıkı bir kalite kontrolden geçirilmesi gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca *Bacillus* sporları ile çalışılırken kalite kontrol aşamasında deneyimli, farklı bakteri kolonilerini morfolojik olarak tespit edebilecek ve modern teknolojileri bu bakterilerin tanımlanmasında kullanabilecek kişilerin çalıştırılması gerektiği ifade edilmiştir.

Liu ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, balık bağırsaklarından izole edilen ve potansiyel bir probiyotik olduğu düşünülen *B. pumilus* A97'nin *in vitro* olarak hemolitik aktivitesi, ekstraselüler enzim aktivitesi, patojenleri inhibe edici etkisi, sindirim sistemi ortamına ve safra tuzuna karşı direnci, hücre yüzey hidrofobikliği, otoagregasyonu, biyofilm üretimi ve antibiyotik direci araştırılmıştır. Balıklarda *B. pumilus* A97'nin 56 gün boyunca tüketimi ile kilo alımı, büyüme oranı, yem verimliliği ve bağışıklık sisteminin aktive olmasında önemli ölçüde artış gözlemlendiği belirtilmiştir. Sonuçlara göre, *B. pumilus* A97'nin balıklarda probiyotik amaçlı kullanımı için önemli özelliklere sahip olduğu ifade edilmektedir.

Shivangi ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, pirinç ile üretilen fermente bir Güney Hindistan ve Sri Lanka yemeği olan idli suyundan izole edilen *Bacillus* spp.'lerin probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla bakterilerin hemolitik ve DNase aktiviteleri, antibiyotik, asit ve safra tuzu dirençleri, lizozim toleransı, adhezyon, otoagregasyon ve koagregasyon özellikleri ve teknolojik özellikleri (proteolitik, lipolitik, amilolitik, otolitik aktiviteleri, kolesterolü uzaklaştırma özellikleri, ısı direnci, β -galaktozidaz aktivitesi, biyofilm üretimi ve patojenler tarafından üretilen biyofilmi inhibe edici etkisi) ve antioksidan özellikleri değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, izole edilen bakterilerden ikisinin *Bacillus* spp. olduğu ve bunların da güvenli olduğu, asit ve safra tuzuna yüksek dirence sahip olduğu, ayrıca lizozime dirençli, adhezyon, otoagregasyon, koagregasyon, biyofilm üretme ve HT-29 hücrelerine adhezyon özelliklerinin olduğu belirtilmiştir. Bakterilerin probiyotik etkilerinin

yanı sıra anti-kolesterol, antibiyofilm ve antioksidan özellikler gösterdiği, bakterilerin zorlu koşullara dayanıklı olduğu ve yüksek sıcaklıklarda stabil olduğu belirtilmiştir. Çalışmada izole edilen *Bacillus* spp.'lerin *in vivo* olarak probiyotik ve güvenlik özelliklerinin değerlendirilmesinin ardından fonksiyonel gıdalarda starter kültür olarak kullanılabilecekleri belirtilmiştir.

Monzón-Atienza ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, bir balık çiftliğinin atık su örneklerinden izole edilen *B. velezensis* D-18'in probiyotik özellikleri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Düşük pH'da canlı kalabilme, balık safra tuzuna direnç, patojen kültür üzerinde inhibe edici aktivite, mukusa adhezyon kapasitesi ve balıklarda kullanımının güvenilirliği incelenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, *B. velezensis* D-18'in balıklar tarafından tüketiminin olumsuz bir etkiye neden olmadığı ve iç organlarda hasar oluşturmadığı belirtilmiştir. Sindirim sisteminin olumsuz koşullarında canlılığını koruyabildiği ve *Vibrio anguillarum* 507'ye karşı inhibe edici özelliğe sahip olduğu belirtilmiş olup, yol açtığı enfeksiyonları önlemede etkili olarak kullanılabilecek bir probiyotik aday olduğu ifade edilmektedir.

2.6. *Bacillus coagulans*

B. coagulans ilk olarak koagüle olmuş haldeki koyulaştırılmış paket süttten izole edilmiştir (Sarles ve Hammer 1932). 1933 yılında Horowitz-Wlassowa ve Nowotelnov tarafından *Lactobacillus sporogenes* olarak tanımlanmış ve 1974 yılına kadar bu şekilde kullanılmıştır. 1974 yılında diğer *Lactobacillus* türleriyle aynı taksonomik karakteristiklere (laktik asit üretimi) sahip olmasına rağmen spor oluşturma özelliğinden yola çıkılarak tekrar sınıflandırılmış ve *B. coagulans* olarak adlandırılmıştır (Endres ve ark, 2009; Karri ve ark, 2016). Devamında yapılan taksonomik araştırmalar sonucunda bu türün *Bacillus* cinsi altında sınıflandırılması gerektiği belirtilmiştir (Cao ve ark, 2020).

Probiyotik mikroorganizmalar içerisinde yer alan *B. coagulans*; Gram-pozitif, katalaz pozitif, çubuk şekilli, aerobik veya fakültatif anaerobik, asidurik,

hareketli, patojen olmayan, laktik asit üreten, nişastayı hidrolize eden ve sporlu bir bakteridir. Hücre çapı 0.6-1.0 µm'dir. Orta derecede termofilik bir bakteri olup, gelişebildiği sıcaklık en az 30°C, en fazla ise 57-61°C'dir. Gelişimi için optimum sıcaklık değeri 35-50°C arasında, optimum pH ise 5.5-7.0 arasında değişebilmektedir. Hücreler pH 4 değerinde gelişebilmekte olup, gelişebileceği maksimum pH 10.5-11.0 olarak verilmiştir. %5 NaCl içeren ortamlarda gelişmemektedir. Gelişimi için ihtiyaç duyduğu besinler çeşitli amino asitleri ve vitaminleri içerebildiği gibi değişkenlik göstermektedir. Tirozini parçalayamamakta ve kazeini hidrolize edememektedir. Asit üretmesine rağmen maltoz, rafinoz, mannitol ve sükrozun fermantasyonundan gaz üretmemektedir. Asit üretmesinden dolayı süt ürünleri, meyve ve sebzelerde bozulmalara sebep olduğu bildirilmektedir. Ancak bunun aksine laktik asit ve bazı suşların da termostabil alfa-amilaz gibi diğer ürünleri üretmesi nedenleriyle endüstriyel açıdan önem taşımaktadır (Aşan Özusağlam, 2010; Vos ve ark, 2011; Majeed ve ark, 2016a). Antimikrobiyel aktiviteye sahip koagulin peptidini de ürettiği belirtilmektedir (Vos ve ark, 2011). *B. coagulans* ısı, asit ve safra tuzu bulunan zorlu koşullarda stabilliğini oldukça korumaktadır. Midenin asitli koşullarında ve sindirim enzimlerinin bulunduğu ortamlarda canlı kalabilmekte ve bağırsaklarda kolonize olabilmektedir (Fan ve ark, 2020; Metlakunta ve Soman, 2020).

B. coagulans, spor oluşturma özelliği ile *Bacillus* türünün, laktik asit oluşturma özelliği ile de *Lactobacillus* türünün genel ortak özelliklerini taşımaktadır. Oksidaz negatif olması, nitratı indirgeyememe ve laktik asit üretimleri ile *B. coagulans* ve laktobasiller ortak özellik göstermekte olup katalaz pozitif olması ile laktobasillerden ayrılmaktadır (Vecchi ve Drago, 2006).

Tryptic Soy Agar besiyerinde 40°C'de 2 gün inkübasyon sonunda *B. coagulans* koloni çapı 3 mm'ye kadar çıkabilmekte olup, koloniler beyaz, konveks ve düzgün yüzeylidir. Koloniler yaşlandıkça krem renkli olabilmektedir (Vos ve ark, 2011).

B. coagulans sporları genelde elips şeklinde olup bazı durumlarda küre şeklinde de bulunmaktadır (Vos ve ark, 2011). Spor oluşum yeri terminal iken, diğer türlerde sentral veya subterminal'dir. Ayrıca, sitokrom-C oksidazın olmayışı ve nitratı nitrite indirgeyememesi nedenleriyle diğer *Bacillus* türlerinden farklılık göstermektedir. Yem katkısı olarak sindirimi arttırma yoluyla hayvanların (kanatlı, domuz vb.) gelişimini önemli bir şekilde arttırmakta, bağırsakta metabolik bileşenlerin (L-laktat, koagulin, bakteriyosin gibi) senteziyle pH'nın düşmesini sağlayarak patojenlerin gelişimini engellemekte ve *E. coli* ve *Staphylococcus* kaynaklı enfeksiyonları önlemektedir (Aşan Özüsağlam, 2010; Xing ve ark, 2020).

B. coagulans, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından güvenli olarak bildirilmiş olup, GRAS ve QPS (Nitelikli güvenlik karinesi) listesindedir (EFSA, 2013). Çizelge 2.2'de *B. coagulans* içeren satışa sunulmuş ürünler verilmektedir.

Çizelge 2.2. *Bacillus coagulans* içeren probiyotik gıda takviyeleri

Suş	Ürün	Kaynak
<i>B. coagulans</i> 15B	Nutrition essentials probiotic	Elshaghabee ve ark, 2017
<i>B. coagulans</i> ve <i>B. subtilis</i>	NutriCommit	Elshaghabee ve ark, 2017
<i>B. coagulans</i> ve <i>S. boulardii</i>	Flora3	Elshaghabee ve ark, 2017
<i>B. coagulans</i>	THORNE	Elshaghabee ve ark, 2017
<i>B. coagulans</i>	Sunny Green Cleansing Green	Elshaghabee ve ark, 2017
<i>B. indicus</i> HU36, <i>B. coagulans</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. subtilis</i> HU58	Just Thrive	Elshaghabee ve ark, 2017
<i>B. indicus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B.</i> <i>coagulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. clausii</i>	MegaSporeBiotic	Elshaghabee ve ark, 2017
<i>B. coagulans</i>	Sustenex	Cutting, 2011
<i>B. coagulans</i>	Neolactoflorene	Cutting, 2011
<i>B. coagulans</i>	GanedenBC30	Kalman ve ark, 2009
<i>B. coagulans</i> , <i>L. rhamnosus</i> ve <i>L.</i> <i>helveticus</i>	Biolactine family bottles	Celandroni ve ark, 2019
<i>B. coagulans</i> , <i>L. acidophilus</i> ve <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	Ferzym Plus capsules	Celandroni ve ark, 2019
<i>B. coagulans</i>	Lactò Piu bottles	Celandroni ve ark, 2019

Enzim üretimi, antibiyotikler, vitaminler ve diğer biyoaktif metabolitlerin üretilmesi gibi çeşitli biyoteknolojik proseslerde birçok *Bacillus* spp.'nin kullanımı mevcuttur. Sağlık üzerinde çeşitli olumlu etkileriyle *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. coagulans* ticari probiyotik olarak insan ve hayvan tüketimine sunulmuştur. Ayrıca *Bacillus* spp.'nin insan ve hayvanların sindirim sisteminin doğal bir üyesi olduğu belirtilmektedir (Jung ve ark, 2021).

B. coagulans'ın zorlu şartlarda spor oluşturabilmesi ve uzun yıllar boyunca dormant fazda kalabilmesi bilinen bir özelliğidir. Besleyici maddeler, pH, sıcaklık ve nem gibi ortam şartları elverişli hale geldiğinde sporlar çimlenme ile vejetatif hale geçmektedirler (Majeed ve ark, 2016a).

B. coagulans'ın bazı suşlarının ise, yüksek sıcaklık derecelerinde, mide asitliğinde ve safra asitlerinin bulunduğu ortamlarda canlılıklarını sürdürebildiği belirtilmiştir. Bu özelliklere sahip olan suşların sindirim sisteminde canlı kalabilme ihtimalinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Endres ve ark, 2009).

Gelişimi sırasında glikoz, sukroz, maltoz ve mannitolden homofermantatif L-laktik asit üreten, termofilik, besin ihtiyacı düşük olan ve çeşitli karbon kaynaklarında gelişebilen bir bakteridir (Vos ve ark, 2011; Ma ve ark, 2016). Biyotin ve tiamin *B. coagulans* gelişimini destekleyen major büyüme faktörleridir (Vos ve ark, 2011). Termofilik özelliği sayesinde sterilizasyon ihtiyacını ortadan kaldırarak işlem maliyetini düşürmeyi sağlamaktadır (Alexandri ve ark, 2019). *B. coagulans* çeşitli kaynaklardan izole edilebilmekte, suşların büyüme oranları (biyokütle birikimi), laktik asit üretimi, sporulasyon ve besin maddesi gereksinimlerine göre değişiklik göstermektedir (Fan ve ark, 2020). *B. coagulans* suşlarının L-laktik asit üretimleri üzerine yapılmış birçok çalışma vardır (Aulitto ve ark, 2019). Çizelge 2.3'te *B. coagulans* kullanılarak çeşitli ürünlerden laktik asit üretimleri üzerine yapılmış çalışmalar verilmektedir.

Çizelge 2.3. *B. coagulans* ile laktik asit üretimi

Suş	Hammadde	Kaynak
<i>B. coagulans</i> DSM 2314	Buğday samanı	Maas ve ark, 2008
<i>B. coagulans</i> DSM2314	Şeker kamışı melası	Van der Pol ve ark, 2016
<i>B. coagulans</i>	Sorgum suyu	Ou ve ark, 2016; Wang ve ark, 2016
<i>B. coagulans</i>	Kahve ekstraktı	Neu ve ark, 2016
<i>B. coagulans</i> IPE 22	Buğday samanı	Zhang ve ark, 2014
<i>B. coagulans</i> LA 204	Mısır koçanı	Hu ve ark, 2015
<i>B. coagulans</i>	Mısır koçanı	Ma ve ark, 2016
<i>B. coagulans</i> HL-5	Mısır unu	Lv ve ark, 2016
<i>B. coagulans</i> TB/04	Besiyeri	Payot ve ark, 1999
<i>B. coagulans</i> PS5	Besiyeri	Fan ve ark, 2016
<i>B. coagulans</i> arr4	Toz şeker ve maya özütü	Coelho ve ark, 2018
<i>B. coagulans</i> JI12	Palm yağı meyve demeti	Juturu ve Wu, 2018

B. coagulans'ın diğer *Bacillus* probiyotiklerinden farklı fizyolojik özelliklere (mikroskopik görüntü, büyüme koşulları, biyokimyasal reaksiyonları ve karbon kaynağı kullanımı gibi) sahip olduğu belirtilmektedir (De Clerck ve ark, 2004). *B. coagulans* hücre duvarı, içerdiği teikoik asitin yüksek lipid içeriği (%12.6) sebebiyle birçok Gram-pozitif bakteriden farklılık göstermektedir. Ayrıca, diğer *Bacillus* probiyotikleri ile karşılaştırıldığında *B. coagulans*'da bulunan teikoik asitin amino asit ikame edicilerden yoksun olduğu belirtilmektedir (Forrester ve Wicken, 1966).

Ticari olarak GanedenBC30® adıyla bilinen *B. coagulans* GBI-30, 6086 eşsiz teknik ve fonksiyonel özelliklere sahip olmasıyla gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. *B. coagulans* GBI-30, 6086, L (+) laktik asit üretebilmesi, GRAS konumunda olması, sindirim sistemi koşullarına ve gıdanın üretim koşullarına

(yüksek sıcaklık ve basınç gibi) dayanıklı olması gibi özelliklere sahiptir. Spor formu sayesinde zorlu ortam koşullarına direnç gösterebilmektedir. Bu özelliği sayesinde diğer probiyotik potansiyeli olan mikroorganizmalara kıyasla daha çok ilgi çekmektedir (Kobus-Cisowska ve ark, 2019). Ticari bir probiyotik olan *B. coagulans* GBI-30, 6086 (GanedenBC30) insanlar tarafından tüketiminin güvenli olduğu bildirilmiş olup çeşitli sindirim sistemi rahatsızlıklarında iyileştirici etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Fitzpatrick ve ark, 2011; Honda ve ark, 2011).

Spor oluşturan yapıları sayesinde bu bakterilerin canlılıkları ve stabiliteleri diğer probiyotik bakterilere göre oldukça gelişmiştir. Pişirme, kaynatma gibi yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen işlemlerde canlılıklarını koruyabilmeleriyle tahıl bazlı fonksiyonel ürünlerin geliştirilmelerinde ideal bir seçim oldukları belirtilmiştir. Ayrıca spor oluşumu ile gıdanın depolanması aşamalarında stabil bir hal kazanmaktadır (Fares ve ark, 2015).

2.6.1. *B. coagulans*'ın Probiyotik Özellikleri Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Palop ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* sporlarının ısı dirençlerinin pH değişiminden etkilenme miktarı araştırılmıştır. Homojenize edilmiş domates, kuşkonmaz ve buffer olmak üzere 3 farklı ortam kullanılarak, farklı pH'larda (4-7) ve geniş sıcaklık aralığındaki dirençleri tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, ortam bileşenlerinin ısı direncini etkilediği ve *B. coagulans* sporlarının ısı dirençlerinin asidik ortamda daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Hyronimus ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, 13 laktik asit bakterisinin (*B. coagulans* BCI₄, *B. coagulans*'ın CIP5264 ve CIP6625 suşları, *B. laevolacticus* DSM442, DSM6475, DSM6477, *B. racemilacticus* DSM445, DSM2309, *Sporolactobacillus inulinus* CIP103279, DSM30348, NCFB1839, *Sp. laevis* IAM12384 ve *Sp. racemicus* IAM12395) safra tuzuna ve asitlere dayanıklılığı araştırılmıştır. Çalışmada MRS broth besiyeri kullanılmış ve pH 2, 2.5 ve 3'e ayarlanmıştır. Ayrıca safra tuzu konsantrasyonu artırılarak

bakterilerin gelişmesi izlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *B. coagulans*'ın pH 3 olan ortama dayanıklı olmadığı fakat %0.3'ün üzerindeki safra tuzu konsantrasyonlarına dayanıklı olduğu belirtilmiştir.

Diyare, inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi birçok sindirim sistemi rahatsızlığının tedavisinde probiyotik bakterilerin iyileştirici etkileri üzerine yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Ringel ve ark, 2012).

Kalman ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir çalışmada 61 yetişkin üzerinde 29 gün boyunca GanedenBC30 kullanımının yemek sonrası sindirim sistemi rahatsızlıklarına karşı etkisi araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre GanedenBC30 kullanımının sindirim sistemi rahatsızlıkları özellikle de karın ağrısı ve tokluk dönemindeki şişkinliğin azaltılması üzerinde etki gösterdiği belirtilmiştir.

Kimmel ve arkadaşları (2010), tarafından yapılan bir çalışmada 28 gün boyunca günde 1 kapsül (500 milyon kob) olmak üzere *B. coagulans* GBI-30, 6086 (GanedenBC30) kullanımının yetişkinler için güvenli olduğu ve viral solunum yolu enfeksiyonlarına karşı etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Fitzpatrick ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları bir çalışmada, farelerin *B. coagulans* GBI-30, 6086 tüketimleri sonucunda *Clostridium difficile* kaynaklı kolit üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Benson ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları bir çalışmada, *B. coagulans* GBI-30 metabolitlerinin antijen sunan bağışıklık hücrelerinin olgunlaşma aşaması üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla log fazındaki bakteri kültürünün metabolitleri izole edilmiştir. Antijen sunan mononükleer fagosit kaynağı olarak insanlardan izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerinin hücre duvarı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *B. coagulans* GBI-30 metabolitlerinin immün sistemin karar vermesinde önemli rol oynayan antijen sunan hücrelerin daha olgun fenotipe sahip olanlarını aktifleştirerek olumlu etki sağladığı sonucuna varılmıştır.

Nyangale ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, yaşları 65-80 arasında değişen kişilerin günlük olarak *B. coagulans* GBI-30, 6086 tüketiminin immün sistemi ve bağırsak fonksiyonları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, günlük tüketim sonucunda bu yaş grubundaki kişilerde bağırsaklarda bulunan yararlı bakterilerin arttığı, anti-inflamatuar sitokin üretiminin arttığı ve immün sistemleri üzerinde olumlu etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, probiyotik tüketimi ile yaşlı insanların mikrobiyotalarının iyileştirilerek kalın bağırsaktaki bakteriyel bozulmanın (disbiyozis) düzeltilebildiği tespit edilmiştir.

Urgesi ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları bir çalışmada, hassas bağırsak sendromu olan kişilerin 4 hafta boyunca günde 3 kez *B. coagulans* tüketimi sonucunda sindirim sistemi mikrobiyotasının düzenlendiği, epitel fonksiyonlarının ve mukozal immünolojik bariyerin iyileştiği tespit edilmiştir.

McFarlin ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, 5 farklı probiyotik *Bacillus* (*B. indicus* (HU36), *B. subtilis* (HU58), *B. coagulans*, *B. licheniformis* ve *B. clausii*) karışımının 30 gün boyunca tüketimi ile sağlıklı kadın ve erkek deneklerde metabolik endotoksemi düzeyinin azaldığı, bunun da bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesi sayesinde gerçekleştiği bildirilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen bulgulara göre probiyotik tüketiminin geçirgen bağırsak sendromu semptomlarını azalttığı tespit edilmiştir.

Jäger ve arkadaşları (2018) tarafından yayınlanan bir derlemede, probiyotiklerin sindirim ve immün sistem üzerindeki etkilerine dikkat çekilmiş olup, sindirimin iyileşmesi ile birlikte gıdalarla birlikte alınan önemli besin maddelerinin daha iyi emileceği belirtilmiştir. Özellikle atletlerde yapılan yoğun egzersizlerle birlikte bağırsakların geçirgenliğinin artması, hızlı solunum nedeni ile patojenlere maruz kalmanın artması ve immün sistemin baskılanması gözlenmekte olup, probiyotiklerin kullanımıyla atletlerde üst solunum yolu enfeksiyonlarının ve sindirim sistemi rahatsızlıklarının azaldığı belirtilmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086'nın protein absorpsiyonunu ve kullanımını iyileştirdiği ve bu sayede kas

sağlığının geliştirilmesinde ve bitki proteinleri gibi protein kaynağının farklılıklarından kaynaklanan kalite sorunlarının önüne geçilebilmesinde kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Majeed ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* MTCC 5856 kullanımının hassas bağırsak sendromu olan kişilerde hastalık semptomları üzerine önemli etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Anaya-Loyola ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada 6-8 yaşlarında 10 çocuk üzerinde GanedenBC30 kullanımının üst solunum yolu enfeksiyonları ve sindirim sistemi enfeksiyonlarına etkisi araştırılmıştır. Katılımcıların 3 ay boyunca GanedenBC30 (10^9 kob) veya plasebo amaçlı maltodekstrin içeren şaseleri tüketmesi sağlanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre GanedenBC30'un üst solunum yolu enfeksiyonlarını ve sindirim sistemi rahatsızlıklarını etkili bir şekilde azalttığı tespit edilmiş olup bu sonucun GanedenBC30'un serum proteinleri (TNF α , CD163, G-CSF, ICAM-1, IL-6, IL-8, MCP-2, RAGE, uPAR ve PF4) üzerinde düzenleyici etki yapması sayesinde elde edildiği belirtilmiştir.

Arani ve arkadaşları (2019) yaptıkları bir çalışmada, *B. coagulans* T11 (IBRC-M10791) içeren probiyotik bal tüketiminin diyabetik nefropati hastalarında glisemik indeks, lipid profili, inflamasyonun biyolojik belirteçleri ve oksidatif stres üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Probiyotik balın 12 hafta tüketimi sonucunda kontrol örneğine kıyasla serum insulin değerlerinin ve değerlendirmeye dayalı insülin direncinin homeostaz modelinin önemli ölçüde düştüğü, kantitatif insülin duyarlılığı kontrol indeksinin önemli ölçüde iyileştiği, serum yüksek hassasiyetli C-reaktif proteini (hs-CRP) ve plazma malondialdehit (MDA) seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir. Probiyotik bal tüketiminin diğer metabolik profiller üzerinde önemli bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlarla birlikte 12 hafta süresince probiyotik bal tüketiminin diyabetik nefropati hastalarında insulin metabolizması, toplam/HDL kolesterol, serum hs-CRP ve plazma MDA seviyeleri üzerine yararlı etkileri olduğu rapor edilmiştir.

Maity ve Gupta (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* LBSC içeren probiyotik karışımı kullanımının akut diyare üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, *B. coagulans* LBSC kullanımının karın ağrısı ve rahatsızlıkları ile birlikte akut ishalden kurtulmada etkili olduğu ve yaşam kalitesini yükselttiği belirtilmiştir.

Shinde ve arkadaşları (2019a) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* MTCC 5856 sporlarının sindirim sisteminde canlı kalabilme, bağırsakta kolonize olabilme ve bağışıklık sistemini düzenleyici etkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır. Araştırma bulgularına göre, sporların sindirim sisteminde %92 oranında canlılıklarını korudukları, insan kolon hücreleri HT-29 ve LS174T'de kontrol olarak kullanılan *L. acidophilus*'a kıyasla önemli ölçüde kolonize olabildikleri ve bağışıklık sistemini düzenleyici etkileri olduğu tespit edilmiştir.

Shinde ve arkadaşları (2019b) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* MTCC 5856 sporları ve prebiyotik şeker kamışı lifi kullanılarak farelerde iltihaplı bağırsak hastalıkları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sinbiyotik karışımının yedi gün tüketiminden sonra, yedi gün boyunca içme suyuna kalın bağırsak iltihabı etkeni (kolit) karıştırılmış ve bu sırada sinbiyotik tüketimi de devam ettirilmiştir. Sinbiyotik takviyesinin, hastalık aktivite indeksini ve histolojik skoru probiyotik ya da prebiyotiğin tek başına kullanılmasından daha fazla iyileştirdiği belirtilmiştir. Sinbiyotik kullanımının aynı zamanda sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu önlediği ve değiştirilmiş serum IL-1 β , IL-10 ve C-reaktif proteini (CRP) seviyelerini düzenlediği, kısa zincirli yağ asitlerinin profillerini arttırdığı tespit edilmiştir.

Majeed ve arkadaşları (2020) tarafından yapılmış bir çalışmada, sporlu ve sporsuz probiyotik bakterilerin termal stabiliteleri ve sindirim sistemi koşullarına direnci araştırılmıştır. Çalışmada *B. coagulans* MTCC 5856, *B. coagulans* ATCC 31284, *B. subtilis* MTCC 441, *L. rhamnosus* NRRL B-442, *L. helveticus* NRRL B-734 ve *L. casei* ATCC 393 kullanılmıştır. *B. coagulans* MTCC 5856'nın sindirim

sistemi koşullarına oldukça dirençli olduğu ve enkapsülasyon uygulamasına ihtiyaç duymadan bağırsaklara ulaşabildiği belirtilmiştir.

Marzorati ve arkadaşları (2020) yaptıkları bir çalışmada, *B. coagulans* SC208 ve *B. subtilis* HU58 içeren probiyotik bir formülasyon olan MegaDuo™'nin bağırsak geçirgenliği ve bağışıklık üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, *in vitro* sindirim sistemi modeli, insan sindirim sistemi mikrobiyota simülatörü (M-SHIME) ve *in vitro* olarak hem sağlıklı hem de antibiyotik kaynaklı disbiyoz koşullarında inflamatuvar bağırsak hastalığı benzeri Caco-2/THP1 karışık kültür modeli kullanılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, MegaDuo™ uygulamasıyla bağırsak zarı bariyer hasarında önemli ölçüde azalma ve TNFα ve IL-6 seviyelerinde azalma olduğu belirtilmiştir.

Sasaki ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* SANK 70258'in ülseratif kolit hastaları tarafından tüketimi sağlanmıştır. Çalışmada, zararlı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiği saptanmıştır. Kontrol grubu olan sağlıklı kişilerde ise bağırsak mikrobiyotası üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. *Enterobacteriaceae* üzerinde inhibe edici etkisi olduğu belirtilmektedir.

Sui ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, yüksek laktaz üretim aktivitesine sahip olduğu bilinen *B. coagulans* T242'nin probiyotik ve fonksiyonel özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla bakterinin sindirim sistemi koşullarında canlı kalma kapasitesi, farklı safra tuzu içeren ortamlara direnci, insan bağırsak hücreleri olan HT-29 hücrelerine adhezyon özelliği ve bu hücrelere *E. coli* adhezyonunu engelleyebilme özelliği, antibiyotik direnç, kolesterolü asimile edebilme ve antioksidatif özellikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *B. coagulans* T242'nin sindirim sistemi koşullarında canlılığını koruduğu, HT-29 hücrelerine adhezyon yeteneğinin güçlü olduğu, *E. coli* gelişimini ve adhezyonunu engellediği test edilen çoğu antibiyotiğe duyarlı olduğu, kolesterolü asimile edebildiği, *L. rhamnosus* GG'ye göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak *B. coagulans* T242'nin iyi bir

probiyotik adayı olduğu, fakat güvenilirliği, probiyotik ve fonksiyonel özellikleri, sağlık üzerindeki potansiyel etkilerine odaklanması ve gıda endüstrisinde probiyotik olarak kullanımı konusunda daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir.

Xing ve arkadaşlarının (2020) yaptıkları bir çalışmada, tavukların *B. coagulans* R11 tüketimleri sonucunda etkileri gözlenmiştir. Sonuçlara göre yumurtlayan tavuklarda oksidatif zararları önlediği, patojen gelişimini inhibe ettiği, sindirim sistemi mikrobiyotasını düzenlediği tespit edilmiştir.

Meidong ve arkadaşları (2021) yaptıkları bir çalışmada, probiyotik *Bacillus* ve laktik asit bakterilerini yem katkısı olarak kullanarak balıklarda gelişim, immün sistem gelişimi ve hastalıklara karşı direnç üzerine etkisini araştırmıştır. Bu amaçla *B. siamensis* B44v, *Bacillus* sp. B51f ve *B. aerius* B81e, ve üç probiyotik laktik asit bakterisi *Streptococcus lutetiensis* L7c, *Lactiplantibacillus paraplantarum* (*Lactobacillus paraplantarum*) L34b-2 ve *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*) L42g kullanılarak etkileri kıyaslanmıştır. Bu bakterilerin *Aeromonas hydrophila* üzerinde *in vivo* olarak inhibe edici etki gösterdiği tespit edilmiştir. 30 günlük besleme sürecinin ardından *B. aerius* B81e ve *L. paraplantarum* L34b-2 bakterilerinin karışık kültür halinde kullanılmasının diğerlerine göre daha etkili olduğu tespit edilmiş olup, 60 günlük besleme sürecinin ardından balıkların kilolarında ve büyümelerinde artış gözlemlendiği, yem dönüşüm oranının önemli ölçüde arttığı, immün sistemin geliştiği ve hastalıklara karşı direncin de geliştiği belirtilmiştir.

2.6.2. *Bacillus coagulans*'ın Toksikolojik Özellikleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Endres ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans*'ın toksikolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanarak 7 toksikolojik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, bakteriyel ters mutasyon testi, kromozomal anormallik testi, mikronukleus testi, akut ve 90 günlük sub-kronik tekrarlamalı

toksosite testi, akut göz ve deri iritasyon testi yapılmıştır. Bu testler sonucunda *B. coagulans*'ın mutajenik, klastojenik (kromozom yapısını değiştirebilen) ya da genotoksik etki göstermediği, insan tüketimine uygun olduğu saptanmıştır.

Salvetti ve arkadaşları (2016) yaptıkları bir çalışmada, *B. coagulans* GBI-30, 6086'nın güvenilirliği açısından genom bazlı incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla virülans faktörü, antibiyotik direnci ve biyogenik amin gibi zararlı metabolitlerden sorumlu enzimlerin üretilmesini sağlayan genler araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bu suşun fenotipik olarak streptomisin ve kanamisine dirençli olduğu fakat yapılan genom analizlerine göre antibiyotik direnç ile ilişkili genlerin kolay olarak diğer bakterilere aktarılamadığı belirlenmiş ve güvenlik açısından potansiyel risk oluşturabilecek başka bir gen (Virülans faktörü veya biyogenik amin üretimi ile ilişkilendirilebilecek) tespit edilmemiştir.

Saroj ve Gupta (2020) yaptıkları bir çalışmada, *B. coagulans* LBSC (DSM 17654) güvenliğinin belirlenmesi amacıyla tüm genom sekanslaması yapılmıştır. Antibiyotik direnç genleri, biyogen amin üreten genler, virülans faktörü genleri ve diğer güvenlikle ilişkilendirilen genler gibi risk ile ilişkili sekanslar yatay gen aktarımına ve bunun işlevsizliğine odaklanılarak tanımlanmıştır. Genlerin çevresinde hareketli elementlerin bulunmamasının, geni transfer edilemez hale getirdiği ve toksik olmayan fenotipik özelliklerin, genlerin işlevsel olmadığını doğruladığı belirtilmiştir. İlgili genlerin olmaması ve klinik olarak önemli olmayan diğer genlerin yakınında hareketli elemanların olmadığının doğrulanması ile güvenlik endişesi taşımadığı tespit edilmiştir. Profaj sekanslarının olmaması ve CRISPR sisteminin varlığının genom stabilitesi açısından yararlı olduğu, bir bariyer gibi davranarak yabancı DNA elementlerinin girmesini engellediği belirtilmiş olup, bunun da genomun stabilitesini gösterdiği ifade edilmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan moleküler yaklaşım ile kullanılan probiyotik bakterinin potansiyel olarak güvenli olduğunu gösteren güvenlik değerlendirme gerekliliklerini karşıladığı belirtilmiştir.

Metlakunta ve Soman (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, 28 gün boyunca fareler tarafından *B. coagulans* SNZ 1969'un tüketimi incelenmiştir. Fareler üzerinde yapılan vücut ağırlıkları, gıda tüketimi, idrar tahlili, hematolojik analizler, klinik biyokimyasal ve diğer çeşitli analizler sonucunda *B. coagulans* SNZ 1969 tüketimine bağlı değişiklik gözlenmemiş olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada *B. coagulans* SNZ 1969'un patojen olmadığı ve insanlar tarafından probiyotik olarak tüketilebilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Kim ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, pirinç samanından izole edilen *B. coagulans* suşlarının toksin genlerinin tespiti amacıyla PCR ile hemolitik (NblA, NblC, NblD), hemolitik olmayan (NheA, NheB, NheC) ve enterotoksin T (BcET) üretimleri araştırılmış olup izolatların hiçbirinde bu enterotoksinlerin üretilmediği belirtilmiştir. Ayrıca kanlı agar kullanılarak hemolitik aktiviteleri de analiz edilmiş olup izolatlarda α - ve β -hemolitik aktivite görülmediği belirtilmiştir.

2.6.3. *Bacillus coagulans*'ın Antimikrobiyel Aktivitesi ve Antibiyotik Direnci ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Donskey ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada, fare sindirim sisteminde bulunan vankomisin dirençli enterokoklar üzerine *B. coagulans*'ın etkisini araştırmıştır. Farelerin 4 gün süresince oral olarak 10^7 kob/g konsantrasyonda *B. coagulans* tüketmesi sağlanmıştır. Sonuç olarak, *B. coagulans* tüketiminin her üç fareden birinde vankomisin dirençli enterokok kolonisinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

Abada (2008) tarafından yapılmış bir çalışmada, endüstriyel atık sularından izole edilen *B. coagulans* izolatlarının antimikrobiyel etkisinin belirlenmesi amacıyla agar difüzyon testi yapılmıştır. İzolatların *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Typhimurium* ve *C. albicans* üzerinde antimikrobiyel etkiye sahip olduğu, fakat *A. niger* üzerinde ise inhibe edici etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Elde edilen inhibe edici etkinin *B. coagulans*

tarafından üretilen bakteriyosinden kaynaklandığı ve bu bakteriyosinin asidik olmayan fermente gıdaların korunmasında kullanılabileceği belirtilmiştir.

Riazi ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, ticari bir ürün olan Lactospore'da bulunan *B. coagulans* ATCC 7050'nin antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi amacıyla agar kuyu difüzyon metodu kullanılmıştır. Test kültürü olarak *L. monocytogenes* Scott A, *E. coli* O157:H7 (ATCC 43859), *Salmonella* Enteritidis, *M. luteus*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* spp., MRSA, VRE kullanılmış olup içlerinden *M. luteus*, *Lactobacillus* 757, *Lactobacillus* 758, *G. vaginalis* ve *L. monocytogenes* üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu belirtilmiştir.

Abdül ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, fermente bir balık ürünü olan Ngari'den izole edilen *B. coagulans* sp., BDU3'ün antimikrobiyel özelliğinin belirlenmesi amacıyla çift tabaka agar metodu kullanılmıştır. Yapılan işlem sonucunda *B. cereus* MTCC 430, *S. aureus* MTCC 3160, *Enterococcus* sp. MTCC 9728, *Lactobacillus* sp. MTCC 10093, *M. luteus* MTCC 106 ve *Salmonella typhi* MTCC 733 üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu belirtilmiştir. *B. coagulans* BDU3 tarafından üretilen bakteriyosinin düşük molekül ağırlıklı bir antimikrobiyel peptit olmakla birlikte geniş spektrumlu antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Kim ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, pirinç samanından izole edilen *B. coagulans* suşlarının antibakteriyel aktiviteleri ve antibiyotik dirençleri belirlenmiştir. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde disk difüzyon metodu kullanılmış olup, 8 gıda kaynaklı patojen (*B. cereus* KCCM 11341, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *Alcaligenes xylosoxidans* KCCM 40240, *Flavobacterium* sp. KCCM 11374, *S. aureus* ATCC 12692, *E. coli* O157:H7 933, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 ve *Salmonella* Typhimurium KCCM 11862) seçilmiştir. *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium* üzerinde inhibe edici etki tespit edilememiş olup, kullanılan diğer patojen bakterilerin gelişiminin inhibe edildiği belirtilmiştir. Antibiyotik direncin belirlenmesi amacıyla MİK (Minimum

İnhibisyon Konsantrasyonu) yöntemi kullanılmış olup bütün *B. coagulans* izolatlarının ampicilin, kloramfenikol, klindamisin, eritromisin, gentamisin, streptomisin, tetrasiklin ve vankomisine duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Sharifi ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* IS2 bakteriyosinin antibakteriyel etkisi araştırılmış olup, bu amaçla agar kuyu difüzyon metodu ve test bakterileri olarak *E. coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* ATCC 8739 ve *L. monocytogenes* ATCC 19111 kullanılmıştır. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre bakteriyosinin test kültürleri üzerinde inhibe edici etkisi tespit edilmiş olup, bu çalışmanın *B. coagulans* IS2'den elde edilen bakteriyosinin antibakteriyel etkinliğini gösteren ilk çalışma olduğu belirtilmiştir.

2.7. Makarna

Makarna, Akdeniz diyetinde yer alan tahıl bazlı geleneksel bir üründür. Makarnaya olan ilgi, kolay hazırlanabilmesi, lezzetli olması ve besin kalitesi sayesinde, dünya çapında gün geçtikçe artmaktadır (Bustos ve ark, 2015). En çok tüketilen ürünler arasında ekmekten sonra yer almaktadır (Özgören ve Yapar, 2015). Düşük maliyet ve uzun raf ömrü gibi avantajların yanı sıra her yaştan ve her kesimden insanlar tarafından tüketilmesi sayesinde, fonksiyonel bileşenler ile zenginleştirilerek çeşitli tip ve orijinlerde üretimi uygun bir ürün olmaktadır (Bustos ve ark, 2015; Konuray ve Erginkaya, 2020). Düzgün silindirik şeklinin matematiksel modellemesinin kolay olmasından dolayı spagetti en çok çalışılan makarna türü olmuştur (Del Nobile ve ark, 2005). Ayrıca FDA tarafından besleyici bileşenlerin tüketiminde kullanılabilecek iyi bir taşıyıcı olabileceği belirtilmiştir (Nilusha ve ark, 2019).

Durum buğdayı (*Triticum durum*) irmiğinin gluteni monomerik gliadin ve polimerik gluteninden oluşmaktadır. Gluten proteinlerinin ağ oluşturma özellikleri makarna kalitesini belirleyen en önemli faktördür (Dizlek ve ark, 2013; Bruneel ve ark, 2016; Dizlek ve Ozer, 2016). Durum buğdayının temel bileşenleri nişasta

(%74-76) ve proteinlerdir (%12-15) (Carpentieri ve ark, 2022). Durum buğdayı geleneksel olarak makarna üretimine uygun olan tek buğday tipi olarak kabul edilmiştir. Diğer yandan, makarna %100 durum buğdayından yapılmamakta olup, ekmek üretiminde kullanılan yüksek protein ve elastik gluten içeren buğday da makarna üretiminde kullanılabilmektedir (Heneen ve Brismar, 2003; Bustos ve ark, 2011a). Her iki buğday tipi ile yapılan makarna arasındaki farkların görünüş ve tekstür özellikleriyle kolay bir şekilde ayırt edilebildiği belirtilmiştir (Fu ve ark, 2006). Durum buğdayından elde edilen makarnanın yoğun ve sıkı tekstüre sahip olup sarı renkli olduğu, ekmeklik buğdaydan elde edilen makarnanın ise genellikle yumuşak ve daha elastik bir yapıya sahip olup çok açık sarı renkli olduğu belirtilmiştir (Bustos ve ark, 2015). Bu iki makarna arasındaki renk farkı, durum buğdayında bulunan yüksek miktardaki karotenoidlerden kaynaklanmaktadır. Görünüş açısından makarna için önemli bir parametre olmasının yanı sıra, karotenoidlerin sağlık üzerine de önemli etkileri bulunmaktadır (Ficco ve ark, 2014).

Geleneksel makarna üretiminde, buğday unu ya da ırmik kullanımının yanı sıra su da kullanılmaktadır. Su, mekanik ve termal enerji gibi buğday yapısını, kısmen de nişasta ve proteinleri modifiye etmekte ve son ürünün kalitesi üzerinde önemli rol oynamaktadır (Bustos ve ark, 2015).

Optimum özelliklere sahip bir makarna üretimi için üretimde kullanılan suyun spesifik fiziksel ve kimyasal bazı özelliklere sahip olması istenmektedir. Kimyasal madde, demir tuzları, bakteriyel kontaminasyon ve kötü koku barındırmaması, pH, mineral içeriği ve sıcaklığının iyi ayarlanmış olması gerekmektedir (Carpentieri ve ark, 2022). Hamur karakteristikleri üretim prosesinin etkinliğini belirlemektedir. Bu da hidrasyon ve gluten gelişiminin daha sonraki aşamalarda kurutma, şekil verme gibi tüm üretim proseslerine uygun olması gerektiğini göstermektedir. Makarna üretim aşamalarındaki değişkenler, hamurun makarna kalitesini belirleyen kohezyon ve elastikiyet özelliklerini değiştirmeme veya bozmama ihtiyacına göre tanımlanmaktadır (Bustos ve ark, 2015).

Makarna üretimi farklı aşamalardan oluşmaktadır. Durum buğdayından elde edilen irmik su ile karıştırılmakta ve ekstrüzyon aşamasında sıkıştırılarak bir kalıptan sert bir hamur halinde çıkarılmaktadır. Daha sonra hamur kesilmekte ve son nem içeriği %12.5'i geçmeyecek şekilde kurutulmaktadır (Icard-Vernière ve Feillet, 1999).

Makarna yapım işleminin başlangıcında homojenliği sağlamak ve irmik partiküllerinin merkez kısmına difüze olarak bir hamur oluşturulmasını sağlamak amacıyla, irmik su ile karıştırılmakta ve ufalanan hamur formu oluşturulmaktadır. Su eklemekteki amaç, buğday proteinlerinin şekil verilebilecek yapıya gelmesidir. Karıştırma sırasında hidrasyonun %29-32 değerleri arasında olması gerekmektedir. Dolayısıyla ekmek hamuru gibi viskoelastik bir yapıya sahip olmamaktadır. Daha düşük bir su içeriği irmik partiküllerinin yeterli miktarda hidrasyonunu sağlayamamakta ve hamurun gelişmemesine neden olmaktadır. Daha yüksek miktarlar ise ekstrüzyon aşamasında güçlüğe yol açabilmektedir (Zweifel ve ark, 2003; Petitot ve ark, 2009a; Bruneel ve ark, 2016). İrmik hidrasyonu, hamur oluşumundan önce bileşenlerinin moleküler hareketliliğini, bu sayede proteinlerin biyokimyasal modifikasyonlarını ve bileşenlerin etkileşimlerini sağlamaktadır (Bustos ve ark, 2015). Karıştırma aşamasında gluten fonksiyonları başlamakta, gluten proteinleri (gliadin ve glutenin) arasındaki etkileşim hamurun viskoelastik özelliklerini kazandırmaktadır (Jazaeri ve ark, 2015). Karıştırma ve yoğurma aşamalarında oksijen miktarının arttığı ve karotenoid oksidasyonu ile birlikte makarnanın renginin açıldığı belirtilmektedir (Borrelli ve ark, 2003; Fu ve ark, 2013). Lipoksigenazın, karotenoid degradasyonuna neden olan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu sağlayan ana faktörlerden biri olduğu belirtilmiştir (Ficco ve ark, 2014). Karıştırma aşamasının hamur gelişimini ve teknolojik özelliklerini yüksek miktarda etkilediği belirtilmiştir. Karıştırma işleminin olması gerekenden daha uzun süre yapılması, gluten ağında bulunan protein bağlarının kırılmasına ve hamurun yapışkan bir hale gelmesine yol açmaktadır (Carpentieri ve ark, 2022).

Karıştırmadan sonraki aşamada ekstrüzyon işlemi bulunmaktadır. Ekstrüzyon sırasında hamur yüksek basınçla karıştırılmakta ve yoğurulurarak bir kalıp aracılığıyla makarnanın son şekli verilmektedir. Basınç ve sürtünmenin etkisiyle oluşan sıcaklığın kontrol altında tutulması gerektiği belirtilmektedir. Ekstrüzyon sırasında proteinler güçlü bir şekilde etkileşime geçerek son ürünün pişme özelliklerini belirleyecek olan gluteni oluşturmaktadır. Makarna üretimi sırasında ekstrüzyon parametrelerinin ve kimyasal değişimlerin etkileri üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır (Bustos ve ark, 2015). Ayrıca ekstrüzyonda kullanılan materyalin de makarna yüzey özelliklerini etkilediği belirtilmiştir. Günümüzde en çok teflon veya bronzdan üretilen ürünler kullanılmaktadır. Düşük sürtünme katsayısına sahip olan ve böylece ekstrüzyon için gereken basıncı azaltan ve ekstrüde makarna oranını artıran teflon kalıplar, parlak sarı görünümlü pürüzsüz makarna ile sonuçlanmaktadır. Aksine, bronz kalıpların kullanımı sonucunda pürüzlü, düzensiz ve gözenekli bir makarna üretildiği belirtilmiştir (Boukid, 2021).

Ekstrüzyon aşamasından sonra stabil bir ürün elde edebilmek amacıyla makarnanın nem miktarı %30'dan %12.5 civarlarına düşürülmekte ve ürün lastiğimsi halden camsı hale geçmektedir (Zweifel ve ark, 2003). Kurutma prosesi ön kurutma, son kurutma ve soğutma aşamaları olmak üzere 3 kısma ayrılabilir. Ön kurutma aşamasının amacının, makarnanın birbirine yapışmasının önlenerek, istenilen makarna şeklinin kurutma işlemi boyunca korunması olduğu belirtilmiştir. Son kurutma aşamasına giren örneğin nem içeriğinin %18-21 olduğu belirtilmiştir. Bu aşamada örnekten uzaklaşan nem miktarı, ürünün elastik yapısı üzerinde önemli etkiye sahip olmaktadır. Eğer kurutma işlemi çok hızlı gerçekleştirilirse yüzeysel gerilim ve nemin eşit olarak dağılmaması nedeniyle makarna yüzeyinde çatlama ve kırılmaların meydana gelebileceği, bunları en aza indirmek amacıyla da kurutma aşamasında buhar enjeksiyonu yapılabileceği belirtilmiştir (Baiano ve ark, 2019). Kurutma aşaması, yüksek kalitede makarna ürünlerinin üretimi için oldukça önemli bir süreçtir ve bu sayede mikroorganizmaların gelişimi ve çeşitli enzimatik aktiviteler engellenmiş

olmaktadır. Nem, hava akışı ve sıcaklığın dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir. Makarna kurutma işlemi ilk başta düşük sıcaklık (40-50°C) ile başlamakta, sonra bazı endüstriyel sistemlerdeki yeni teknolojiler ile yüksek sıcaklıkta kurutma da yapılabilmektedir (60-90°C). Son yıllarda yüksek sıcaklık (>90°C) ve kısa sürede kurutma yapabilen sistemler ile makarnaların pişme özellikleri (yüksek sertlik, düşük pişme kaybı ve düşük yapışkanlık) iyileştirilebilmektedir. Makarna kurutma aşamalarının makarna karakteristiklerini nasıl etkilediğine dair yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır (Baiano ve ark, 2006; Petitot ve ark, 2009a; Bustos ve ark, 2015). Sonuçlara göre, düşük sıcaklıkta kurutma yapılan makarnalarda son ürün kalitesi ham maddedeki protein kalitesi ve miktarından etkilenmekte, yüksek sıcaklıkta yapılan kurutma işleminde ise sadece proteinlerin miktarı önemli rol oynamaktadır. Buna ek olarak, modern yüksek sıcaklıkta kurutma sistemleri tekstürün yanı sıra Mailllard reaksiyonu sayesinde sarılık (b*) ve kırmızılık (a*) değerlerini arttırarak makarna rengini de iyileştirmektedir (Acquistucci, 2000). Pişme aşamasında nişasta jelatinize olurken, proteinler de koagüle olarak tipik makarna tekstürünü oluşturmaktadırlar (Cunin ve ark, 1995).

2.7.1. Makarnanın Kalite Karakteristikleri

Makarnaların renk, pişme kalitesi özellikleri, tekstür ve tat gibi makarna karakteristikleri tüketici tercihini etkileyen, dolayısıyla durum buğdayı üreticileri ve işleyicileri için büyük önem taşıyan ve ürün kalitesini etkileyen en önemli özelliklerdendir. Ürünün kuru haldeki satın alma aşamasında tüketiciye hitap etmesinin yanı sıra pişmiş makarna “al dente” kalitesinde olmalı ve iyi bir sarı renge sahip, düzgün yüzeyli, sıkı ve dayanıklı yapıda olmalı gibi tüketici kriterlerini sağlamalıdır. Ayrıca uygulanabilecek fazla pişme süresini tolere edebilmeli, en az seviyede pişme kaybına uğramalı ve hoş bir aroma bırakmalıdır (Güler ve ark, 2002; Martinez ve ark, 2007).

İyi kalitedeki makarnanın en önemli özelliklerinden biri makarnanın karakteristik sarı rengidir. Bu da yüksek karotenoid içeriğine sahip durum buğdayından elde edilen irmik kullanılarak kolaylıkla elde edilebilir. Kehribar veya altın rengi en çok tercih edilendir (Bustos ve ark, 2015). İstenmeyen makarna rengi olarak kahverengi ve bazı kurutma koşulları altında kırmızı renk oluşumu da gözlenebilmektedir. Makarna parlaklığı (L^*), örneklerden yansıyan ışığın bir göstergesi olup, kahverengilik 100-L şeklinde ifade edilmektedir. Kahverengi makarna düşük L değeri ile ifade edilmektedir (Feillet ve ark, 2000). Bu rengi belirleyen pigmentlerin ölçümü için 3 farklı yol bulunmaktadır: standart numunelerle görsel kıyaslama, solvent ekstraksiyonunun ardından kolorimetri ve ışık yansıması ölçümü. Uluslararası Aydınlatma Komisyonu'nun L^* , a^* , b^* sistemi baz alınarak kullanılan ışık yansıması yöntemi makarna örneklerinin renk ölçümlerinde temel yöntem olarak kabul edilmektedir. Makarna üretiminde kullanılan her bileşen veya çıkarılan her bileşen son ürünün rengi üzerinde değişikliğe yol açmaktadır. (Svec ve ark, 2008). Makarnada bulunan protein ve kül içeriği arttıkça ürün parlaklığının azaldığı bilinmekte olup bu değerler arasındaki ilişki bilinmemektedir. Endosperm, irmiğin saflık derecesi ve makarna yüksek sıcaklıkta kurutulduğunda gerçekleşen Maillard reaksiyonu makarna renginde kahverengileşmeye neden olmaktadır. Suda çözünebilir bakır proteini ve/veya tanenin olgunlaştırılması sırasında oksidatif enzimlerin aktivitesi nedeniyle irmiklerin doğasında kahverengilik olabilmektedir (Feillet ve ark, 2000).

Optimum pişme süresi, su absorpsiyon miktarı, pişmiş ürünün tekstür özellikleri ve parçalanma derecesi, yapışkanlık, aroma ve lezzet gibi pişme kalitesi özellikleri tüketici tercihini etkileyen faktörler olmakla birlikte ürünün mikro yapısı hakkında bilgi vermektedir. Makarnanın bu özellikleri, jelatinizasyon oranı ve kimyasal kompozisyonu ile ilişkilendirilmektedir (Tudorica, ve ark, 2002; Bustos ve ark, 2015). Makarnanın pişme kalitesinin üretim prosesinin optimize edilmesiyle iyileştirilebileceği belirtilmiştir. Bunun için ilk adım pişirme ya da aşırı pişirme sırasında fiziksel ve kimyasal modifikasyonların analiz edilmesi ve

bunların ham madde özellikleri ve proses değişkenleri (ekstrüzyon, kurutma koşulları) ile ilişkilendirilmesidir (Del Nobile ve ark, 2005).

Makarna piştiği zaman iki alan kolay bir şekilde ayırt edilebilir. Bunlar, yüzeyde şişmiş bir bölge ve nüfuz edilmemiş merkezdeki çekirdek bölgesidir. Optimum pişme süresine ulaşıldığında (Al-dente kıvamında) çekirdek bölgesi kaybolmaktadır (Cunin ve ark, 1995; Bustos ve ark, 2015). Makarnanın pişme süresi, ürünün kimyasal kompozisyonunu, kalori ve besinsel değerini etkilemektedir (Sobota ve Zarzycki, 2013).

Aşırı pişirmeye karşı direnç de makarnalar için önemli bir özelliktir ve bu amaçla örneklerin dış görünüşünde çatlaklar, noktalar veya pürüzlülük oluşumları dikkate alınmaktadır. Hacim artışı makarna yapısının yoğunluğuna bağlı olup, düşük yoğunluklu bir üründe nişastanın su absorpsiyonunda artış olacağından, örnek yüksek hacime sahip olmaktadır. Hacimdeki artış yüksek miktarda nişasta jelatinizasyonu sebebiyle su absorpsiyonundan kaynaklanmaktadır (Bustos ve ark, 2015).

Makarnadan pişme suyuna geçen maddeler pişme kaybı parametresini oluşturmaktadır. Pişme kaybı değeri genellikle makarnanın pişme performansını belirleme amacıyla kullanılmaktadır. %8 pişme kaybı iyi bir kalite için sınır değer olarak kabul edilmektedir (Bustos ve ark, 2015). Aşırı pişirme ile makarnadan suya geçen madde miktarı artmakta ve belirli bileşenlerin kuru madde içindeki yüzde payında değişikliklere neden olabilmektedir (Sobota ve Zarzycki, 2013). Pişme kayıplarının ana bileşeninin amiloz olduğu belirtilmektedir. Güçlü bir protein-nişasta matriksi, pişme sırasında amilozun pişme suyuna geçmesini önleyebilmektedir. Bu nedenle protein-nişasta matriksinin bütünlüğünün belirlenmesinin önemli bir kalite parametresi olduğu belirtilmektedir (Bustos ve ark, 2011b). Pişme prosesinde zayıf veya süreksiz protein matriksi, nişasta granüllerinin jelatinizasyonu sırasında yüksek miktarda dışarı sızmaya izin verebilecek zayıf bir protein ağına neden olmaktadır. Dışarı sızan maddeler

sebebiyle nişasta yüzeyde birikmekte ve makarna yapışkan bir hal almakta, makarna telleri de kümeleşmeye eğilimli olmaktadır (Güler ve ark, 2002).

Yapışkanlık önemli bir tekstür değeri olup genellikle ürünün kabul edilebilirliğini belirlemektedir. Yüksek miktarda amilozun pişme suyuna geçmesi, yüksek miktarda amilopektinin makarna yüzeyinde kalması anlamına geleceğinden pişme kayıpları yapışkanlık değeri ile yakın olarak ilişkilendirilmektedir (Bustos ve ark, 2015). Pişme kalitesindeki değişimler irmikte bulunan protein miktarına ve kısmen de bu proteinlerin kalite gibi karakteristiklerine bağlıdır. Genel olarak, protein içeriğinin kaliteyi etkileyen ana faktör olduğu, gluten kuvvetinin ise ikinci faktör olduğu kabul edilmektedir. Gluten proteini dışında diğer bileşenler de (nişasta ve enzimler gibi) pişme kalitesi üzerinde önemli rol oynamaktadır (Güler ve ark, 2002).

Makarnanın su absorpsiyonu özelliğine bakıldığında, pişmiş makarna tarafından absorbe edilen su miktarı, nişastanın şişmesiyle ve jelatinizasyonla ilişkilendirilmektedir. Kuru makarna gramı başına absorbe edilen su miktarı (şişme indeksi) suyun girmesini engelleyen protein matriksinin bütünlüğünü göstermektedir (Tudorica ve ark, 2002). Bozulmuş bir gluten ağı, granüllerin daha çok su absorbe etmesine ve jelatinizasyona neden olmaktadır. Bu nedenle pişme ağırlığında ve şişme indeksinde artışın önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir. Kabul edilebilir makarna kalitesi açısından su absorpsiyonu miktarı 150-200 g su/100 g makarna, şişme indeksi ise yaklaşık olarak 1.8 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin belirlenmesinde, makarnaya ekstra olarak ilave edilen ve her iki parametreyi de etkileyebilecek bileşenlerin göz önünde bulundurulduğu belirtilmiştir (Bustos ve ark, 2015).

Makarnanın tekstür özelliklerini belirleyebilmek için kullanılan iki ana parametre sertlik ve yapışkanlık olarak kabul edilmiştir. Pişmiş örneklerin analizinde TPA'nın (Tekstür Profil Analizi) en sık kullanılan metot olduğu bildirilmiştir. Kırılganlık değerinin de kuru makarna örneklerinde ölçülebildiği belirtilmiştir. Tipik bir TPA analizinde öncelikle makarna örnekleri sıkıştırılmakta,

ardından tekrar ilk haline gelmekte ve son aşamada tüm döngü 2. kez tekrarlanmaktadır. Bu işlemde çiğneme hareketini taklit edebilmek amaçlanmaktadır (Bustos ve ark, 2015).

Makarna tekstürü büyük ölçüde makarnanın kabul edilebilirliğini, özellikle de gluten fraksiyonları ile belirlenen sertlik değerini tanımlamaktadır. İşlem sırasında gelişen gluten miktarı ne kadar fazla olursa makarna üretmek için gereken kuvvet o kadar yüksek olmaktadır. Protein matriksinin bütünlüğü de sertlik değerini belirlemektedir (Sung ve Stone, 2005). Makarna sertlik değeri, ilk sıkıştırma sırasında alınan pik değeri ile belirlenmekte ve bu değer protein matriksinin gücü ile ilişkilendirilmektedir. Yapışkanlık değeri iki döngü arasındaki negatif kuvvet ile ölçülmekte ve pişme suyuna geçen amiloz miktarı ile ilişkilendirilmektedir. İç yapışkanlık (cohesiveness) değeri ikinci tepe noktası altındaki alanın birinci tepe noktası altındaki alana oranı şeklinde ifade edilmekte olup sıkıştırıcı kuvveti içermekte ve sıkıştırmayı azaltıcı (basınç azaltıcı) kuvveti içermemektedir. Elastikiyet deforme olmuş örneğin üzerindeki kuvvet kaldırıldıktan sonra deforme olmamış haline dönme oranı olarak ifade edilmekte ve ikinci pikin ilk yarısının ilk pikin ilk yarısına oranı şeklinde hesaplanmaktadır. Çiğnenebilirlik değeri protein matriksinin elastik kuvveti ile ilişkilendirilmekte olup sertlik, iç yapışkanlık ve elastikiyet ürünü olarak tanımlanmaktadır. Pişme süresi arttıkça yapının yumuşaması ve nişastanın pişme suyuna geçmesi sebebiyle çiğnenebilirlik değeri azalmaktadır (Bustos ve ark, 2015).

Makarnanın yüksek sıcaklıklarda kurutulması, proteinlerde denatürizasyona neden olmakta ve nişastanın şişmesini geciktirmektedir. Bu durum da düşük yapışkanlık ile sonuçlanmaktadır. Sertlik genellikle gluten oluşumu ile ilişkilendirilirken, yapışkanlık ise nişasta jelatinizasyonu ile ilişkilendirilmektedir. İki değer de birbiri ile yakından ilişkili olduğunu vurgulamanın önemli olduğu belirtilmiştir (Bustos ve ark, 2015).

İstenmeyen bir özellik olan yapışkanlık, pişmiş makarnanın süzülmesi ile absorbe edilmeyen su miktarı ile ilişkilendirilmekte ve jelatinize nişasta

moleküllerinden sızan amiloz miktarı ile değişmektedir. Yapışkanlığın, makarnanın protein içeriğinden önemli miktarda etkilenmediği, pişme suyunun sertliğinin artması durumunda (CaCO_3 varlığında) ise arttığı belirtilmiştir (Del Nobile ve ark, 2005).

Makarna duyuusal analizlerinin de diğer gıdalar gibi standardize edilmesi gerekmektedir. En yaygın olanı, hedonik skala ile yapılan değerlendirmedir. Tüketiciler 1'den 9'a kadar kaliteyle doğru orantılı olarak artan puanlar vermektedir. Makarna örneklerinde değerlendirilen başlıca duyuusal karakteristikler: yapışkanlık, yüzey şişmesi, ısırma anındaki sertlik/elastiklik ve renktir. Sertlik, azı dişleriyle makarnayı kesmek için uygulanan kuvveti ifade etmektedir. Buna ek olarak, yapışkanlık, örneği dil, diş ve/veya parmaklardan ayırmak için uygulanan kuvveti ifade etmektedir (Bustos ve ark, 2015).

Genellikle iyi kalitedeki makarnaların kalitesi ortalama optimum pişme süresi, düşük pişme kaybı, su absorpsiyonu ve şişme indeksi, ortalama hacim artışı, yüksek sertlik ve çiğnenebilirlik ama düşük yapışkanlık ile ifade edilmektedir. Bu özellikler, nişasta şişmesini sınırlayan ve ürünün merkezine su difüzyonunu zorlaştıran, dayanıklı ve süresiz olmayan bir protein matriksine sahip makarnadan kaynaklanmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, yüzeyde daha az amilopektin bulunan yapıda daha yüksek bir amiloz tutulması gerçekleşir, böylece düşük pişme kayıpları ve yapışkanlık gözlemlenmektedir (Bustos ve ark, 2015).

2.7.2. Makarnanın Yapısal Karakteristikleri

Makarnanın işlenmesi ve pişirilmesi aşamaları sırasında nişasta ve proteinler ve bunların birbiri ile olan etkileşimleri kaliteyi belirlemektedir. İyi pişme kalitesine sahip ve kabul edilebilir tekstür özellikleri olan makarnanın üretimi için işleme sırasında iyi elastiklik ve uzayabilirlik özelliklerine sahip olan protein ağının gelişiminin önemli olduğu belirtilmiştir (Fu, 2008; Petitot ve ark, 2009a).

İyi kalitede makarna niteliklerini sağlamak için gluten proteinleri tarafından üretilen hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimlerle stabilize edilmiş kompakt ve çapraz bağlı bir yapı gerekmektedir. Karıştırma aşamasında buğday unu veya irmiğe su ilave edilmesi ile proteinler açık bir yapıya sahip olmaktadır. Böylece hidrasyon ve şişme gerçekleşmekte ve yapıyı oluşturan bağlar zayıflamaktadır (Icard-Vernière ve Feillet, 1999).

Karıştırma aşamasından sonra un partikülleri hidrate olmasına rağmen, gluten matriksi yeterince gelişmemiş, bölgesel ve süreksizdir. Tipik makarna yapım işlemi sırasında protein matriksinin maksimum gelişimi, yetersiz su miktarı ve karıştırma enerjisinin düşük olması sebebiyle ekmek hamurundaki gibi gelişmiş bir gluten ağı oluşmamış olmasına rağmen, gerekli enerjinin hamura uygulandığı ekstrüzyon işlemi sırasında gerçekleşmektedir (Cunin ve ark, 1995; Bustos ve ark, 2015). Nişasta granülleri karıştırma ve ekstrüzyon aşamalarının sonunda dağınmış protein matriksi içinde tutuklu halde kalmaktadır. Makarnanın asıl bileşeni granül haldeki nişasta olmasına rağmen, prosesin bu aşamasında ağ oluşturma yeteneğine sahip değildir. Hasarlı nişastanın sınırlı kısmı, hem amiloz hem de yüksek düzeyde su alan amilopektin içermekte ve birbirine dolanarak geçici bir ağ oluşturabilmektedir (Bruneel ve ark, 2010).

Makarnanın kurutulması aşamasında yüksek sıcaklık kullanımının son ürünün yüksek sertliğe, düşük yapışkanlığa yüksek pişme kalitesine ve daha iyi renk özelliklerine sahip olmasını sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca yüksek veya çok yüksek sıcaklıklarda kurutma işleminin toplam mikroorganizma yükünde azalma ve düşük kurutma zamanı gibi olumlu yanlarının bulunduğu belirtilmiştir. Bu aşamada gözle görünür çatlakları ve kusurları engellemek amacıyla makarnanın hacim ve nem içeriğinin tekdüze ve homojen bir şekilde azaltılması gerekmektedir. Makarnanın kurutulma aşamasında protein filmleri pekişmiş olmaktadır – bunun 3 sebebi olduğu öngörülmüştür: proteinlerin denatürilizasyonu, polimerizasyonu ve agregasyonu. Günümüzde çoğu makarna üreticisinin yüksek ve çok yüksek

sıcaklıklarda kurutma işlemini tercih ettiği belirtilmiştir (Güler ve ark, 2002; Petitot ve ark, 2009a; Bustos ve ark, 2015).

Pişme sırasında, makarna yüzeyindeki çatlaklardan geçen su protein matriksi ile nüfuz etmektedir (Cunin ve ark, 1995). Bunun sonucu olarak, makarna yüzeyi pürüzsüz olmakta, proteinler hidrate olarak hacim artışı gerçekleştirilmekte ve daha fazla kırılmayla sonuçlanan gerilmeler meydana gelmektedir. Protein matriksi tarafından absorbe edilen su, jelatinizasyon sırasında yüzeyden makarnanın merkezine doğru bir yayılım oluşturmaktadır. Matriks yapısında meydana gelen bu değişiklikler su nüfuzunu desteklemekte ve bu da makarnanın yumuşamasıyla sonuçlanmaktadır. Bütün bu öngörüler, su ve katı maddelerin pişme sırasında yer değişimini sağlayan lifli bir ağ ve makarnanın iç yapısına petek görünümü veren şişmiş granül kalıntıları içeren karmaşık ve gözenekli bir yapı oluşturmaktadır (Bustos ve ark, 2015).

2.7.3. Makarna ile İlgili Yapılmış Bazı Çalışmalar

Güler ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları bir çalışmada, endüstriyel kurutma işleminde kullanılan sıcaklığın makarnanın nişasta özellikleri ve kalitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Burgu makarna üretimi gerçekleştirilerek yüksek ve çok yüksek sıcaklıklarda kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Nişasta özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Rapid Visco Analyzer (RVA), diferansiyel taramalı kalorimetre, X-ışını difraktometresi ve polarize ışık mikroskobu kullanılmıştır. Pişme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla pişme kaybı, pişirmeden sonra yıkama suyuna geçen toplam organik madde miktarı (TOM) belirlenmiş ve duyu analizi yapılmıştır. Çok yüksek sıcaklıkta kurutulan makarnaların içerdiği nişastanın RVA’da elde edilen pik değerinin diğer örneklere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıkta kurutulan makarnaların jelatinizasyon entalpisi ve pik sıcaklığının çok yüksek sıcaklıkta kurutulan makarnalara göre önemli oranda düşük olduğu tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıkta kurutulan makarnaların TOM ve pişme kaybı değerlerinin ve duyu analizi sonuçlarının çok yüksek sıcaklıkta kurutulan

makarnalara göre düşük kalitede olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, yüksek ve çok yüksek sıcaklıkta kurutma sırasında nişastada gerçekleşen değişikliklerin makarnanın pişme kalitesini etkileyebileceği sonucuna varılmıştır.

Cunningham ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan bir çalışmada makarnanın pişme sırasındaki su absorpsiyonu incelenmiştir. Tipik rehidrasyon eğrilerinin absorbe edilen su ile artış gösterdiği ve başlangıçta hızlı olan su absorpsiyonunun daha sonra yavaşladığı belirtilmiştir. Doyma noktasındaki nem içeriğinin ham maddenin nem içeriğine ulaşamadığı tespit edilmiş olup bu durumun da kurutma prosesinin geri döndürülemez bir işlem olduğunun göstergesi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca su absorpsiyon oranının örneğin içinde bulunduğu suyun sıcaklığına bağlı olduğu ve sıcaklıkla doğru orantılı olduğu bildirilmiştir.

Petitot ve arkadaşları (2009b) tarafından yapılan bir çalışmada, kurutmanın makarna yapısı, nişasta ve protein sindirilebilirliği ve potansiyel alerjenitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Düşük (55°C), yüksek (70°C) ve çok yüksek (90°C) sıcaklık uygulanarak yapılan kurutma işlemleri yapılmıştır. Kuru ve pişmiş makarna örneklerindeki değişimler protein çözünürlüğü, nişastanın termal özellikleri ve mikroskopik ve reolojik ölçümler ile belirlenmiştir. 70°C'ye kadar olan sıcaklıklarda gerçekleşen değişimler orta derecede olup daha yüksek sıcaklıklardaki kurutma işlemlerinde değişimler de artmıştır. Kurutma sıcaklıklarından hiçbirinin makarnanın alerjenitesi üzerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Çok yüksek sıcaklık uygulamasının, özellikle de düşük nem içeriğine sahip makarnalar üzerinde düşük protein ve nişasta hidrolizi üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu farkın, mikroskopik değil moleküler seviyede gözlemlendiği belirtilmiştir.

Petitot ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, durum buğdayından elde edilen irmiğe ek olarak baklagil (bezelye veya bakla) unları kullanılarak besin değeri zenginleştirilmiş makarna üretimi yapılmıştır. Makarna üretiminde partiküllerin topaklaşmasını önlemek amacıyla daha yüksek seviyede su

kullanımı ve daha yüksek hızda karıştırma uygulanmıştır. Baklagil unlarının ilavesi bazı makarna kalite karakteristiklerinde düşüşe yol açmıştır. Gluten içermeyen proteinlerin ve çözünmeyen liflerin makarnanın genel yapısını zayıflatmasına yol açtığı belirtilmiştir. Örneklerin duysal özelliklerinde iyileşme olduğu tespit edilmiştir. Düşük pişme kaybı gibi bazı kalite karakteristikleri, kurutma sırasında yüksek ve çok yüksek sıcaklıkların uygulanmasıyla elde edilmiş olup, protein ağıının gücünü gösterdiği belirtilmiştir. Paneslistler tarafından ise, bu uygulamaların aşırı sert ve lastiğimsi makarna üretimi ile sonuçlandığı belirtilmiştir.

Arena ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotik makarna üretiminde arpadan elde edilen β -glukan kullanımının, probiyotik bakterilerin *in vitro* sindirim sistemi koşullarında gelişimi üzerinde iyileştirici etkiye sahip olduğu, *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*) üzerinde ise seçici etkisi olduğu belirtilmiştir.

Fares ve arkadaşları (2015) yaptıkları bir çalışmada, fonksiyonel bir makarna üretmek amacıyla arpa β -glukanı ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 ilavesiyle zenginleştirilmiş makarna üretimi gerçekleştirilmiştir. Son ürünün kalitesinin değerlendirilmesi amacıyla kimyasal, besinsel ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. İlave edilen ham maddelerin makarnanın pişme özellikleri ve besinsel kalitesi üzerinde olumlu etkisi olduğu tespit edilmiştir. Probiyotik kültürün makarna üretim ve pişme prosesleri süresince canlılığını koruduğu belirtilmiştir. Canlılığını koruyan probiyotik kültür konsantrasyonunun (9 log kob/100 g) tüketici sağlığı üzerinde olumlu etkileri elde edebilmek için yeterli olduğu tespit edilmiştir. 7 dk pişirmenin ardından makarnanın özelliklerinin tatmin edici olduğu, *B. coagulans* ve β -glukanın makarnanın glisemik indeksini etkilemediği tespit edilmiştir. Bu çalışmada üretilen fonksiyonel makarnanın besin değeri ve sağlık üzerinde göstereceği düşünülen yararlı özellikleriyle yüksek kaliteli ve depolanabilir bir ürün olduğu belirtilmiştir.

Lorusso ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, makarna üretiminde kullanılan irmiğin %20'si çıkarılarak yerine doğal ve fermente kinoa

unu ilave edilmiştir. Üretilen makarnaların teknolojik ve besinsel özellikleri değerlendirilmiştir. Fermente kinoa unu ilave edilmiş makarnaların serbest amino asitler, toplam fenol içeriği ve antioksidan aktivite miktarının, sadece ırmik ile üretilen makarnalara göre iki kat yüksek olduğu tespit edilmiştir. Fermente kinoa unu kullanımıyla pişme kaybı olmasına rağmen en düşük miktarda su absorpsiyonunun gerçekleştiği belirtilmiştir. Kinoa unu kullanımının makarnanın tekstürel özellikleri üzerinde etkisi olduğu tespit edilmiştir. Fermente kinoa unu ile üretilen makarnaların *in vitro* olarak en yüksek protein sindirilebilirliği sağladığı ve tahmin edilen en düşük glisemik indeks sonucunun alındığı belirtilmiştir.

Joubert ve arkadaşları (2018) tarafından farklı protein içeriğine sahip ırmiklerin makarna pişme kalitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca üretim aşamaları (karıştırma, ekstrüzyon, kurutma) arasında 35°C’de dinlendirme işlemi uygulanmış ve bu uygulamanın da makarnaların kalitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Dinlendirme işleminin uygulanmasının etkisi, karıştırmadan sonra orta derece bir fark yaratmış olup, ekstrüzyon işleminden sonra ise önemli derecede bir fark ortaya çıkmıştır. Ekstrüde edilmiş makarnaların 35°C’de dinlendirilmesi ile ekstrakte edilemeyen polimerik protein içeriğinde önemli bir artış gözlenmiştir. Ayrıca pişmiş makarnaların viskoelastik indeksinin dinlendirilmiş taze makarnaların ekstrakte edilemeyen protein içerikleriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Majeed ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. coagulans* MTCC 5856 sporlarının D değeri belirlenmiş ve *B. coagulans* MTCC 5856 sporlarının ilavesi ile çapati (mayasız bir çeşit gözleme) ve erişte hazırlanarak probiyotik aktivitesi değerlendirilmiştir. Pişme sırasında sporların canlılıklarında istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Çapatının tavada pişirildiği aşamada yüksek sıcaklık direkt olarak uygulanmış ve sporların canlılıklarının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. *B. coagulans* MTCC 5856 sporlarının gıda işleme sıcaklıklarına oldukça dirençli olduğu belirtilmiş olup stabil kalmaları için enkapsülasyona ihtiyaç duymadıkları ifade edilmiştir. *B. coagulans*

MTCC 5856'nın mikrodalga fırında 260°C'de farklı sürelerde (0, 60, 120, 180, 240 ve 300 sn) canlı kalma oranları değerlendirilmiş ve 300 sn sıcaklık uygulamasından sonra %73 oranında canlı kalabildiği belirtilmiştir. *B. coagulans* MTCC 5856 sporlarının D değerinin çalışmada kullanılan *Lactobacillus* spp.'ye kıyasla çok daha dirençli olduğu, bu sonuçlardan yola çıkılarak *B. coagulans* MTCC 5856 sporlarının termal proseslerin kullanıldığı gıda üretim aşamalarında kullanılabilecek ideal bir probiyotik olduğu belirtilmiştir.





3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Araştırmada kullanılan ticari bir probiyotik olan *B. coagulans* GBI-30, 6086 Mutlu Makarnacılık San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir. Test kültürleri *B. cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* NCTC 12241, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Salmonella* spp. Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan Nutrient agar (NA), Nutrient broth (NB), Tryptic Soy broth (TSB), MRS broth, Mannitol Egg yolk Polymyxine agar (MYP) besiyerleri Merck firmasından, Glucose Yeast Extract agar (GYE) besiyeri HiMedia firmasından, %5 koyun kanı içeren Columbia agar besiyeri BioMérieux firmasından satın alınmıştır.

3.1.3. Makarna Üretiminde Kullanılan Materyaller

Makarna üretiminde kullanılan irmik Oba Makarnacılık San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir. Philips HR 2333 makarna üretim cihazı ile 1.7 mm çıkış çapına sahip spagetti başlığı kullanılarak makarna üretimleri gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Araştırma Planı

Yapılan çalışma dört aşamada gerçekleşmiştir. Makarna üretimi 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve tüm analizler 2 paralelli olarak yürütülmüştür.

1. Aşama: *B. coagulans* suşlarının izolasyonu ve tanımlanması
2. Aşama: İzole edilen *B. coagulans* suşlarının bazı özelliklerinin belirlenmesi ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile kıyaslanması
3. Aşama: Probiyotik makarna üretiminin gerçekleştirilmesi
4. Aşama: Üretilen probiyotik makarnanın 0. günde ve 6 ay depolama sonunda bazı özelliklerinin belirlenmesi

3.2.3. Bakteri Kültürlerinin İzolasyonu ve Stok Kültürlerinin Hazırlanması

B. coagulans izole etmek amacıyla meyve ve sebze, süt ürünleri, un, gıda sanayi atıklarından örnekler alınmıştır. Örnekler steril fizyolojik tuzlu su (FTS, %0.85 NaCl) bulunan erlenlere alınmış ve 15 dk 150 rpm'de oda sıcaklığında çalkalandıktan sonra içerisinde 9 mL steril dilüsyon sıvısı bulunan tüpler kullanılarak örneklerin gerekli seyreltmeleri (1:10) yapılmıştır. Hazırlanan seyreltmeler su banyosunda 90°C'de 10 dk bekletilerek vejetatif hücrelerin ölmesi sağlanmıştır. Isıl işlemin ardından tüpler hızla soğutulularak oda sıcaklığına getirilmiştir. Ardından NA besiyerine yayma ekim yöntemiyle ekilerek 37°C'de 48-72 sa inkübe edilmiştir. Gelişen koloniler tekrar NA besiyerine ekilerek saflaştırılmıştır (Şekil 3.1).

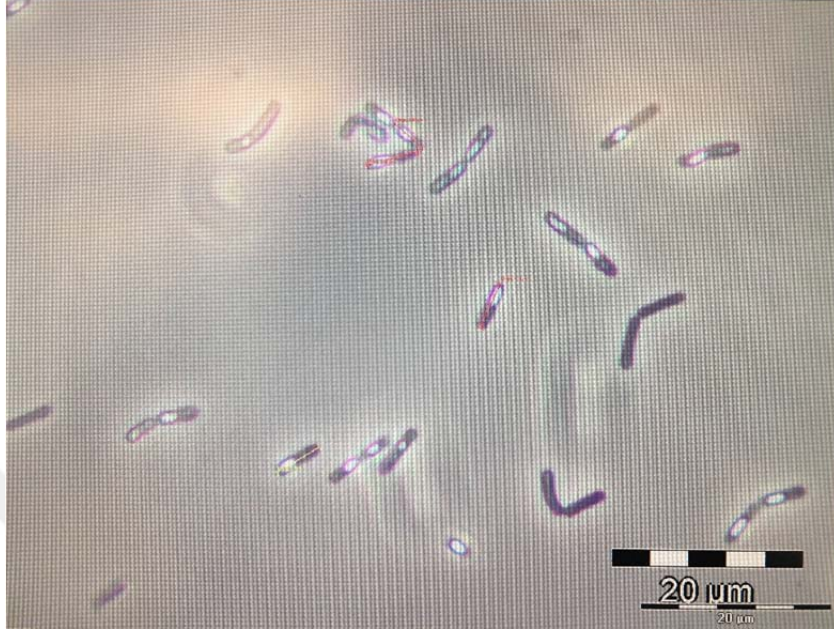
Saf kültürler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere NA besiyerine ekilerek 4°C'de depolanmış ve haftalık olarak tazelenmiştir. Ayrıca kültürler NB besiyerinde geliştirilmiş ve %20'lik steril gliserol içerisinde -20°C'de muhafaza edilmiştir (Katı ve ark, 2016).



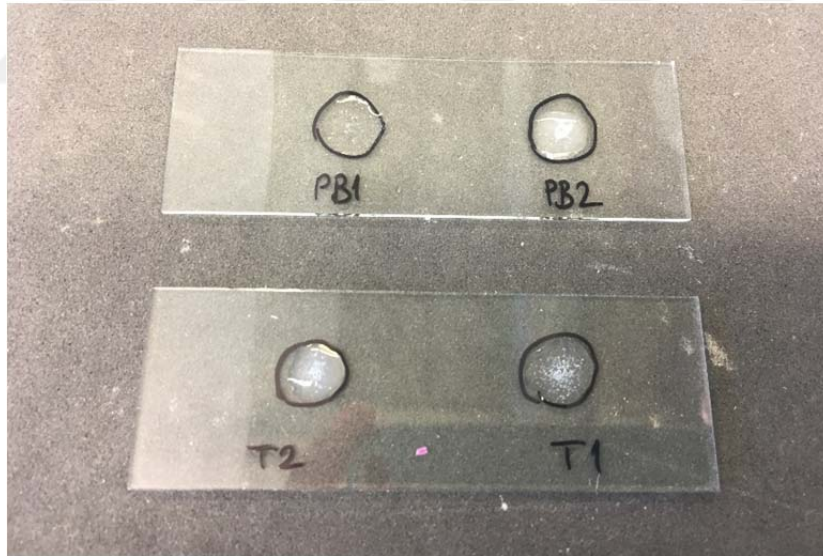
Şekil 3.1. *B. coagulans* kolonileri

3.2.4. Bakteri Kültürlerinin Tanımlanması

Saflaştırılan bakteri kültürlerine ilk olarak Gram boyama yapılmıştır. Spor varlığı faz kontrast mikroskobu ile belirlenmiş (Şekil 3.2) ve katalaz testi (Şekil 3.3) yapılmıştır. Asit üretimlerinin belirlenmesi amacıyla kültürler Dextrose Casein-Peptide Agar (Merck 1.10860; Peptide from casein 10 g/L, D(+) Glucose 5 g/L, Bromocresol purple 0.04 g/L, Agar-agar 12 g/L) besiyerine ekilmiş ve inkübasyondan sonra besiyerinde sarı renkli zon oluşumu görülen kolonilerde asit üretimi olduğu sonucuna varılmıştır. Gram-pozitif, sporlu, basil, katalaz pozitif olduğu ve asit ürettiği belirlenen kültürlerle farklı inkübasyon sıcaklığında gelişim (40°C, 50°C, 55°C, 60°C), NaCl'de (%7) üreme, anaerobik gelişme, nişasta hidrolizasyonu, hareket özellikleri, oksidaz testi, nitrat redüksiyon testi, glikozdan asit ve gaz üretimi ve kısaca IMViC (Indol, Metil kırmızısı, Voges Proskauer, Sitrat kullanımı) olarak bilinen tanımlama testleri uygulanmıştır.



Şekil 3.2. Bakteri sporlarının incelenmesi



Şekil 3.3. Katalaz testi

3.2.5. İzolatların Moleküler Olarak Tanımlanması

İzole edilen potansiyel *B. coagulans* bakterilerinin moleküler tanımlama işlemleri Zittau/Görlitz Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Matematik/Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bakterilerin tanımlanması amacıyla 16S rRNA analizi yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından PCR ile genler amplifiye edilmiştir. Jel elektroforezi, saflaştırma ve sekanslama yapılarak sonuçları değerlendirmek için BLAST programı kullanılmıştır.

3.2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu yapmak amacıyla öncelikle kültürler aktifleştirilmiş ve NB besiyerine ekilerek 40°C’de 18 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültür Eppendorf tüpe alınarak 12000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 540 µL TE-Buffer (10 µM Tris/HCl (1 M, pH 8.0), 1 µM EDTA (0.5 M Na-EDTA pH 8.0), pH 8.0) ile karıştırılmış ve üzerine 7 µL lizozim çözeltisi (5 mg/mL) ilave edilerek tüp ters-yüz edilmiştir. 37°C’de 30 dk inkübe edilmiş ve üzerine 30 µL %10 SDS (sodium dodecyl sulfate) ve 3 µL Proteinase K (20 mg/mL) ilave edilmiştir. 37°C’de 1 sa inkübasyondan sonra üzerine 100 µL 5 M NaCl ilave edilerek tüp ters-yüz edilmiştir. Önceden 68°C’de ısıtılarak akışkan hale getirilen CTAB/NaCl (%10 CTAB, %1 NaCl) çözeltisinden 80 µL ilave edilerek tüp 65°C’de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 800 µL kloroform IAA (izoamil alkol) eklenip karıştırılmış ve santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir Eppendorf tüpe aktararak üzerine 800 µL fenol (Carl Roth GmbH) eklenip karıştırılmış ve santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir Eppendorf tüpe aktararak üzerine 800 µL fenol/kloroform IAA (Carl Roth GmbH) eklenip karıştırılmış ve santrifüj edilmiştir. Bu aşamaya kadar her santrifüjden sonra süpernatant ile birlikte ara faz da yeni Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine Kloroform IAA (Carl Roth GmbH) eklenmiştir. Karıştırılarak santrifüj

edilmiş ve süpernatant üzerine 1 µL RNase (20 µg/µL) ilave edilerek 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Örnek hacminin 0.6 katı kadar isopropanol eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. -20°C'de 1 sa inkübe edildikten sonra 12000 rpm, 4°C'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet 1 mL etanol (%70) ile yıkanmıştır. Tekrar santrifüj edilmiş (1 dk), etanol uzaklaştırılmış ve pellet havada kurumaya bırakılmıştır. Ardından pellet üzerine 100 µL TE-Buffer eklenmiştir (Moore ve ark, 2004).

3.2.5.2. DNA Miktarının Tayini

DNA miktarının tayini için 198 µL steril distile su ve 2 µL DNA örneği karıştırılmıştır. Karışımdan 50 µL alınarak sub-mikro küvete aktarılmış ve spektrofotometrede 260 ve 280 nm'de ölçüm yapılmıştır. DNA'nın saflığının tayini için 260 nm'de ölçülen değerin 280 nm'de ölçülen değere oranı hesaplanarak, elde edilen değerin 1.8 – 2 arasında olmasına dikkat edilmiştir. Ölçümde kullanılan küvet her örnek değişiminde %20'lik etanol ile yıkanarak kurutulmuştur. DNA miktarının tayininde kullanılan formül aşağıda verilmiştir. İşlem iki kez yapılarak ortalamaları alınmıştır.

$$\text{DNA miktarı} = \text{OD} \times \text{seyreltme miktarı} \times 50$$

OD: 260 nm'de ölçülen değer

50: katsayı

3.2.5.3. Amplifikasyon

İzole edilen DNA'ların PCR ile amplifikasyonu için 5 µL genomik DNA örneği Eppendorf tüplere aktarılmıştır. Üzerine 10 µL 10xPCR buffer (Thermo Scientific), dNTP (10 µM, Thermo Scientific) (2'şer µL dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), her bir primerden 1 µL (100 pmol/ µL), 73 µL steril saf su ve 2 µL Pfu polymerase (Thermo Scientific) eklenmiştir. 16S rDNA fw (5' -GAG TTT GAT CCT GGC TCA-3') ve 16S rDNA rev (5' -ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3') primerleri kullanılmıştır (Majeed ve ark, 2016b). Tüpler vortekslenmiştir.

Amplifikasyon işlemi için Biometra T-Personal Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.4). İşlem aşamaları şu şekildedir: DNA'nın denatürasyonu için 95°C'de 5 dk, 3 amplifikasyon döngüsü (95°C'de 45 sn, 55°C'de 2 dk, 72°C'de 1 dk), 30 amplifikasyon döngüsü (95°C'de 20 sn, 55°C'de 1 dk, 72'de 1 dk) ve son primer elongasyonu (uzama) için 72°C'de 7 dk (Heyrman ve Swings, 2001).



Şekil 3.4. Örneklerin PCR ile amplifikasyonu

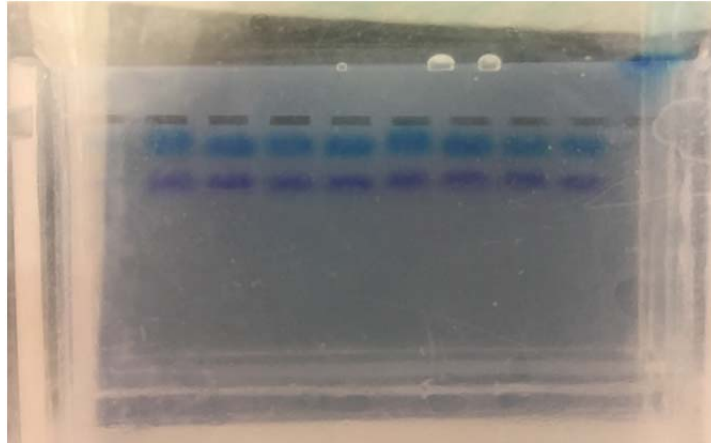
3.2.5.4. Elektroforez

Önceden hazırlanan 5 x TBE (1.1 M Tris, 900 mM borat, 25 mM EDTA, pH 8.3) seyreltilerek 0.5 x TBE hazırlanmıştır. 0.5 TBE kullanılarak %1'lik agaroz (Roti®garose, Carl Roth GmbH) jel hazırlanmış ve mikrodalga ile ısıtılarak iyice çözünmesi sağlanmıştır. Kullanılmadan önce 65°C'de bekletilen jelden 50 mL alınarak içerisine 1 µL GelRed® (Biotium) ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Yükleme kuyucuklarının oluşması için uygun tarak jel haznesine yerleştirilerek

hazırlanmış jel hazneye dökülmüştür. Jel katılaştıktan sonra elektroforez haznesine yerleştirilmiş ve tarak çıkarılmıştır. Jelin üzerini yeterli miktarda kaplayacak şekilde 0.5 x TBE eklenmiştir. İlk kuyucuğa 5 μ L ladder eklenmiştir. Diğer kuyucuklara yüklenmek üzere 5 μ L PCR ürünü ve 2 μ L loading ayrı bir Eppendorf tüpünde karıştırılmış ve kuyucuklara aktarılmıştır. Yürütme işlemi için elektroforez cihazı 110 volta ayarlanmış ve 45 dk – 1 sa süreyle çalıştırılmıştır (Şekil 3.5, Şekil 3.6). Sürenin sonunda jelin görüntülenmesi için Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.5. Elektroforez düzeneği



Şekil 3.6. Örneklerin jelde yürütülmesi



Şekil 3.7. Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme cihazı

3.2.5.5. PCR ürünlerinin Saflaştırılması ve Sekans Analizi

PCR ürünleri mi-PCR Purification Kit (Metabion) kullanılarak saflaştırılmıştır. Sekanslama işlemlerinin yapılması amacıyla örnekler LGC-Genomics GmbH (Berlin, Germany) firmasına gönderilmiştir. Sekanslama sonuçlarının değerlendirilmesi amacıyla BioEdit Sequence Alignment Editor (3.3.19.0) programı kullanılmış ve sonuçlar BLAST (Temel Yerel Hizalama Aracı) programı (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) sisteminde taranmıştır.

3.2.6. Bakterilerin Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması

B. coagulans sporlarının belirli özelliklerini değerlendirmek ve bu sporları kullanarak probiyotik makarna üretiminin gerçekleştirilmesi amacıyla bakteri

sporlarının süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu amaçla stok kültürden alınıp aktifleştirilen *B. coagulans* suşları 250 mL'lik erlenlerde bulunan 50 mL NB besiyerine inoküle edilmiştir. 40°C'de 180 rpm'de 12 sa inkübe edildikten sonra 0.4 mL alınarak spor oluşum besiyeri olarak hazırlanan SNA (%0.03 MnSO₄ ile zenginleştirilmiş NA) besiyerine 0.4 mL yayma ekim yapılmıştır. 50°C'de yapılan inkübasyonun 3, 4 ve 5. günlerinde besiyerinden alınan örnekler mikroskop altında incelenmiş ve hücrelerin sporlanma aşamaları değerlendirilmiştir. Mikroskop görüş alanı içinde %90-95 verime ulaşan serbest spor konsantrasyonu tespit edildiğinde, bu kültürlerden sporlar elde edilmiştir. Sporları elde etmek için, petri kutusunda gelişen kültürlerin üzerine 5 mL soğuk PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) çözeltisi ilave edilmiş ve Drigalski spatülü ile örneklerin toplanması sağlanmıştır. Elde edilen çözelti santrifüj tüplerine aktarılmış ve santrifüj edilerek (6000 rpm, 4°C, 10 dk) PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Elde edilen spor sedimentine 30 mL PBS ilave edilerek stok spor çözeltisi hazırlanmış ve 4°C'de depolanmıştır. Bu çözeltide bulunan spor konsantrasyonunu tespit etmek için su banyosunda 90°C'de 10 dk bekletilip hızla oda sıcaklığına soğutulan örnekler seyreltilmiş ve NA besiyerine yayma ekim yapılmıştır. 40°C'de 48-72 sa inkübasyonun ardından sayım yapılarak spor sayısı belirlenmiştir (Cattani ve ark, 2016; Trunet ve ark, 2018).

3.2.7. Bakterilerin Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması

B. coagulans hücrelerinin belirli özelliklerini değerlendirmek amacıyla bakteri hücrelerinin süspansiyonları hazırlanmıştır. Öncelikle stok kültürden alınan *B. coagulans*'lar aktifleştirilmiş ve buradan bir koloni alınarak ve NB besiyerine ekilmiştir. 40°C'de 24 sa inkübasyonun ardından tüplerin konsantrasyonu Mcfarland cihazı ile 10⁸ kob/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüplerde bulunan bakteri konsantrasyonunun tespit edilmesi amacıyla gerekli seyreltmeler yapılarak NA besiyerine ekilmiş, 40°C'de inkübasyona bırakılmış ve 24 sa sonunda gelişen koloniler sayılmıştır.

3.2.8. İzolatların Bazı Gelişim ve Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

B. coagulans olduğu tespit edilen izolatların bazı özellikleri değerlendirilerek probiyotik olarak kullanım olanakları belirlenmiştir. Bu amaçla izolatların sıcaklık toleransları, pH dirençleri, safra tuzuna dayanım özellikleri, lizozim dirençleri, biyofilm oluşturma özellikleri, ekzopolisakkarit üretme özellikleri, antibakteriyel aktiviteleri, antibiyotik dirençleri, agregasyon özellikleri ve toksikolojik özellikleri belirlenmiştir. Aynı şekilde *B. coagulans* GBI-30, 6086'nın da yukarıda verilen özellikleri belirlenerek izole edilen *B. coagulans* suşları ile kıyaslanmıştır.

3.2.8.1. Sıcaklık Toleranslarının Belirlenmesi

4°C'de bekletilmekte olan spor süspansiyonlarının konsantrasyonunun kontrol edilmesi amacıyla her işlem öncesinde spor süspansiyonlarından örnekler alınarak gerekli seyreltmeleri yapılmıştır. GYE agar besiyerine ekilen örneklerin 40°C'de 48-72 sa inkübasyonunun ardından gelişen koloniler sayılmıştır. Standart bir analiz yapabilmek için spor süspansiyonlarının son konsantrasyonları 10^8 spor/mL olarak ayarlanmıştır. İçerisinde 9.9 mL PBS bulunan steril deney tüpleri, önceden istenen sıcaklığa (80°C, 90°C ve 100°C) ayarlanmış olan su banyosunda yarım saat bekletilerek tüp içerisindeki sıvının aynı sıcaklığa gelmesi sağlanmıştır. Tüp içerisine 0.1 mL spor süspansiyonundan ilave edilerek istenen süre (0.5 dk, 1 dk, 2 dk, 3 dk, 4 dk, 5 dk, 10 dk, 15 dk, 20 dk, 25 dk ve 30 dk) sona erdiğinde buzlu su dolu kaba alınarak tüplerin hızla soğumaları sağlanmıştır. Ardından tüplerde bulunan örneklerin gerekli seyreltmeleri hazırlanarak GYE agar besiyerine ekimleri yapılmış ve 40°C'de 48-72 sa inkübasyonunun ardından sayım yapılmıştır.

3.2.8.2. Termal Ölüm Eğrilerinin Belirlenmesi

Isıl işlem sonucu tespit edilen değerler Arrhenius modeli ve D değerine göre değerlendirilmiştir (Matei ve ark, 2017; Huang, 2019). D değerinin hesaplanmasında aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Zhang ve ark, 2020).

$$\log \left(\frac{N}{N_0} \right) = \frac{-t}{D}$$

N: ilk konsantrasyon

N₀: son konsantrasyon

t: ısıtıl işlem süresi

Analiz sonucunda elde edilen verilere göre termal ölüm eğrileri çizilmiş ve aşağıda verilen formül kullanılarak *B. coagulans* sporlarının termal ölüm sabitleri (k) hesaplanmıştır.

$$\log \left(\frac{N}{N_0} \right) = -kt + c$$

N: ilk konsantrasyon

N₀: son konsantrasyon

t: ısıtıl işlem süresi

c: katsayı (Regresyon eşitliğinden elde edilmiştir)

3.2.8.3. Düşük pH Ortamlarında Gelişim Özelliklerinin Belirlenmesi

B. coagulans suşlarının düşük pH'larda gelişim özelliklerinin belirlenmesi amacıyla farklı pH'larda (1, 2, 3, 4) PBS hazırlanmış ve 0.22 µm filtre ile steril hale getirilmiştir. *B. coagulans* kültürlerinden konsantrasyonu 10⁶ kob/mL olacak şekilde farklı pH'larda ayarlanmış olan tüplere aktarılmış ve 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 1. ve 3. saatlerinde örnekler alınarak gerekli seyreltmeler yapılmış ve NA besiyerine ekimler yapılmıştır. 40°C'de 24-48 sa inkübasyonun ardından gelişen koloniler sayılarak hücre sayısı tespit edilmiştir (Sui ve ark, 2020).

3.2.8.4. Safra Tuzuna Karşı Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin safra tuzuna karşı dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla %0.3 ve %0.5 safra tuzu içeren PBS hazırlanmıştır. Bu amaçla 10 g safra tuzu (Sigma-Aldrich) ile 90 mL saf su karıştırılarak otoklavlanmıştır (121°C, 15 dk). Bu çözeltiden belirli miktarlarda alınarak PBS içeren tüplere aktarılmış ve %0.3 ve %0.5 safra tuzu konsantrasyonuna sahip tüpler oluşturulmuştur. *B. coagulans* hücre süspansiyonları, konsantrasyonları 10⁶ kob/mL olacak şekilde %0.3 ve %0.5 safra tuzu içeren tüplere aktarılmıştır. Tüpler 40°C’de inkübe edilerek 1. ve 3. saat sonunda gerekli seyreltmeler yapılmış ve NA besiyerine ekilmiştir. 40°C’de 24-48 sa inkübasyonun ardından sayımlar yapılmıştır (Mishra ve Prasad, 2005; Sui ve ark, 2020).

3.2.8.5. Lizozime Karşı Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin lizozim dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla taze kültürler NB besiyerine ekilerek 40°C’de 18 sa inkübe edilmiştir. Hücreler santrifüj (6000 rpm, 10 dk, 4°C) edilip 2 kez yıkandıktan sonra hücre pelletinden 0.1 mL alınarak 96 kuyucuklu mikrotiter plaklara aktarılmış ve üzerine aynı miktarda 100 µg/mL lizozim ilave edilmiş olan PBS çözeltisi eklenmiştir. 1 saat 37°C’de bekletilmiş ve hücre lizoziminin miktarı spektrofotometrik olarak okuma cihazında (Elisa Microplate Okuyucu Rayto RT-6000) OD 630 nm’de ölçülmüştür. Kontrol olarak lizozim çözeltisi yerine PBS ilave edilmiştir. Sonuçlar % azalma miktarına göre verilmiştir (Vera-Pingitore ve ark, 2016).

$$\% \text{ Azalma} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

A₀: Başlangıçta 630 nm’de ölçülen absorpsiyon

A: 1 sa inkübasyon sonunda 630 nm’de ölçülen absorpsiyon

3.2.8.6. Biyofilm Üretme Özelliklerinin Belirlenmesi

Biyofilm üretme özelliğinin belirlenmesi için TSB besiyerinde geliştirilen suşlar eksponansiyel üreme fazına ulaşıncaya kadar inkübe edilmiştir. Hücre konsantrasyonu Mcfarland cihazı ile 10^7 kob/mL olarak ayarlarak, 96 kuyucuklu mikrotiter plaklara 200 μ L aktarılmıştır. 37°C’de 48 sa inkübasyonun ardından kuyucuklar boşaltılmış, 200 μ L FTS ile 3 kez yıkanmış ve kurutulmuştur. Kuyucuklara %0.4 kristal viyole çözeltisi ilave edilerek 15 dk bekletilmiştir. Ardından tekrar yıkama ve kurutma işlemleri yapılmıştır. Kuyucuklara 100 μ L %33’lük asetik asit çözeltisi ilave edilerek okuma cihazında (Elisa Microplate Okuyucu Rayto RT-6000) 630 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Kontrol amacıyla yapılan işlemde kuyucuklara sadece TSB besiyeri ilave edilmiş ve aynı işlemler uygulanmıştır. Her bir örnek için 5 kuyucuk kullanılmış olup ortalamaları alınmıştır. Biyofilm üretim yeteneği şu şekilde değerlendirilmiştir: $Abs_{630nm} \geq 2.0$, güçlü (+++); $2.0 > Abs_{630nm} \geq 1.0$, orta (++); $Abs_{630nm} < 1.0$, zayıf (+). Analizler 2 paralelli yapılmıştır (Guo ve ark, 2016).

3.2.8.7. Ekzopolisakkarit Üretme Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteriler öncelikle mMRS broth besiyerinde geliştirilmiş, ardından mMRS agar (292 mM süktroz, 146 mM glikoz veya 146 mM früktoz ilave edilmiş) besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiştir. 30°C’de 6 gün inkübasyon sonunda koloni morfolojileri incelenmiş ve mukoid koloni oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (De Angelis ve ark, 2006).

3.2.8.8. Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi

Kültürlerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla patojen veya patojen olmayan test kültürleri olarak *B. cereus*, *E. coli* NCTC 12241, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Salmonella* kullanılmıştır. Kültürler TSB besiyerine inoküle edilerek *B. coagulans*’lar 40°C’de, test kültürleri ise 37°C’de 18 sa inkübe edilmiş ve son konsantrasyonları 10^6 kob/mL olacak şekilde Mcfarland

cihazı ile ayarlanmıştır. Boş steril tüplere 5 mL test kültürü ve 5 mL *B. coagulans* kültürlerinden aktarılmıştır. Kontrol amacıyla test kültürlerinden 5 mL alınarak içerisinde 5 mL TSB besiyeri bulunan tüplere aktarılmıştır. 37°C’de 24 sa inkübe edilen karışık kültürler gerekli seyreltmeler yapılarak test kültürü sayısının belirlenmesi amacıyla NA besiyerine ekilmiş ve 37°C’de 24-48 sa inkübe edilmiştir (Drago ve ark, 1997).

3.2.8.9. Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

B. coagulans suşlarının antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi amacıyla EUCAST (Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Kültürler TSB besiyeri kullanılarak 24 sa 40°C’de inkübe edilmiştir. Hücre konsantrasyonu Mcfarland cihazı ile 10^8 kob/mL olacak şekilde ayarlanarak 0.1 mL NA besiyerine yayma ekim yapılmış ve antibiyotik diskler (Ampisilin (10 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), kanamisin (30 µg), klindamisin (2 µg), kloramfenikol (30 µg), rifampin (5 µg), siprofloksasin (5 µg), streptomisin (10 µg), tetrasiklin (10 µg), vankomisin (30 µg)) yerleştirilmiştir. 24 sa 40°C’de inkübasyonun ardından oluşan zon çapları ölçülmüştür. Zon çaplarına göre dirençli (0 – 0.5 cm), duyarlı (D+; 0.6 – 1.5 cm), duyarlı (D++; 1.6 – 2.5 cm) ve duyarlı (D+++; > 2.6 cm) olarak değerlendirme yapılmıştır (Nithya ve Halami, 2013). İşlem iki paralelli yapılmıştır.

3.2.8.10. Agregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri hücrelerinin agregasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla adhezyon, otoagregasyon ve koagregasyon özellikleri tespit edilmiştir.

3.2.8.10.(1). BATH Testi ile Adhezyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri hücrelerinin adhezyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla BATH (hidrokarbonlara bakteriyel adhezyon) testi uygulanmıştır (Collado ve ark, 2008). Hücre konsantrasyonları 7-8 log kob/mL olacak şekilde ayarlandıktan sonra boş

steril tüplere 1'er mL aktarılmıştır. Üzerlerine 1'er mL ksilen ilave edilmiştir. Tüpler 5 dk vortekslendikten sonra 1 sa oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından sıvı faz uzaklaştırılmış ve 630 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Adhezyon yüzdesinin hesaplanması amacıyla aşağıda verilen formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ Adhezyon} = \frac{A_o - A}{A_o} \times 100$$

A_o : Kültürün başlangıçtaki absorbansı

A: Ekstraksiyon sonunda ölçülen absorbans

3.2.8.10.(2). Otoagregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri hücrelerinin otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla hücre konsantrasyonları PBS kullanılarak 7-8 log olarak ayarlandıktan sonra 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 2., 16., 20. ve 24. saatleri sonunda örnekler alınarak 630 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Aşağıda verilen formüle göre hesaplamalar yapılmıştır:

$$\% \text{ Otoagregasyon} = \frac{1 - A_{\text{üst}}}{A_{\text{tüm}}} \times 100$$

$A_{\text{üst}}$: Üst fazın absorbansı

$A_{\text{tüm}}$: Toplam bakteri süspansiyonunun absorbansı

3.2.8.10.(3). Koagregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Kültürlerin koagregasyon özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla patojen ve patojen olmayan kültürler olarak *E. coli* NCTC 12241, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus subtilis* ve *Salmonella* spp. kullanılmıştır. Test kültürleri TSB

besiyerinde 37°C’de 18 sa inkübasyondan sonra hücre konsantrasyonları 7-8 log olacak şekilde ayarlanmıştır. Probiyotik hücre konsantrasyonları da 7-8 log olacak şekilde ayarlanmıştır. Steril tüplere probiyotik hücre süspansiyonundan 2 mL alınıp üzerine 2 mL test kültürü hücre süspansiyonu ilave edilerek karıştırılmıştır. 37°C’de inkübe edilerek 0, 1, 2, 3, 4, 24. saatlerde absorbanları ölçülmüştür. Hesaplamalar için aşağıda verilen formül kullanılmıştır:

$$\% \text{ Koagregasyon} = \left((A_{\text{test}} + A_{\text{pro}}) - \frac{A_{\text{mix}}}{A_{\text{test}} + A_{\text{pro}}} \right) \times 100$$

A_{test} : Test kültürü absorbanı

A_{pro} : Probiyotik kültür absorbanı

A_{mix} : Karışık kültür absorbanı

3.2.8.11. Toksikolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

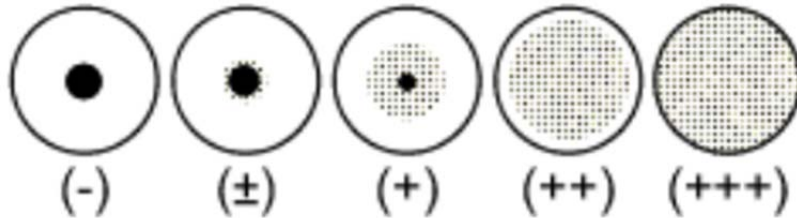
İzolatların toksikolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, enterotoksin genlerinin varlığı araştırılmış, hemoliz ve lesitinaz analizi yapılmıştır. Analizlerde pozitif kontrol olarak, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarına ait *B. cereus* kullanılmıştır.

3.2.8.11.(1). Enterotoksin Üretimlerinin Belirlenmesi

Çalışmada, BCET-RPLA (Oxoid) kiti kullanılarak suşların Hbl enterotoksini üretimi, Duopath Cereus Enterotoxins (Merck) kiti kullanılarak suşların nhe enterotoksini üretimi değerlendirilmiştir. Suşlarda *bceT*, *ces*, *cytK* ve *entFM* enterotoksin genlerinin varlığının belirlenmesi amacıyla bakterilerin kromozomal DNA’ları izole edilmiş ve PCR tekniği kullanılmıştır.

3.2.8.11.(1).(a). BCET-RPLA Kiti ile Enterotoksin Üretimi Analizi

İzolatlarda *B. cereus* enterotoksini üretiminin araştırılması amacıyla BCET-RPLA toksin tespit kiti (Oxoid) kullanılmıştır. Bu amaçla taze kültürlerden 1'er koloni alınarak Brain Heart Infusion Broth (BHI, Merck) besiyerine ekim yapılmıştır. 37°C'de 250 rpm'de 6-18 sa inkübe edilen kültürler santrifüjlenmiştir (900 rpm, 20 dk, 4°C). Analizde kültür süpernatantı kullanılmıştır. 96 kuyucuklu mikrotiter plaklar her örnek için 2 sıra ve 8 kuyucuk olacak şekilde kullanılmıştır. BCET-RPLA kiti içeriğinde bulunan lateks reaktifleri kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Her örnek için ayrılan ilk sıradaki 1. kuyucuk hariç her kuyucuğa 25 µL TD 954 reaktifi eklenmiştir. Ardından her sıradaki ilk iki kuyucuğa 25 µL örnek ilave edilmiştir. İkinci kuyucuktan 25 µL örnek alınıp üçüncü kuyucuğa aktarılmış ve aynı şekilde örneğin seyreltilmesi işlemine 7. kuyucuğa kadar devam edilmiştir. İlk sıradaki tüm kuyucuklara 25 µL TD 951 reaktifi, ikinci sıradaki tüm kuyucuklara 25 µL TD 952 reaktifi ilave edilmiştir. Plak düz bir zeminde kendi ekseni etrafında birkaç kez çevirilerek kuyucukların içindeki maddelerin karışması sağlanmıştır. Ardından plaklar 20-24 sa oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda sonuçları değerlendirme amacıyla kit kılavuzunda verilen şekil (Şekil 3.8) dikkate alınmıştır. Analizde pozitif kontrol olarak *B. cereus*, negatif kontrol olarak *B. coagulans* GBI-30, 6086 kullanılmıştır. Ayrıca kit içerisinde bulunan *B. cereus* enterotoksini (TD 953) de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.8. BCET-RPLA sonuçlarının değerlendirilmesi

3.2.8.11.(1).(b). Duopath Kiti ile Enterotoksin Üretimi Analizi

Duopath cereus enterotoksin kiti (Merck) kullanılarak izolatlarda NHE ve HBL enterotoksinlerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu amaçla taze kültürlerden 1 koloni alınarak içerisinde 18 mL steril CGY (Caseinhydrolysate Glucose Yeast extract) broth ve 2 mL steril %10'luk gliserol bulunan 250 mL'lik erlenlere inoküle edilmiştir. 4 sa boyunca 37°C'de 250 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Analiz sırasında oda sıcaklığında olması istenen kitler analizden 1 saat önce buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Düz zemine yerleştirilen kitlerin örnek haznesine 150 µL kültür aktarılarak 30 dk sonunda sonuç alınmıştır. Analizde pozitif kontrol olarak *B. cereus*, negatif kontrol olarak *B. coagulans* GBI-30, 6086 kullanılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Duopath cereus enterotoksin kitinde pozitif (sol) ve negatif (sağ) sonuç

3.2.8.11.(2). Enterotoksin Genlerinin Analizi

İzolatlarda enterotoksin genleri olan *bceT*, *ces*, *entFM* ve *cytK* genlerinin varlığının tespit edilmesi amacıyla öncelikle kromozomal DNA izolasyonları yapılmıştır.

3.2.8.11.(2).(a). Kromozomal DNA İzolasyonu

Kromozomal DNA izolasyonu işlemi Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Bakterilerde kromozomal DNA izolasyonu için Özcan (2005) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. Öncelikle aktifleştirilmiş bakteriler 250 mL'lik erlenlerde bulunan 30 mL NB besiyerine öze ile ekilerek 40°C, 180 rpm'de 18 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından bakteri kültürü 10 mL hacimli steril santrifüj tüplerine alınarak 4500 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Sıvı faz uzaklaştırılarak 10 mL liziz solüsyonu (50 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.5) ile çözülerek yıkanmıştır. Kültür tekrar 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 4 mL liziz solüsyonu eklenerek pellet çözülmüş, üzerine 10 mg lizozim eklenmiştir. Ardından su banyosunda 37°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 300 µL %20 (w/v) sarkosil ilave edilerek su banyosunda 37°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen karışımdan 500'er µL alınarak Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Üzerine 1 hacim fenol-kloroform karışımından (25 mL fenol, 24 mL kloroform, 1 mL izoamil alkol) ilave edilmiş ve süspansiyon haline gelinceye kadar dikkatlice alt-üst edilmiştir. Karışım 15000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmış ve üst faz alınarak temiz bir Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 1 hacim kloroform/izoamil alkol karışımı (24 mL kloroform, 1 mL izoamil alkol) eklenerek alt-üst edilmiştir. Tekrar 15000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak üst faz temiz bir Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 1/10 hacim Na-Asetat (3M, pH 5.2) ve 2.5 hacim soğuk %99 etanol ilave edilmiştir. Tüpler birkaç kez alt-üst edilerek DNA pelletinin süspansiyon içinde yumak oluşturması sağlanmıştır. DNA pelleti bir pipet yardımıyla temiz Eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine %70 etanol eklenerek yıkanmıştır. Kısa bir santrifüjle DNA pelleti tüpün dibinde toplanmış ve etanol uzaklaştırılmıştır. DNA pelleti oda sıcaklığında kurutularak yaklaşık 50 µL TE solüsyonu (50 mM Tris (pH 7.6), 1 mM EDTA (pH 8.0)) ile çözülmüştür. Ardından izole edilen DNA'lar RNaz enzimi ile RNA'dan arındırılmıştır.

3.2.8.11.(2).(b). DNA'nın RNaz Enzimi İle RNA'dan Arındırılması

İzole edilen DNA'ların RNA'dan arındırılması amacıyla Özcan (2005) tarafından kullanılan yöntem uygulanmıştır. Öncelikle RNaz (10 mg/mL) hazırlanmıştır. Bu amaçla RNaz A tartılarak RNaz solüsyonunda (10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 15 mM NaCl) çözölmüştür. DNaz aktivitesinin inhibe edilmesi amacıyla 100°C'de 15 dk bekletilmiştir. Bakteriden izole edilen DNA'nın hacmi TE solüsyonu ile 100 µL'ye tamamlanmış ve üzerine 1 µL RNaz ilave edilmiş ve 37 °C'de 1 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 40 µL Na-asetat (3 M, pH 4.8) solüsyonu ve 260 µL saf su ilave edilerek hacim 400 µL'ye tamamlanmıştır. Ardından üzerine 1 hacim fenol-kloroform karışımından ilave edilmiş ve tüp iyice alt-üst edilmiştir. Süspansiyon süt kıvamını aldıktan sonra 15000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmış ve DNA içeren üst faz alınarak temiz bir Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 400 µL kloroform/izoamil alkol karışımından eklenerek birkaç dk alt-üst edildikten sonra 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz temiz bir tüpe aktarılarak üzerine 2.5 hacim %99'luk soğuk etanol eklenmiştir. Karışım homojenize edilerek en az 2 saat -20 °C'de bekletilmiştir. 15000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak DNA pellet haline getirilmiş ve üst faz dökölmüştür. Pellet %70 etanol ile yıkanmış ve ardından kurutulmuştur. Üzerine 30 µL TE solüsyonu (50 mM Tris (pH 7.6), 1 mM EDTA (pH 8.0)) eklenmiş ve çözönmesi için 4°C'de 1 gece bekletilmiştir. Kontrol amaçlı olarak elektroforez ile DNA'lar jelde yürütölmüştür.

3.2.8.11.(2).(c). DNA'nın Amplifikasyonu, Elektroforezi ve Görüntölenmesi

DNA'ların PCR ile amplifikasyonu aşaması Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle NanoDrop ND-1000 cihazı ile DNA miktarları ölçölmüştür (Çizelge 3.1). PCR işleminin gerçekleştirilmesinde Applied Biosystems Veriti 96 well thermal cycler cihazı kullanılmıştır. Örneklerin PCR'da kullanılacak DNA konsantrasyonları 100 ng/100

μL olacak şekilde ayarlanmış olup bu amaçla kullanılan DNA ve saf su miktarları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklerin DNA konsantrasyonları

Örnek	ng/ μL	A260	260/230	260/280
SC	1256.8	25.138	1.08	1.96
SD	600.54	12.011	1.24	2.02
SPi	1979.5	39.592	1.43	1.98
STp	681.13	13.623	1.27	1.91

Çizelge 3.2. DNA çözeltilerinin hazırlanması

Örnek	DNA	Saf su	Konsantrasyon
SC	7.95	92.05	100 ng/100 μL
SD	16.65	83.35	100 ng/100 μL
SPi	5.05	94.95	100 ng/100 μL
STp	14.68	85.32	100 ng/100 μL

Enterotoksin genlerinin tespiti amacıyla PCR işleminde kullanılan primerler ve sekansları Çizelge 3.3’de verilmiştir. PCR’da Mohkam ve arkadaşları (2020) tarafından kullanılan yöntem laboratuvar koşullarına göre uyarlanmış ve bu amaçla 12.5 μL master mix, 1 μL DNA, her bir primerden 1 μL ve 5.5 μL su olacak şekilde kullanılmıştır. PCR programı şu şekilde ayarlanmıştır: 94°C’de ilk denatürasyon, 30 tur 94°C’de 20 sn, 54°C’de 1 dk, 72°C’de 2 dk ve 72°C’de 7 dk. PCR işleminin ardından PCR ürünleri elektroforez ile %1 agaroz jelde yürütülmüş ve işlem sonunda jel Syngene G:BOX Chemi XRQ görüntüleme cihazı ile görüntülenerek bant oluşumu incelenmiştir.

Çizelge 3.3. Toksin primerleri (Mohkam ve ark, 2020)

Hedef gen	Primer adı	Primer sekansı (5'→3')	Amplikon boyutu
bceT	bceTfor	GAC TAC ATT CAC GAT TAC GCA GAA	303
	bceTrev	CTATGC TGA CGA GCT ACATCC ATA	
	cesfor	TTG TTG GAATTG TCG CAG AG	
ces	cesrev	GTA AGC GAA CCT GTC TGTAAC AAC	405
		A	
cytK	cytKfor	ATC GGK CAA AAT GCA AAA ACA CAT	515
	cytKrev	ACC CAG TTW SCA GTT CCG AAT GT	
		AAA GAA ATT AAT GGA CAA ACT CAA	
entFM	entFMfor	ACT CA	596
	entFMrev	GTATGTAGC TGG GCC TGT ACG T	

(Dejenere bazlar şu şekilde adlandırılmıştır: K = G veya T; W= T veya A; ve S = G veya C)

3.2.8.11.(3). Hemoliz ve Lesitinaz Analizi

Bakterilerde hemolitik aktivitenin tespit edilebilmesi amacıyla kültürler %5 koyun kanı içeren Columbia agar besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 24 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşumu gözlenmesi pozitif hemoliz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir (Mohkam ve ark, 2020).

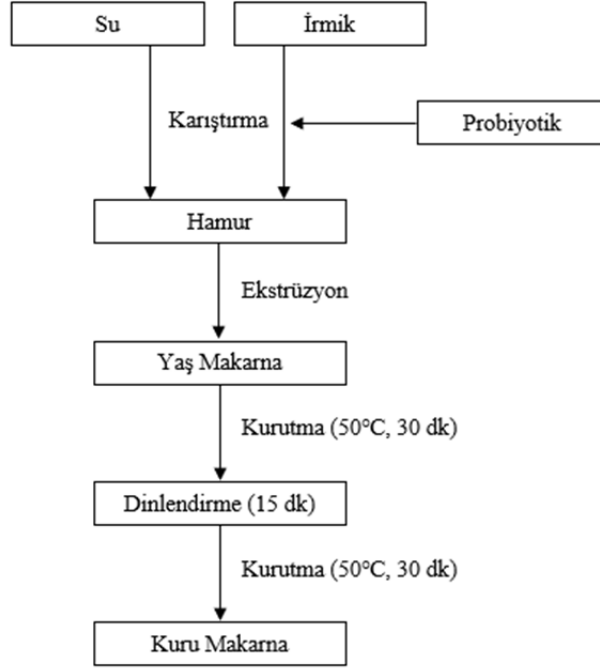
Lesitinaz aktivitesinin tespit edilmesi amacıyla MYP agar besiyerine ekim yapılmıştır. 40°C'de 24 sa inkübasyonun ardından koloniler etrafında opak zon görülmesi durumunda lesitinaz üretiminin pozitif olduğu sonucuna varılmıştır. Kontrol amacıyla pozitif örnek olarak *B. cereus* kullanılmıştır (Mohkam ve ark, 2020).

3.2.9. Probiyotik Makarna Üretimi

Makarna üretimleri 400 g ırmik ve 120 mL musluk suyu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretimler 2 paralelli olarak yapılmıştır. Probiyotik makarna üretimi için %1 oranında probiyotik bakteri sporu kullanılmıştır. Kullanılan liyofilize *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) kültürü Mutlu Makarnacılık San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir. Etüv raflarına kağıt koyularak üzerine kurutulacak makarnalar yerleştirilmiştir. Spagetti şeklinde üretilen (Şekil 3.10) makarnalar 50°C'de etüvde 30 dk kurutulmuştur. Ardından etüvden çıkarılan makarnalar kapalı bir kutu içerisinde 15 dk boyunca dinlendirilmiş ve tekrar 50°C'lik etüve alınarak 30 dk kurutulmuştur. Örneklerde 0. gün analizleri 2 paralelli olarak yapılmıştır. 6. ay analizlerinin yapılabilmesi için yeterli miktarda örnek alınarak kilitli poşetlere aktarılmış ve oda sıcaklığında (20-30°C) depolanmıştır. Makarna üretimi akış şeması Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.100. Makarna üretimi



Şekil 3.11. Makarna üretim akış şeması

3.2.10. Makarna Örneklerinde Yapılan Analizler

Makarna örneklerinde nem, kül, pişme süresi tayini, su absorpsiyonu, pişme kaybı, tekstür, renk, duyuusal ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır.

3.2.10.1. Nem Tayini

Nem tayini yapma amacıyla AACC 44-19.01 (1999a) metodu kullanılmıştır. Etüvde sabit tartım ağırlığına gelene kadar bekletilen örnek kapları desikatörde oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiş ve ardından daraları alınmıştır. Örnekler tartılmış ve 105°C’de sabit tartım ağırlığına gelene kadar bekletilmiştir. Etüvden alınan örnekler desikatörde bekletilerek oda sıcaklığına geldikten sonra tartımlar yapılmıştır. Aşağıda verilen formüle göre hesaplamalar yapılmıştır.

$$\% \text{ Nem} = \frac{\text{Nem kaybı} \times 100}{\text{Örnek ağırlığı}}$$

3.2.10.2. Kül Tayini

Örneklerde kül tayini yapma amacıyla AACC 08-12.01 (1999b) metodu kullanılmıştır. Krozeler kül fırınında bekletilmiş ve desikatörde oda sıcaklığına geldikten sonra daraları alınmıştır. Krozelere alınan örneklerin ilk ağırlıkları belirlendikten sonra kül fırınında 600°C’de yakma işlemi yapılmıştır. Örnekler gri-beyaz bir renk aldıktan sonra desikatöre alınarak oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiş ve ardından tartımlar yapılmıştır. Aşağıda verilen formüle göre hesaplamalar yapılmıştır.

$$\% \text{ Kül} = \frac{\text{Kalıntı ağırlığı}}{\text{Örnek ağırlığı}} \times 100$$

3.2.10.3. Pişme Süresi Tayini

Makarnalarda pişme süresini tayin etmek için beher içerisine 250 mL saf su ilave edilmiş ve kaynamaya başladıktan sonra içerisine 8 g örnek ilave edilmiştir. Belirli aralıklarla örnek alınmış ve örnek iki cam arasında sıkıştırılmıştır. Makarnanın merkezindeki beyaz kısmın kaybolduğu süre pişme süresi (PS) olarak belirlenmiştir. Tekstür, su absorpsiyonu, renk ve duyu analizi için örnekler PS+1 dk pişirilmiştir (Petitot ve ark, 2010).

3.2.10.4. Su Absorpsiyonu Analizi

Piştirilen makarnaların su absorpsiyon miktarlarını tespit etmek için ilk ağırlıkları belirlenen makarnalar pişirildikten sonra 1 dk boyunca süzölmüş ve son ağırlıkları tespit edilmiştir. Aşağıda verilen formüle göre hesaplamalar yapılmıştır (Desai ve ark, 2019).

$$\text{Su absorpsiyonu (\% db)} = \left(\frac{\text{Pişmiş makarna ağırlığı}}{\text{Kuru makarna ağırlığı}} - 1 \right) \times 100$$

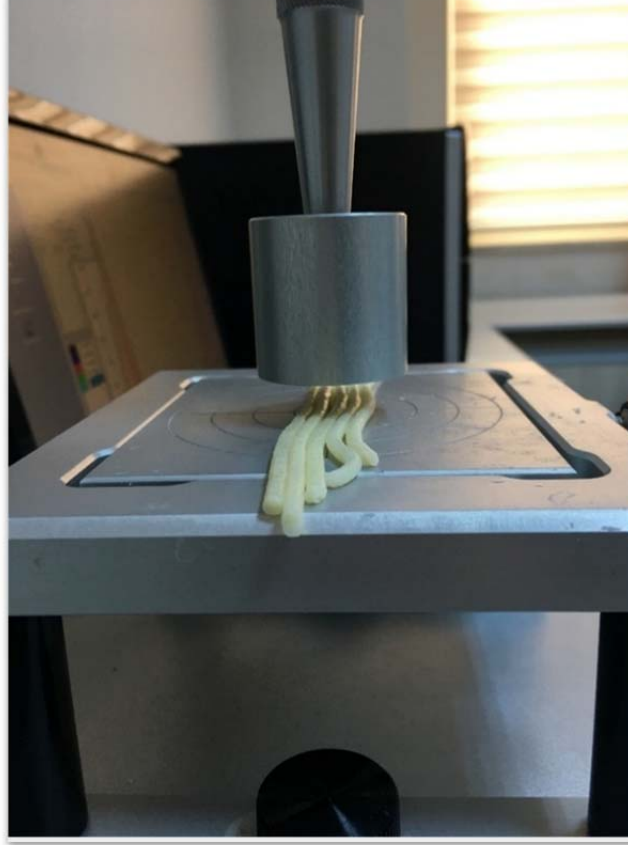
3.2.10.5. Pişme Kaybı Analizi

Probiyotik makarna örneklerinde pişme kaybını tespit etmek amacıyla makarnalar pişirildikten sonra 1 dk boyunca süzölmüş ve pişme suyu etüvde kurutulmuştur (105°C). Aşağıda verilen formüle göre hesaplamalar yapılmıştır (Özyurt ve ark, 2015).

$$\text{Pişme kaybı (\%)} = \left(\frac{\text{Pişme suyundan elde edilen kalıntı ağırlığı}}{\text{Kuru makarna ağırlığı}} - 1 \right) \times 100$$

3.2.10.6. Tekstür Analizi

Pişmiş makarnaların tekstür analizi Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Stable Micro Systems (TA.XTPlus) cihazı ve 36 mm çapında prob (P/36R) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12). 5 adet spagetti yan yana olacak şekilde yerleştirilmiş ve test hızı 1 mm/s olarak ayarlanmıştır (Petitot ve ark, 2010).



Şekil 3.11. Makarnaların tekstür analizi

3.2.10.7. Renk Analizi

Kuru ve pişmiş probiyotik makarna örneklerinde renk tayini Konica Minolta marka el tipi renk ölçüm cihazı kullanılarak yapılmıştır. Pişmiş makarnaların renk analizi için örnekler 8 dk pişirilmiştir. Kuru ve pişmiş makarnaların L* (parlaklık), a* (kırmızı-yeşil), b* (sarı-mavi) değerleri belirlenmiş olup hue (renk özü) değerleri ve chroma (doygunluk indeksi) değerleri hesaplanmıştır (Sharma ve ark, 2021). Bu amaçla aşağıda verilen formüller kullanılmıştır. Her bir makarna örneği için 3 ölçüm yapılmış ve ortalamaları alınmıştır.

$$\text{Hue değeri} = \arctan \frac{b^*}{a^*}$$

$$\text{Chroma değeri} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

3.2.10.8. Duyusal Analiz

Pişişmiş makarnaların 0. günde ve 6 ay depolama sonunda duyusal analizi 7 panelist ile yapılmıştır. Örneklerin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan duyusal analiz formu Ek 1’de verilmiştir (Petitot ve ark, 2010). Duyusal analiz işleminde makarnalar 8 dk pişirilmiştir. Panelistlerden makarna örneklerini farklı kalite parametrelerine göre (Yüzey düzgünlüğü, homojenlik, sertlik, esneklik, kırılabilirlik, yapışkanlık ve genel beğeni) değerlendirmeleri ve 1-10 arasında değerler verilmesi istenmiştir. Örneklerde değerlendirilmesi istenen kalite parametreleri şu şekildedir (Petitot ve ark, 2010):

- Yüzey düzgünlüğü: Örnek yüzeyinde çatlak ve pürüzlerin olmamasını tanımlamaktadır.
- Homojenlik: Spagettinin yüzeyi ile merkezi arasındaki tekstür farkını tanımlamaktadır.
- Sertlik: Belirli bir deformasyon veya penetrasyon elde etmek için gereken kuvveti tanımlamaktadır (1: yumuşak; 5: sağlam, 10: sert).
- Esneklik: Deforme edici kuvvetin kaldırılmasından sonra deforme olmuş malzemenin başlangıç durumuna dönme derecesini tanımlamaktadır (1: plastik, 5: elastik, 10: lastik gibi).
- Kırılabilirlik: Örneğin parçalandığı gücü tanımlamaktadır. Yüksek sertlik ve düşük derecede yapışkanlığın sonucudur (1: ufalanan, 5: gevrek, 10: kırılabilir).
- Yapışkanlık: Örnek ile temas durumunda temas edilen yüzeye yapışma miktarını tanımlamaktadır.

3.2.10.9. Mikrobiyolojik Analizler

Makarnalarda üretim aşamalarında (hamur, ekstrüzyon sonrası) ve son üründen (kuru makarna) örnekler alınarak toplam aerob mezofilik bakteri (TAMB) sayısı, sporlu mikroorganizma sayısı ve *B. coagulans* sayısı belirlenmiştir. Ayrıca pişmiş makarnalarda pişmenin farklı sürelerinde örnekler alınarak *B. coagulans* sayıları belirlenmiştir. 10 g örnek steril seyreltme sıvısı (%0.85 g/L NaCl) ile karıştırılarak stomacher torbalarına aktarılmış stomacher (Interscience BagMixer 400) cihazında ve 30 dk homojenize edilmiştir.

3.2.10.9.(1). Örneklerde *Bacillus coagulans* Sayılarının Belirlenmesi

Homojenize edilmiş örnekler içerisinde 9 mL steril seyreltme sıvısı bulunan tüpler ile seyreltilmiş (1:10) ve 75°C'lik su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Ardından tüpler hızla oda sıcaklığına soğutularak GYE agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır. 40°C'de 48-72 sa inkübasyonun ardından tipik *B. coagulans* kolonileri sayılmıştır (Fares ve ark, 2015).

3.2.10.9.(2). Örneklerde Sporlu Mikroorganizma Sayılarının Belirlenmesi

Homojenize edilmiş örnekler içerisinde 9 mL steril seyreltme sıvısı bulunan tüpler ile seyreltilerek (1:10) 90°C'lik su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Ardından hızla oda sıcaklığına soğutulan tüplerden alınan örneklerin NA besiyerine yayma ekimleri yapılmış ve 37°C'de 48 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından koloni sayımı yapılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.10.9.(3). Örneklerde Toplam Aerob Mezofilik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi

Homojenize edilmiş örnekler içerisinde 9 mL steril seyreltme sıvısı bulunan tüpler ile seyreltilerek (1:10) NA besiyerine ekimler gerçekleştirilmiş ve 30°C'de 48 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından gelişen koloniler sayılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.10.9.(4). Pişmiş Örneklerde *Bacillus coagulans* Sayısının Belirlenmesi

Piştirme sırasında 5., 7., 9. ve 11. dakikalarda alınan örnekler steril seyreltme sıvısı ile karıştırılarak stomacher torbalarına aktarılmış ve stomacher cihazında 30 dk homojenize edilmiştir. Ardından gerekli seyreltmeler (1:10) yapılarak 75°C'lik su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Hızla oda sıcaklığına soğutulan örnekler GYE agar besiyerine yayma ekim yapılarak 40°C'de 48-72 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen tipik *B. coagulans* kolonileri sayılmıştır (Fares ve ark, 2015).

3.2.11. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler “R Statistical Software” (3.6.1) programı (R Core Team, 2019) kullanılarak yapılmıştır. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) denemeler arasında önem farklılıklarının karşılaştırılmasında, Tukey-Post-HOC testi gruplar arasındaki farklılıkların karşılaştırılmasında kullanılmıştır. Depolama ile örnekler arasında önem farklılıklarının karşılaştırılmasında bağımlı t-testi ($p < 0.05$) kullanılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

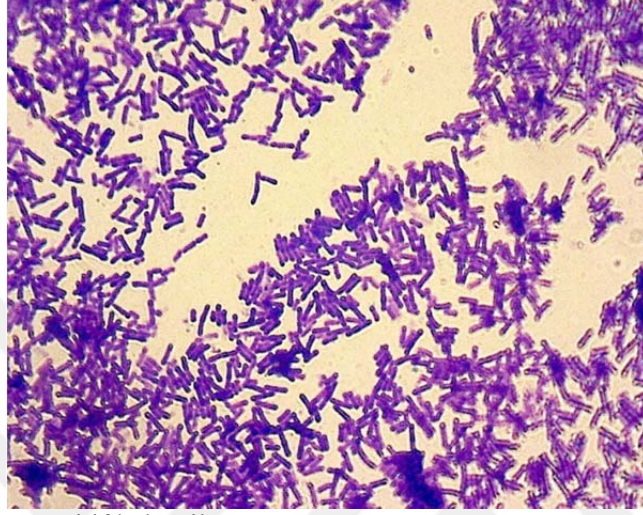
Araştırmada *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen probiyotik makarna örneği, kontrol makarna örneği ve izole edilen dört farklı *B. coagulans* ile üretilen probiyotik makarna örnekleri olmak üzere toplam altı adet örnek üzerinde çalışılmıştır. Araştırmanın başlangıcında izole edilmiş *B. coagulans*'ların probiyotik olarak kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla belirli özellikleri değerlendirilmiş ve uygun bulunan *B. coagulans*'lar ile probiyotik makarna üretimleri gerçekleştirilmiştir. Makarna örneklerinin kalite karakteristikleri belirlenmiş olup, mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4.1. *Bacillus coagulans*'ın Tanımlanması

B. coagulans'ların izolasyonu amacıyla kullanılan çeşitli örnekler arasından domates, mısır, patates ve turşu örneklerinden izole edilen bakterilerden basil, Gram-pozitif (Şekil 4.1) ve sporlu oldukları tespit edilen suşlara, katalaz testi, oksidaz testi, nitrat redüksiyon testi, nişasta hidrolizasyon testi, asit üretimi, kazein hidrolizi, IMViC testleri (indol, metilen kırmızısı, Voges-Proskauer, sitrat testi) gibi tanımlama testleri uygulanmıştır. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de belirtilen sonuçlara göre katalaz-pozitif, oksidaz-negatif, nitrat redüksiyonu negatif, nişastayı hidrolize edebilen, asit üretebilen, kazeini hidroliz edemeyen, indol negatif ve sitrat kullanımları negatif ve Voges-Proskauer testi pozitif sonuç veren izolatların *Bacillus coagulans* oldukları belirlenmiştir (Vos ve ark, 2011). Kontrol amacıyla *B. coagulans* GBI-30, 6086 kullanılarak aynı analizler yapılmıştır. Ayrıca bu kültürlerin 40°C, 50°C, 55°C ve 60°C'de su banyosunda NB besiyerinde gelişme gösterdikleri, anaerobik gelişme gösterdikleri ve hareketli oldukları belirlenmiştir.

B. coagulans olduğu düşünülen izolatların tanımlamaları 16S rRNA analizi ile yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre patates, turşu, mısır ve domatesten izole edilen 4 suşun *B. coagulans* olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Tanımlanan

bakteriler SC, SD, SPi ve STp olarak kodlanmış olup, sekans dizilimleri Ek 2’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Gram-pozitif bakteriler

Çizelge 4.1. İzole edilen *B. coagulans* suşlarının tanımlamaları

İzolatlara verilen kodlar	Benzerlik (%)	Tanımlanan tür
SC	98	<i>B. coagulans</i>
SD	98	<i>B. coagulans</i>
SPi	98	<i>B. coagulans</i>
STp	98	<i>B. coagulans</i>

4.2. Sıcaklık Toleransları

B. coagulans sporlarının sıcaklık toleranslarının belirlenmesi amacıyla yapılan ısıt işlemler sonucunda ortamda canlılığını devam ettiren *B. coagulans* sayısının tespitinin ardından D değerleri (mikroorganizma sayısında 1 log azalma için gereken ısıt işlem süresi) hesaplanmış ve termal ölüm eğrileri çizilmiştir.

Başlangıç spor konsantrasyonları Bc için 6.7 log kob/mL, SC için 6.78 log kob/mL, SD için 6.8 log kob/mL, SPi için 6.69 log kob/mL ve STp için 6.88 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.2’de 80°C, 90°C ve 100°C’de farklı

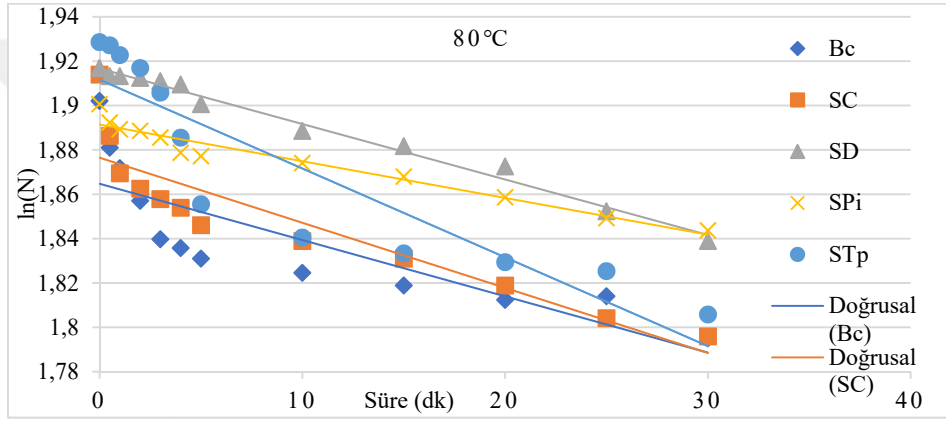
sürelerde (0.5 dk, 1 dk, 2 dk, 3 dk, 4 dk, 5 dk, 10 dk, 15 dk, 20 dk, 25 dk ve 30 dk) ısıtılma maruz bırakılan *B. coagulans* sporlarının canlılıkları verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı sıcaklık ve sürelerde *B. coagulans* sporlarının canlı kalma miktarları (log kob/mL)

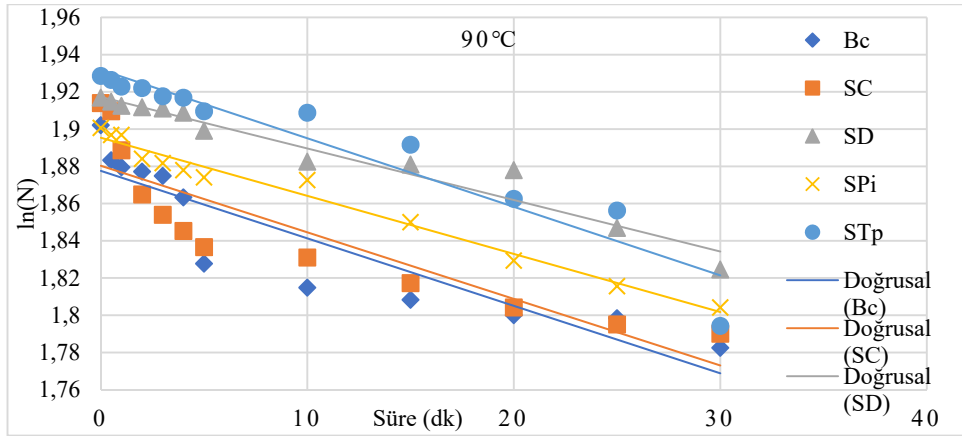
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Suş				
		Bc	SC	SD	SPi	STp
80	0.5	6.56±0.06 ^a	6.59±0.13 ^a	6.78±0.02 ^a	6.64±0.02 ^a	6.87±0.00 ^a
	1	6.50±0.01 ^a	6.49±0.01 ^{ab}	6.78±0.02 ^a	6.62±0.02 ^{ab}	6.84±0.01 ^a
	2	6.41±0.02 ^{ab}	6.44±0.06 ^{bc}	6.77±0.01 ^{ab}	6.61±0.06 ^{ab}	6.80±0.01 ^a
	3	6.29±0.01 ^{bc}	6.41±0.01 ^{bcd}	6.76±0.01 ^{ab}	6.59±0.01 ^{abc}	6.73±0.02 ^a
	4	6.27±0.06 ^{bc}	6.39±0.01 ^{bcd}	6.75±0.01 ^{ab}	6.55±0.04 ^{bcd}	6.59±0.06 ^{ab}
	5	6.24±0.03 ^{bc}	6.34±0.02 ^{cde}	6.69±0.03 ^b	6.53±0.04 ^{bcd}	6.39±0.08 ^{bc}
	10	6.20±0.01 ^{cd}	6.29±0.01 ^{def}	6.61±0.03 ^c	6.52±0.04 ^{cd}	6.30±0.04 ^{bc}
	15	6.17±0.02 ^{cd}	6.24±0.01 ^{ef}	6.57±0.04 ^{cd}	6.48±0.06 ^{de}	6.26±0.05 ^c
	20	6.13±0.05 ^{cd}	6.17±0.02 ^{fg}	6.51±0.06 ^d	6.42±0.05 ^{ef}	6.23±0.06 ^c
	25	6.14±0.04 ^{cd}	6.08±0.05 ^{gh}	6.38±0.09 ^e	6.36±0.05 ^{fg}	6.21±0.05 ^c
	30	6.02±0.01 ^d	6.03±0.04 ^h	6.29±0.04 ^f	6.32±0.06 ^g	6.09±0.15 ^c
90	0.5	6.58±0.06 ^a	6.75±0.01 ^a	6.79±0.01 ^a	6.67±0.02 ^a	6.87±0.01 ^a
	1	6.55±0.06 ^a	6.61±0.09 ^{ab}	6.77±0.03 ^a	6.67±0.02 ^a	6.84±0.01 ^a
	2	6.54±0.06 ^a	6.46±0.04 ^{bc}	6.77±0.02 ^a	6.58±0.03 ^{ab}	6.84±0.01 ^a
	3	6.52±0.06 ^a	6.39±0.01 ^{bcd}	6.76±0.01 ^a	6.57±0.04 ^b	6.81±0.02 ^a
	4	6.45±0.15 ^a	6.33±0.04 ^{cde}	6.75±0.02 ^a	6.54±0.03 ^b	6.80±0.01 ^a
	5	6.22±0.47 ^a	6.28±0.04 ^{cdef}	6.68±0.01 ^a	6.52±0.04 ^b	6.75±0.01 ^a
	10	6.14±0.55 ^a	6.24±0.06 ^{cdefg}	6.57±0.01 ^b	6.51±0.04 ^b	6.75±0.02 ^a
	15	6.1±0.61 ^a	6.16±0.04 ^{defg}	6.56±0.01 ^b	6.36±0.03 ^c	6.63±0.04 ^{ab}
	20	6.05±0.59 ^a	6.08±0.04 ^{efg}	6.54±0.04 ^b	6.23±0.06 ^d	6.44±0.01 ^b
	25	6.04±0.61 ^a	6.02±0.03 ^{fg}	6.34±0.06 ^c	6.15±0.05 ^{de}	6.40±0.08 ^b
	30	5.95±0.64 ^a	5.99±0.01 ^g	6.20±0.08 ^d	6.08±0.06 ^c	6.02±0.32 ^c
100	0.5	6.66±0.04 ^a	6.42±0.04 ^a	6.67±0.04 ^a	6.64±0.02 ^a	6.68±0.13 ^a
	1	6.62±0.01 ^a	6.38±0.01 ^a	6.56±0.14 ^a	6.62±0.02 ^a	5.80±0.01 ^b
	2	6.52±0.01 ^{ab}	6.33±0.01 ^a	6.44±0.03 ^a	6.60±0.03 ^a	5.46±0.19 ^{bc}
	3	6.49±0.01 ^{ab}	6.29±0.01 ^a	6.25±0.07 ^a	6.54±0.05 ^{ab}	5.36±0.18 ^{bc}
	4	6.38±0.01 ^b	6.27±0.01 ^a	6.03±0.14 ^a	6.55±0.04 ^{ab}	5.33±0.16 ^{bc}
	5	6.35±0.01 ^b	6.25±0.02 ^a	6.02±0.07 ^a	6.42±0.04 ^b	5.23±0.06 ^{bc}
	10	6.13±0.07 ^c	6.23±0.05 ^a	4.98±0.01 ^b	6.38±0.06 ^b	4.95±0.06 ^c
	15	5.74±0.04 ^d	6.17±0.05 ^a	4.85±0.01 ^b	5.88±0.02 ^c	4.75±0.07 ^{cd}
	20	5.72±0.03 ^d	6.03±0.22 ^a	4.73±0.04 ^b	5.84±0.04 ^c	4.17±0.08 ^d
	25	5.06±0.08 ^e	6.03±0.08 ^a	4.57±0.03 ^b	5.60±0.06 ^d	3.47±0.02 ^e
	30	4.91±0.04 ^e	4.97±0.01 ^b	4.46±0.06 ^b	5.47±0.02 ^d	3.24±0.08 ^e

^{a,b,c,d,e,f,g,h} Her sıcaklık değeri için aynı sütunda farklı üstel harflerle belirtilen değerler arasında istatistiksel olarak (p<0.05) önemli fark bulunmuştur. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

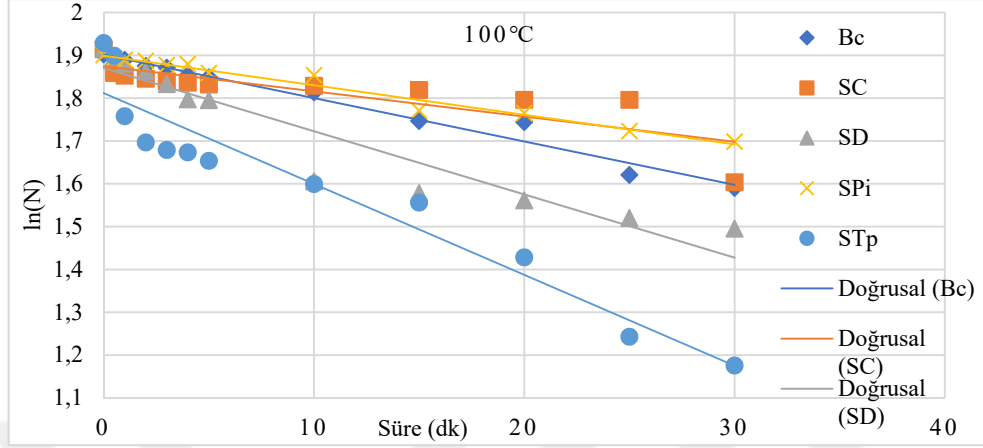
80°C ve 90°C ısıtılma süresince spor sayılarında 1 log kob/mL değerinden daha az azalma olduğu tespit edilmiş olup canlı kalma oranları izolatlar için %87-91 arasında, *B. coagulans* GBI-30, 6086 için %88 olarak belirlenmiştir. 100°C’de 30 dk uygulanan ısıtılma süresince en çok canlı hücre kaybının STp ve daha sonra SPi suşunda olduğu tespit edilmiştir. En az canlı hücre sayısı kaybı ise SC ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 suşlarında tespit edilmiştir. Suşların hayatta kalma eğrileri Şekil 4.2.-4.4’te verilmiştir.



Şekil 4.2. *B. coagulans* sporlarının 80°C’de termal ölüm eğrileri (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)



Şekil 4.3. *B. coagulans* sporlarının 90°C’de termal ölüm eğrileri (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)



Şekil 4.4. *B. coagulans* sporlarının 100°C'de termal ölüm eğrileri (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara paralel olarak, *Bacillus* sporlarının ısı dirençlerinin yüksek olduğu yapılmış birçok çalışmada tespit edilmiş olup, *Bacillus* sporlarının inaktivasyonu için ısıl işlemin yanı sıra ultrasonikasyon, basınç, düşük pH gibi uygulamaların da kullanılması gerektiği belirtilmiştir (Montville ve Sapers, 1981; Palop ve ark, 1997; Oomes ve ark, 2007; Lv ve ark, 2019; Wang ve ark, 2020). Ayrıca, aynı suşa ait sporların üretim koşullarındaki farklılıkların, sporların ısı direncini etkilediği belirtilmiştir (Setlow, 2006).

Bacillus sporlarının ısı, radyasyon ve kimyasal dirençleri üzerinde etkili birçok mekanizma bulunmaktadır. Spor merkezinin su içeriği, mineral iyonlarının miktarı ve tipi, spor proteinlerinin stabilitesi gibi faktörler sporların nemli sıcaklık uygulamasında gösterdikleri direnç üzerinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, sporulasyon koşulları (sıcaklık ve besiyeri), organizmanın fizyolojik durumu (sporlara ya da sporulasyon aşamasındaki hücrelere ısıl işlem uygulanması) ve ısıl işlem uygulanan ortamın koşulları (pH) bakteriyel sporların ısı direnci üzerinde etkili olan diğer faktörler olduğundan, sporların ısı direncinin kıyaslanması amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda aynı ya da benzer metotların kullanılması gerekmektedir (Setlow, 2006).

4.3. Bakterilerin D Değerleri

Çizelge 4.2’de ısıtım işlem sonuçları verilen bakteri sporlarının D değerleri hesaplanarak Çizelge 4.3’te verilmektedir.

Çizelge 4.3. Sporların farklı sıcaklıklarda ve sürelerde D değerleri

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Suş				
		Bc	SC	SD	SPi	STp
80	0.5	59.42±24.24 ^g	56.73±41.62 ^f	488.72±415.18 ^a	150.72±58.35 ^c	791.51±0.00 ^a
	1	76.17±5.47 ^g	51.78±1.27 ^f	977.45±830.37 ^a	212.79±60.51 ^c	421.29±149.36 ^{bcd}
	2	102.54±7.54 ^{fg}	90.79±15.49 ^f	1172.01±553.58 ^a	511.17±363.09 ^{bc}	400.02±71.12 ^{cd}
	3	110.80±1.99 ^{ef}	123.19±4.84 ^e	1249.15±442.86 ^a	463.33±66.02 ^{bc}	306.05±42.36 ^{cdef}
	4	140.11±19.05 ^{ef}	153.47±2.83 ^e	1300.19±369.05 ^a	433.34±106.79 ^{bc}	218.11±43.46 ^{ef}
	5	162.18±10.33 ^e	169.79±8.37 ^e	730.27±189.26 ^a	504.41±116.38 ^{bc}	159.62±26.54 ^f
	10	297.01±8.73 ^d	307.08±9.20 ^d	821.75±124.06 ^a	887.02±181.55 ^{ab}	262.19±20.05 ^{def}
	15	415.37±17.17 ^c	416.29±11.37 ^c	993.49±152.09 ^a	1106.59±332.72 ^a	363.86±30.23 ^{cde}
	20	515.23±46.39 ^b	484.60±17.54 ^b	1063.62±234.49 ^a	1115.57±204.99 ^a	465.89±42.62 ^{bc}
	25	654.76±42.83 ^a	525.66±39.00 ^b	914.00±204.05 ^a	1133.23±171.77 ^a	559.04±43.18 ^b
90	30	645.61±14.17 ^a	585.79±29.11 ^a	889.24±76.92 ^a	1228.90±193.27 ^a	573.17±113.78 ^b
	0.5	70.32±36.09 ^a	292.14±137.99 ^d	586.58±276.79 ^a	480.81±408.47 ^a	593.49±280.05 ^{bc}
	1	109.57±41.76 ^a	109.43±64.39 ^c	938.30±885.73 ^a	961.62±816.94 ^a	421.29±149.36 ^c
	2	199.71±77.92 ^a	94.32±10.52 ^e	1093.73±664.29 ^a	287.34±74.48 ^a	710.58±112.02 ^{bc}
	3	267.01±85.01 ^a	115.01±2.12 ^e	1249.15±442.86 ^a	381.64±108.93 ^a	656.61±186.69 ^{bc}
	4	286.77±169.71 ^a	134.73±13.15 ^c	1225.63±474.49 ^a	413.59±78.86 ^a	800.05±142.25 ^{abc}
	5	298.91±296.36 ^a	149.12±10.85 ^c	651.19±77.42 ^a	443.51±90.78 ^a	607.15±66.68 ^{bc}
	10	523.26±527.04 ^a	279.03±30.47 ^d	670.47±41.94 ^a	836.59±162.10 ^a	1176.58±186.70 ^a
	15	775.41±803.96 ^a	357.73±21.25 ^{cd}	962.93±57.77 ^a	685.36±60.25 ^a	947.02±163.68 ^{ab}
	20	791.51±745.06 ^a	419.99±22.26 ^{bc}	1197.50±199.21 ^a	651.56±83.03 ^a	697.17±23.16 ^{bc}
100	25	986.07±936.02 ^a	484.54±19.15 ^{ab}	828.32±105.48 ^a	680.36±64.48 ^a	809.06±148.24 ^{abc}
	30	927.37±821.03 ^a	557.69±10.63 ^a	755.72±111.91 ^a	720.38±78.24 ^a	553.98±217.08 ^{bc}
	0.5	247.36±194.79 ^a	20.91±2.08 ^g	59.47±15.73 ^d	150.72±58.35 ^d	49.08±31.61 ^{bc}
	1	180.97±15.15 ^a	37.39±0.67 ^{fg}	77.13±47.45 ^{cd}	212.79±60.51 ^{cd}	13.49±0.19 ^e
	2	169.63±13.51 ^a	67.09±2.18 ^{fg}	84.93±6.86 ^{cd}	357.79±113.17 ^{abc}	20.04±3.02 ^{de}
	3	222.43±7.79 ^a	92.12±2.76 ^{fg}	82.61±11.08 ^{cd}	310.69±100.33 ^{bcd}	27.89±3.83 ^{cde}
	4	188.39±8.53 ^a	117.83±3.39 ^{fg}	78.04±15.21 ^{cd}	456.68±139.80 ^{ab}	36.29±4.15 ^{cde}
	5	214.76±8.91 ^a	140.18±5.79 ^{ef}	94.91±9.15 ^{bcd}	276.62±36.31 ^{bcd}	41.88±1.85 ^{cd}
	10	261.07±33.86 ^a	270.74±25.20 ^{cd}	73.92±0.67 ^{cd}	493.72±92.23 ^a	69.97±2.43 ^{ab}
	15	222.25±8.81 ^a	364.46±30.77 ^{bc}	101.89±0.44 ^{bc}	265.97±7.39 ^{cd}	92.76±3.71 ^a
100	20	291.34±9.11 ^a	408.27±125.49 ^{ab}	129.49±0.54 ^{ab}	339.36±18.14 ^{abc}	92.03±3.74 ^a
	25	204.59±11.17 ^a	490.35±53.60 ^a	144.86±2.26 ^a	324.15±18.41 ^{abcd}	83.93±0.75 ^a
	30	221.56±5.12 ^a	222.43±2.04 ^{dc}	163.84±4.93 ^a	341.60±6.56 ^{abc}	91.77±3.19 ^a

a,b,c,d,e,f,g Her sıcaklık değeri için aynı sütunda farklı üstel harflerle belirtilen değerler arasında istatistiksel olarak (p<0.05) önemli fark bulunmuştur. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

Ayrıca R programında “ggplot2” paketi ile suşların termal ölüm eğrileri çizilerek (Ek 3) termal ölüm sabitleri (k) hesaplanmıştır. Elde edilen verilere göre termal ölüm sabitleri (k) Çizelge 4.4’te verilmiştir. Genel olarak sıcaklığın artmasıyla sporların k değerlerinin arttığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. *B. coagulans* sporlarının k (sa⁻¹) değerleri

Sıcaklık (°C)	Bc	SC	SD	SPi	STp
80	0.15±0.00 ^{abA}	0.17±0.00 ^{abA}	0.15±0.03 ^{abA}	0.09±0.02 ^{aA}	0.24±0.04 ^{bA}
90	0.22±0.00 ^{aA}	0.21±0.00 ^{aA}	0.17±0.03 ^{aA}	0.19±0.02 ^{ab}	0.22±0.09 ^{aA}
100	0.61±0.03 ^{aA}	0.48±0.14 ^{aA}	0.89±0.00 ^{bB}	0.41±0.01 ^{aC}	1.27±0.00 ^{cB}

^{a,b,c} Aynı satırda farklı üstel harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak (p<0.05) birbirinden farklıdır. ^{A,B,C} Aynı sütunda farklı üstel harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak (p<0.05) birbirinden farklıdır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

Probiyotik gıdaların üretimi ve tüketime hazır hale getirilmesi aşamalarında belirli bir konsantrasyonun üzerinde probiyotik mikroorganizmanın canlılığını devam ettirmesi gerekmektedir. Gıdaların işlenmesi ve hazırlanması aşamalarında maruz kaldığı uygulamalardan sonra gıdada bulunan probiyotik mikroorganizma canlılığını tahmin edebilmek amacıyla termal inaktivasyon kinetikleri kullanılmaktadır. Benzer şekilde Li ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, sütte bulunan bakterilerin süre uygulanan kurutma işleminden sonra canlı kalma oranlarını tahmin edebilmek amacıyla kinetik model oluşturulmuş ve elde edilen sonuçların deneysel sonuçlar ile uyumlu olduğu belirtilmiştir. Bu sebeple yapmış olduğumuz çalışma ısı işlem uygulanan probiyotik gıdaların üretiminde kullanılabilecek *B. coagulans* suşlarının uygulanan sıcaklık ve sürelerden etki derecelerini göstermesi açısından önemlidir.

Bakterilere 80°C sıcaklık uygulanması ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde, izole edilen *B. coagulans*’ların k değerleri ile *B. coagulans* GBI-30, 6086’nın k değeri arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmadığı

belirlenmiştir. 80°C’de SPi ve STp bakterileri arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu tespit edilmiştir. 90°C sıcaklık uygulamasında elde edilen k değerlerine bakıldığında, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile izole edilen bakteriler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olmadığı tespit edilmiştir. 100°C sıcaklık uygulaması sonuçlarına bakıldığında ise, SD ve STp bakterilerinin hem birbirleri arasında hem de diğer bakteriler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu gözlenmiştir. Üç farklı sıcaklık uygulaması için bakıldığında izolatlar arasında en yüksek k değerine sahip bakterinin STp olduğu tespit edilmiştir. Termal ölüm sabitini ifade etmekte olan k değeri ne kadar yüksek ise mikroorganizmaların canlılığı o kadar düşük olmaktadır (Ünal Turhan ve ark, 2017b).

4.4. *Bacillus coagulans* Suşlarının Düşük pH’larda Gelişim Özellikleri

Başlangıç konsantrasyonu 6 log kob/mL olarak ayarlanan *B. coagulans* suşlarının pH dirençlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlem sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.5’te verilmektedir.

pH 1 olan ortamda inkübe edilen SD ve STp’nin canlılıklarının hem 1 sa hem de 3 sa inkübasyon sonunda *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile istatistiksel olarak benzer olduğu tespit edilmiştir. pH 1 olan ortamda *B. coagulans* GBI-30, 6086 hücre sayısı 1 sa inkübasyonun ardından %33 azalırken, 3 sa inkübasyonun ardından önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. pH 1’de en fazla canlı hücre kaybı 3 saat inkübasyonun ardından SC’de (%67) gözlenirken, 1 sa inkübasyonun ardından ise hücre sayısında %66 azalma olduğu gözlenmiştir. SC’nin ardından pH 1’de en fazla hücre kaybı SPi’de (%57) 3 sa inkübasyon sonunda tespit edilmiştir. SD bakterisi için, pH 1 olan ortamda 3 saat inkübasyonun ardından hücre sayısında %50 azalma gözlenmiştir. İzole edilen bakteriler arasında pH 1 değerinde en az azalma ise STp bakterisinde gözlenmiş olup, 1 sa sonunda %28, 3 sa sonunda %41 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. *B. coagulans* suşlarının pH dirençleri (log kob/mL)

pH	Süre (saat)	Bc	SC	SD	SPi	STp
1	1	4.00±0.14 ^{ac}	2.00±0.14 ^d	3.47±0.18 ^{bc}	2.81±0.04 ^b	4.31±0.11 ^a
	3	4.00±0.08 ^a	1.95±0.14 ^c	3.00±0.28 ^{abc}	2.55±0.07 ^{bc}	3.50±0.71 ^{ab}
2	1	4.00±0.28 ^a	2.00±0.21 ^b	4.07±0.18 ^a	4.52±0.41 ^a	4.65±0.07 ^a
	3	5.00±0.28 ^a	1.95±0.21 ^d	3.93±0.25 ^{bc}	3.22±0.11 ^b	4.52±0.32 ^{ac}
3	1	5.00±0.35 ^{bd}	6.00±0.14 ^{bc}	4.66±0.29 ^d	6.50±0.28 ^{ac}	5.95±0.21 ^{bc}
	3	5.00±0.14 ^{bc}	6.00±0.28 ^a	4.46±0.04 ^c	5.60±0.14 ^{ab}	5.69±0.13 ^a
4	1	6.00±0.07 ^a	6.20±0.14 ^a	5.65±0.21 ^a	5.72±0.11 ^a	6.06±0.23 ^a
	3	5.68±0.31 ^a	6.10±0.56 ^a	4.80±0.42 ^a	5.22±0.39 ^a	5.95±0.35 ^a

^{a,b,c,d} Aynı satırda farklı üstel harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak ($p<0.05$) birbirinden farklıdır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

pH 2 olan ortamlarda inkübe edilen STp'nin 3 sa inkübasyon sonunda canlı kalma miktarının *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile benzer olduğu gözlenmiş, bu sırada SC'nin canlılığında önemli miktarda (%67) düşüş tespit edilmiş olup, *B. coagulans* GBI-30, 6086 canlılığında ise %16 seviyesinde bir düşüş gözlenmiştir. İzole edilen bakteriler arasında pH 2 olan ortamda 3 sa inkübasyon sonunda hücre sayısında en az düşüş STp'de (%24) gözlenmiştir.

B. coagulans GBI-30, 6086 canlılığının pH 3 olan ortamda 1 saat inkübasyon sonunda istatistiksel olarak SC, SD ve STp suşlarının canlılıkları ile benzer oldukları tespit edilmiş olup, bu bakterilerin hücre sayılarında önemli bir düşüş gözlenmemiştir. pH 3'de hücre sayısında en fazla azalma oranı SD'de gözlenmiş olup, 1 sa inkübasyon sonunda %22 azalma, 3 sa inkübasyon sonunda ise %25 azalma olduğu bulunmuştur.

pH 4 olan ortamlarda 1 ve 3 sa inkübasyon sonunda bakterilerin canlı kalma oranları ayrı ayrı incelendiğinde, bakterilerin canlılıkları arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir. Hücre sayısında en fazla düşüş SD'de tespit edilmiş olup 1 saat inkübasyon sonunda %5 azalma, 3

sa inkübasyon sonunda ise %20 azalma gözlenmiştir. SD'nin ardından en fazla hücre kaybı 1 sa ve 3 sa inkübasyon sonunda sırasıyla %4 ve %13 azalmanın tespit edildiği SPi'de gözlenmiştir.

Sindirim sırasında midenin pH'sı 1'e kadar düşebilmekte olduğundan probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların düşük pH olan ortamda canlılıklarını korumaları beklenmektedir (Senaka Ranadheera ve ark, 2012; Ruiz ve ark, 2013).

Hyronimus ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, pH'nın 2.5 ve 3 olduğu ortamlarda 3 sa ve 6 sa inkübasyon sonunda *B. coagulans* BCI₄, *B. coagulans* CIP5264, *B. coagulans* CIP6625 ve diğer bazı *Bacillus* spp.'lerin canlılıkları belirlenmiştir. Başlangıç konsantrasyonunun 2×10^6 kob/mL olduğu örneklerde pH 2.5 olan ortamda sadece *B. laevolacticus* DSM6475'in direnç gösterdiği, 3 sa inkübasyon sonunda canlı kalma oranının pH 2.5 için %86, pH 3 için %100 olduğu rapor edilmiş olup, diğer bakterilerin ise bu pH'ya duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda izole edilmiş *B. coagulans*'lardan üçünün daha önce Jeon ve arkadaşları (2017) tarafından yapılmış bir çalışmada kullanılan *B. polyfermenticus* SCD (%32) ve *B. subtilis* P229'un (%67) pH 2.5 olan ortamda 3 sa inkübasyonun sonunda elde edilen canlılıklarından daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

4.5. *B. coagulans* Kültürlerinin Safra Tuzuna Karşı Dirençlilikleri

Bakteri hücrelerinin safra tuzu dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla başlangıçta 6 log kob/mL konsantrasyonunda bulunan bakterilerin %0.3 ve %0.5 safra tuzu içeren tüplerde 1 ve 3 sa 37°C'de inkübe edilmesinin ardından kalan canlı bakteri sayısı Çizelge 4.6'da verilmektedir.

Çizelge 4.6. *B. coagulans* suşlarının safra tuzu dirençleri (log kob/mL)

Safra Tuzu (%)	Süre (sa)	Bc	SC	SD	SPi	STp
0.3	1	4.31±0.06 ab	2.91±0.81 b	4.47±0.44 ab	4.00±0.14 ab	4.69±0.08 a
	3	4.30±0.28 a	3.02±0.17 a	4.16±0.06 a	3.00±0.71 a	3.78±0.11 a
0.5	1	4.84±0.19 a	TE	4.42±0.17 a	3.00±0.28 b	3.25±0.35 b
	3	4.48±0.11 a	TE	4.16±0.15 a	TE	2.30±0.28 b

a,b,c,d Aynı satırda farklı üstel harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak ($p<0.05$) birbirinden farklıdır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086; TE: Tespit edilemedi)

Elde edilen sonuçlara göre, %0.3 safra tuzu içeren tüplerde 1 sa inkübe edilen bakterilerden SC'nin canlı kalma miktarının diğerlerine göre oldukça düşük olduğu tespit edilmiş olup hücre sayısında %50 azalma gözlenmiştir. SD, SPi ve STp suşlarının canlılıklarının ise hücre sayısında %28 azalma gerçekleşmiş olan *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile istatistiksel olarak benzer olduğu bulunmuştur. Safra tuzu konsantrasyonu %0.3 olan ortamlarda 3 sa inkübasyon sonunda SC ve SPi'nin canlı kalma oranları %50 olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile izole edilen bakteriler arasında önemli farklılık olmadığı gözlenmiştir.

Safra tuzu konsantrasyonu %0.5 olan ortamlarda ise 1 sa inkübasyon sonunda SPi ve STp'nin istatistiksel olarak *B. coagulans* GBI-30, 6086'dan önemli derecede farklı olduğu belirlenmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086 canlılığında %19 azalma gözlenmişken, SPi'de %50, STp'de ise %45 azalma gözlenmiştir. SD'nin ise istatistiksel olarak *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile benzer olduğu tespit edilmiş ve canlılığındaki azalmanın %26 olduğu belirlenmiştir. 1 ve 3 sa inkübasyon

sonunda SC tespit edilememiş olup, 3 sa sonunda SPi de tespit edilememiştir. SD'nin canlılığındaki azalma ise 3 sa inkübasyon sonunda %38 olarak belirlenmiş olup istatistiksel olarak *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile benzer oldukları gözlemlenmiştir.

Sindirim sırasında sindirim sisteminde bulunan safra tuzlarının antimikrobiyel etkileri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların safra tuzu içeren ortamlarda canlılıklarını korumaları beklenmektedir (Senaka Ranadheera ve ark, 2012; Ruiz ve ark, 2013). Safra tuzlarının canlı hücreler üzerinde öldürücü etkisi olmasına rağmen probiyotikler safra tuzuna karşı bir direnç mekanizması geliştirmiştir (Noriega ve ark, 2004).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer şekilde Sui ve arkadaşları (2020) yaptıkları bir çalışmada, *B. coagulans* T242'nin canlılığının %0.3 safra tuzu içeren ortamda 3 sa inkübasyon sonunda %52 olduğu, %0.5 safra tuzu içeren ortamda 3 sa inkübasyon sonunda ise %0 olduğu belirtilmiştir. Sporların safra tuzu dirençlerinin vejetatif hücrelere göre daha fazla olması ve sindirim sisteminde bulunan safra tuzu konsantrasyonu sindirimden 1 sa sonra %0.3 olmasından dolayı çalışmamızda izole ettiğimiz *B. coagulans*'ların çalışmamızın bu aşamasında potansiyel probiyotik bir bakterinin taşınması gereken özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir (Noriega ve ark, 2004; Jeon ve ark, 2017).

Hyronimus ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, başlangıç konsantrasyonları 10^6 kob/mL olan *B. coagulans*'ların safra tuzuna dirençleri araştırılmış ve bu amaçla %0.3 safra tuzu içeren ortamda inkübe edilmiştir. Safra tuzu içeren ortama *B. coagulans* BCI₄'ün zayıf tolerans gösterdiği, *B. coagulans* CIP5264 ve *B. coagulans* CIP6625'in ise duyarlı olduğu belirtilmiştir.

4.6. Lizozim dirençlilikleri

Bakterilerin lizozim dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlem sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.7’de verilmektedir. Sonuçlar % kontrol tüpüne göre azalma olarak hesaplanmıştır. Lizozim direnci açısından bütün bakteriler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu tespit edilmiştir. Lizozim direnci en yüksek bakterinin SD olduğu ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile kıyaslanabilir özellikte olduğu tespit edilmiş olup onu SPi ve STp izlemektedir. En düşük lizozim direnci ise SC’de tespit edilmiştir. Antimikrobiyel etkisi nedeniyle lizozim direncinin probiyotikler için önemli bir kriter olduğu belirtilmiştir (Rada ve ark, 2010).

Çizelge 4.7. Bakterilerin lizozim dirençleri

Bakteri	Azalma (%)
SD	2.97±1.90 ^a
SPi	10.19±2.47 ^b
STp	17.06±1.56 ^c
<i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086	32.34±3.06 ^d
SC	38.76±1.11 ^e

^{a,b,c,d,e} Aynı sütunda farklı üstel harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak ($p<0.05$) birbirinden farklıdır.

4.7. Biyofilm Üretim Özellikleri

Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8’de verilmektedir. En yüksek biyofilm üretme özelliği *B. coagulans* GBI-30, 6086 suşunda tespit edilmiş olup istatistiksel olarak SC, SPi ve STp’nin ürettiği biyofilm miktarlarının benzer olduğu belirlenmiştir. En düşük biyofilm üretiminin ise SD’de olduğu tespit edilmiştir. SD tarafından üretilen biyofilm miktarının da istatistiksel olarak SPi, STp ve SC ile benzer olduğu sonucuna varılmıştır. Kontrol olarak kullanılan kuyucuklarda sonuç 0.08 ± 0.01 olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde Mohkam ve arkadaşları (2016) ile Coleri Cihan ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmalarda *Bacillus* spp.'nin biyofilm üretimi doğrulanmıştır.

Çizelge 4.8. Bakterilerin biyofilm üretimleri

Bakteri	Absorbans
<i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086	0.29±0.05 ^a
SPi	0.23±0.01 ^{ab}
STp	0.20±0.03 ^{ab}
SC	0.19±0.01 ^{ab}
SD	0.13±0.01 ^b

^{a,b} Aynı kolonda farklı üstel harflerle belirtilen veriler istatistiksel olarak ($p<0.05$) birbirinden farklıdır.

Biyofilm üretim özelliği probiyotiklerin taşınması gereken önemli bir özellik olarak bilinmektedir. Probiyotikler tarafından üretilen biyofilmlerin patojenlerin gelişimi üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu ve sindirim sisteminde probiyotiklerin kolonizasyonuna olumlu etkide bulunduğu bilinmektedir (Salas-Jara ve ark, 2016; Ünal Turhan ve ark, 2017c). Yüzey biyofilmi veya hızlı dendritik (dallanmış) büyüme, *Bacillus* suşlarının yüzeylerinin kurumasını önleyerek besinlere daha iyi erişmesine veya istenen kolonizasyon bölgelerini bulmasına izin vermektedir. *Bacillus* suşlarında hareketlilik özelliği, sindirim sistemi gibi çeşitli ortamlarda biyofilm oluşumuna katkı sağlamaktadır (Mohkam ve ark, 2016).

4.8. Ekzopolisakkarit Üretme Özellikleri

Öncelikle mMRS broth besiyerinde geliştirilmiş ve ardından mMRS agar besiyerinde 30°C'de 6 gün inkübasyona bırakılan bakteri kolonilerinin mukoid yapıda olmasından dolayı ekzopolisakkarit üretimlerinin pozitif olduğu sonucuna varılmıştır.

Probiyotik bakteriler için ekzopolisakkarit üretimi önemli bir özellik olmakla birlikte, ticari olarak da önemli olan fizyolojik ve terapötik özellikleri bulunmaktadır. *B. coagulans*'ların ekzopolisakkarit üretimi üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır (Kodali ve Sen, 2008; Kodali ve ark, 2009; Kodali ve ark, 2011).

4.9. Antibakteriyel Özellikleri

B. coagulans GBI-30, 6086 ve çalışmada izole edilen *B. coagulans* suşlarının test kültürleri olan *B. cereus*, *E. coli* NCTC 12241, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *Salmonella* spp. üzerinde antibakteriyel aktiviteleri tespit edilmiştir. Çizelge 4.9'da *B. coagulans* suşlarının ve test kültürlerinin birlikte inkübe edilmesi sonucunda elde edilen test kültürü sayısı ve kontrol tüpleri olarak kullanılmış olan TSB besiyerinde sadece test kültürlerinin geliştirilmesiyle elde edilen hücre sayıları verilmiştir. Ayrıca elde edilen verilerden test kültürü sayısındaki azalma % olarak hesaplanarak çizelgede verilmiştir.

B. cereus sayısının *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile 7.30 log kob/mL değerinden 7.02 log kob/mL değerine kadar düşebildiği tespit edilmiştir. *B. cereus* sayısındaki en fazla azalmanın ise SD ile olduğu tespit edilmiştir. *E. coli* NCTC 12241 sayısında en fazla azalmanın STp ile olduğu ve 9.23 log kob/mL değerinden 8.85 log kob/mL değerine düştüğü belirlenmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile inkübe edilen *E. coli* NCTC 12241 sayısının ise 9.23 log kob/mL değerinden 9.00 log kob/mL değerine düştüğü gözlenmiştir.

Çizelge 4.9. *B. coagulans*'ların antibakteriyel etkinliği (log kob/mL)

Test Kültürü	<i>B. coagulans</i>	TKS	Kontrol TKS	TKS'de azalma (%)
<i>B. cereus</i>	Bc	7.02	7.30	3.83
	SC	6.75		7.53
	SD	6.63		9.18
	SPi	6.89		5.62
	STp	6.83		6.44
<i>E. coli</i> NCTC 12241	Bc	9.00	9.23	2.49
	SC	8.94		3.14
	SD	9.02		2.27
	SPi	8.86		4.01
	STp	8.85		4.12
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	Bc	8.60	8.72	1.38
	SC	8.64		0.92
	SD	8.39		3.78
	SPi	7.15		18.00
	STp	8.46		2.98
<i>Salmonella</i> spp.	Bc	8.30	9.06	8.39
	SC	8.30		8.39
	SD	8.13		10.26
	SPi	7.90		12.80
	STp	8.00		11.69

(Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086; TKS: test kültürü sayısı)

Test kültürleri arasında hücre sayısında en fazla düşüş *L. monocytogenes* ATCC 7644'te gözlenmiş olup, onu SD takip etmektedir. SPi ile inkübe edilen *L. monocytogenes* ATCC 7644'ün hücre sayısının 8.72 log kob/mL'den 7.15 log kob/mL'ye düştüğü tespit edilmiştir. Test kültürleri arasında hücre sayısındaki en

az düşüş de *L. monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde tespit edilmiş ve SC kültürü ile yapılan inkübasyon sonucunda elde edilmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile inkübe edilen *L. monocytogenes* ATCC 7644 sayısının 8.72 log kob/mL değerinden 8.60 log kob/mL değerine düştüğü gözlenmiştir. *Salmonella* spp. hücreleri üzerinde en fazla inhibisyon etkisinin SPi tarafından yapıldığı, hücrelerin 9.06 log kob/mL değerinden 7.90 log kob/mL değerine düştüğü tespit edilmiştir. *Salmonella* spp. üzerinde en az inhibisyon etkisinin ise *B. coagulans* GBI-30, 6086 ve SC bakterileri tarafından yapıldığı, hücre sayılarının 9.06 log kob/mL değerinden 8.30 log kob/mL değerine düştüğü gözlenmiştir.

Test kültürlerinin hücre sayılarında azalmanın % olarak ifadeleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmeleri Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Bakterilerin test kültürleri üzerindeki inhibisyon etkileri (%)

<i>B. coagulans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> NCTC 12241	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Salmonella</i> spp.
Bc	3.83±2.91 ^a	2.49±1.53 ^a	1.38±0.32 ^a	8.39±7.80 ^a
SC	7.53±3.29 ^a	3.14±0.77 ^a	0.92±0.49 ^a	8.39±4.06 ^a
SD	9.18±3.29 ^{ab}	2.27±0.76 ^b	3.78±1.62 ^{ab}	10.26±0.47 ^a
SPi	5.62±1.16 ^b	4.01±1.07 ^b	18.00±1.13 ^a	12.80±1.72 ^a
STp	6.44±1.36 ^{ab}	4.12±0.92 ^b	2.98±1.29 ^b	11.69±1.56 ^a

^{a,b,c} Aynı satırda farklı üstel harfle gösterilen değerler istatistiksel olarak ($p < 0.05$) birbirinden farklıdır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

B. coagulans GBI-30, 6086 tarafından test kültürleri üzerinde gösterilen inhibisyon etkisinin istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir. SC izolatının da farklı test kültürleri üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisinin birbirleriyle istatistiksel olarak benzer olduğu sonucuna varılmıştır. SD'nin *E. coli* NCTC 12241 ve *Salmonella* spp. üzerindeki inhibisyon etkisinin istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. SPi'nin *B. cereus* ve *E.*

coli NCTC 12241 üzerindeki inhibisyon etkisinin *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *Salmonella* spp. üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisinden istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. STp'nin *Salmonella* spp. üzerinde gösterdiği antibakteriyel aktivitesinin *E. coli* NCTC 12241 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde gösterdiği aktiviteden istatistiksel olarak farklı olduğu ve *B. cereus* üzerinde gösterdiği antibakteriyel aktiviteyle benzer olduğu sonucuna varılmıştır.

Probiyotik mikroorganizmaların sindirim sisteminde bulunan patojenlerin gelişimi üzerinde inhibe edici etki göstermesi beklenmektedir. Diğer araştırmacılar tarafından yapılmış çeşitli çalışmalarda *Bacillus* spp.'nin patojenlerin gelişimini önleyici etkileri olduğu tespit edilmiştir. Yılmaz ve arkadaşları (2006) tarafından yapılmış benzer bir çalışmada topraktan izole edilmiş olan *Bacillus* spp.'lerin antimikrobiyel aktiviteleri agar kuyu difüzyon metodu ile değerlendirilmiştir. Çalışmada patojen kültürler olarak *S. aureus* ATCC 25923, *P. fluorescens* RSKK 240, *M. flavus*, *B. megaterium* RSKK 578, *B. thuringiensis* RSKK 380 ve *B. cereus* F2 kullanılmıştır. Çalışmada antimikrobiyel aktiviteleri analiz edilen 29 *Bacillus* spp.'den 5 adedinin patojen kültürler üzerinde inhibe edici aktivitesi olduğu belirlenmiş olup, bunların da kullanılan patojen kültürüne göre değiştiği belirlenmiştir. Majeed ve arkadaşları (2016b) tarafından yapılan bir çalışmada *B. coagulans* MTCC 5856'nın Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiştir. Sui ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada *B. coagulans* T242 'nin *E. coli* gelişimini inhibe edici etkisi olduğu rapor edilmiştir. Kim ve arkadaşları (2021) yaptıkları bir çalışmada, *B. coagulans*'ın patojenler üzerinde inhibe edici etkisi araştırılmış fakat *L. monocytogenes* ve *Salmonella* Typhimurium gelişimlerinin inhibe edilemediği belirtilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise *L. monocytogenes* ATCC 7644'ün gelişimi %0.9–18 arasında, *Salmonella* spp.'nin gelişimi ise %8–12 arasında inhibe edilmiştir. Elde edilen bu farklı sonuçların farklı suşların kullanımından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

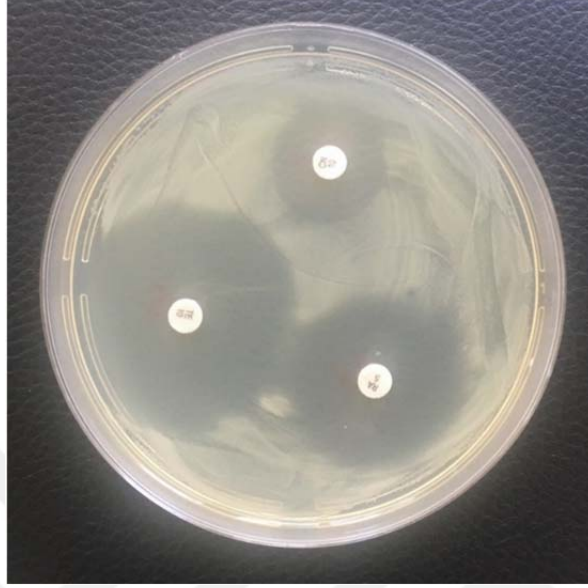
4.10. Antibiyotik Dirençlilikleri

B. coagulans'ların antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla, antibiyotik disklerinin (Şekil 4.5) kullanılarak yapıldığı işlemde bakterilerin oluşturduğu inhibisyon zon çapları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Suşların inhibisyon zonları

Antibiyotikler	Bc	SC	SD	SPi	STp
Ampisilin	2.20±0.28 ^a	3.50±0.14 ^b	2.80±0.14 ^a _b	3.50±0.14 ^b	3.30±0.14 ^b
Eritromisin	1.50±0.14 ^a _b	2.70±0.14 ^c	1.90±0.14 ^b	2.30±0.14 ^b _c	2.40±0.14 ^b _c
Gentamisin	1.45±0.21 ^a	2.05±0.07 ^a _b	1.40±0.14 ^a	2.60±0.00 ^b	2.65±0.35 ^b
Kanamisin	1.70±0.00 ^a	2.10±0.14 ^a _b	2.00±0.00 ^a _b	2.60±0.28 ^b	2.60±0.14 ^b
Klindamisin	2.50±0.14 ^a	3.10±0.14 ^b _c	2.70±0.00 ^a _b	3.30±0.14 ^c	3.50±0.07 ^c
Kloramfenikol	2.10±0.56 ^a	3.25±0.21 ^a _b	2.30±0.14 ^a	3.90±0.14 ^b	3.80±0.14 ^b
Rifampin	2.20±0.56 ^a	2.85±0.07 ^a	2.50±0.28 ^a	3.10±0.14 ^a	3.00±0.28 ^a
Siprofloksasin	1.70±0.14 ^a	3.30±0.28 ^b _c	2.70±0.14 ^a _b	4.20±0.56 ^c	4.10±0.42 ^c
Streptomisin	2.00±0.28 ^a	2.70±0.07 ^b	2.50±0.14 ^a _b	3.00±0.00 ^b	2.90±0.14 ^b
Tetrasiklin	1.90±0.11 ^a	4.05±0.07 ^c	3.05±0.07 ^b	4.50±0.14 ^c	4.05±0.21 ^c
Vankomisin	1.90±0.14 ^a	2.90±0.14 ^b	2.70±0.28 ^b	3.10±0.14 ^b	3.00±0.14 ^b

^{a,b,c} Aynı satırda farklı üstel farklı üstel harfle gösterilen değerler istatistiksel olarak (p<0.05) birbirinden farklıdır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)



Şekil 4.5. Antibiyotik direnç testi

Zon çaplarına göre bakterilerin kullanılan antibiyotiklere duyarlılık miktarları ise Çizelge 4.12’de verilmektedir. Sonuçlara göre, bütün izolatların antibiyotiklere duyarlı oldukları tespit edilmiştir. En yüksek duyarlılığın SPi tarafından tetrasikline karşı olduğu belirlenmiş olup, SC ve STp ile benzer oldukları sonucuna varılmıştır. Diğer bakterilere göre *B. coagulans* GBI-30, 6086’nın gentamisin hariç diğer antibiyotiklere karşı en az duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile SD’nin ampisiline gösterdikleri direncin istatistiksel olarak benzer olduğu belirlenmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile SD, SPi ve STp’nin eritromisin ile oluşturdukları zon çaplarının istatistiksel olarak benzer olduğu tespit edilmiştir. Kanamisin ve kloramfenikole gösterilen direnç olarak bakıldığında *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile SC ve SD’nin, klindamisin, siprofloksasin ve streptomisine gösterilen direnç olarak bakıldığında *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile SD’nin istatistiksel olarak benzer olduğu gözlenmiştir. Rifampine karşı gösterilen direncin bakteriler arasında istatistiksel açıdan farklı olmadığı

tespit edilmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086'nın vankomisine gösterdiği direncin diğer bakterilerden istatistiksel olarak farklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.12. İnhibisyon zonlarına göre antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotikler	Bc	SC	SD	SPi	STp
Ampisilin	D++	D+++	D+++	D+++	D+++
Eritromisin	D+	D+++	D++	D++	D++
Gentamisin	D+	D++	D+	D+++	D+++
Kanamisin	D++	D++	D++	D+++	D+++
Klindamisin	D++	D+++	D+++	D+++	D+++
Kloramfenikol	D++	D+++	D++	D+++	D+++
Rifampin	D++	D+++	D++	D+++	D+++
Siprofloksasin	D++	D+++	D+++	D+++	D+++
Streptomisin	D++	D+++	D++	D+++	D+++
Tetrasiklin	D++	D+++	D+++	D+++	D+++
Vankomisin	D++	D+++	D+++	D+++	D+++

Benzer bir çalışmada, *B. coagulans* GBI-30, 6086'nın güvenilirliği incelenmiş ve antibiyotik direncine sahip olduğu tespit edilmiştir. Fakat antibiyotik direncinin kolay bir şekilde diğer bakterilere aktarılamadığı, dolayısıyla güvenlik açısından potansiyel bir risk oluşturmadığı sonucuna varılmıştır (Salveti ve ark, 2016). Mohkam ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* izolatlarının penisilin ve ampisiline dirençli oldukları tespit edilmiş ve bu direnç penisilin bağlayıcı proteinler veya β -laktamaz geni ile ilişkilendirilmiştir. *Bacillus* izolatlarının bu direncinin *Bacillus*'lara özgü olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca *Bacillus* izolatlarından plazmid izole edilemediği, buradan yola çıkılarak bu direncin konjugasyonla aktarılamadığı ifade edilmiştir. *Bacillus*'larda plazmid bulunmasının genellikle antibiyotik direnci ve toksin üretimiyle ilişkilendirildiği belirtilmiştir.

Nithya ve Halami (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. flexus* Hk1'in penisilin, metisilin ve ampisiline dirençli olduğundan yola çıkılarak bakterinin. β -laktam antibiyotiklerinin penisilin grubuna dirençli olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan *B. coagulans*'ın penisilin ve metisiline dirençli olduğu, ampisiline ise orta derecede duyarlı olduğu belirtilmiştir. Her iki bakterinin de ko-trimoksazol direnci gösterdikleri ifade edilmektedir. Bu bakterilerin β -laktam antibiyotiklerine direnç göstermelerinin β -laktamaz ve antibiyotik hidrolizinden kaynaklı olabileceği, ya da hücrel geçirgenlik ve penisilin bağlayan proteinlerin mutasyonu sonucunda ortaya çıkmış olabileceği rapor edilmiş olup, bu durumu açıklamak için daha ileri çalışmaların yapılmasının gerektiği belirtilmiştir. Ancak spesifik bir antibiyotiğe direnç gösteren *Bacillus* suşları antibiyotik tedavisi sırasında verilebildiğinden, bu suşların bir dizi antibiyotiğe karşı gösterdiği içsel direnç ve duyarlılıklarının önemli olduğu belirtilmiştir.

4.11. Agregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

4.11.1. BATH Testi

BATH testine göre kültürlerin ksilene adhezyon özellikleri Çizelge 4.13'de verilmiştir. İşlem 3 paralelli yapılmıştır.

Çizelge 4.13. Bakterilerin adhezyon özellikleri

Bakteri	Adhezyon (%)
<i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086	68.83±5.25 ^a
SPI	31.81±4.32 ^b
STp	23.06±6.69 ^b
SD	3.46±2.57 ^c
SC	3.32±0.10 ^c

^{a,b,c} Farklı üstel harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak ($p<0.05$) önemli farklılık bulunmuştur.

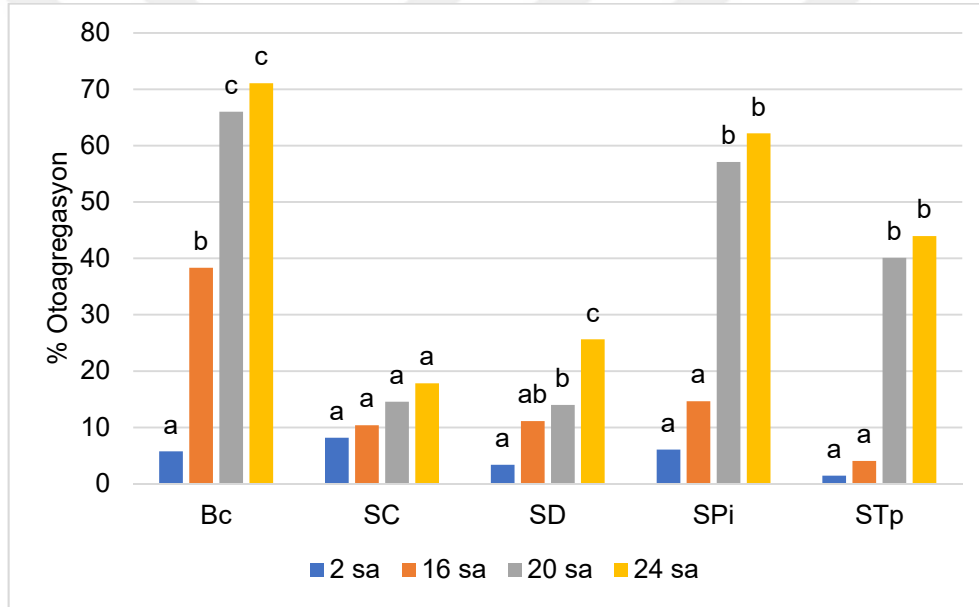
En yüksek hidrofobiklik *B. coagulans* GBI-30, 6086 (%68.83) suşunda tespit edilmiştir. En düşük hidrofobikliği %3.32 ve 3.46 olmak üzere SC ve SD suşları göstermiş olup onları STp ve SPi izlemiştir. Ayrıca, bakterilerin adhezyon özelliklerinin biyofilm üretim özellikleriyle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Benzer bir çalışmada, *Bacillus* izolatlarının adhezyon özellikleri %10–60 arasında değişmekte olup, *B. coagulans*'ın ksilene adhezyonunun %54 olduğu belirtilmiştir. Adhezyondaki bu değişikliklerin yüzey yükü ve hidrofobisite nedeniyle spesifik olmayan reaksiyonlar gibi çeşitli parametrelerle ilişkilendirilebileceği ifade edilmiştir. Apolar bir çözücü olan ksilene bakteriyel adhezyonun hücre yüzeyinin hidrofobikliği ve hücrenin sindirim sisteminde kolonizasyon özellikleri hakkında bilgi edinmeyi sağladığı belirtilmiştir. Ksilene olan yüksek adhezyonun hidrofobik hücre yüzeyine sahip olunmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir (Patel ve ark, 2009; Mohkam ve ark, 2016).

Adhezyon özelliği, sindirim sisteminde mikroorganizmaların kolonize olabilesini sağlayan bir özellik olduğundan probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda varlığı önemli bir kriterdir. Hücre adhezyonu, bakteri hücre membranı ile yüzeylerin etkileşimini içeren karmaşık bir prosestir. Epitel hücrelere ve mukozal yüzeylere adhezyon yeteneği probiyotik olarak kullanılacak bakteriler için önemli bir özelliktir. Yapılmış birçok çalışmaya göre, bakterilerin epitel hücrelere adhezyonu, bileşimi, yapısı ve etkileşim kuvveti tarafından etkilenmektedir. Çoğu zaman agregasyon yeteneği hücrenin adhezyon özelliği ile ilişkilendirilmiştir (Collado ve ark, 2008). Ayrıca çevresel koşullar (pH ve sıcaklık), yüzey ve hücre karakteristikleri (hidrofobiklik) de bakteriyel hücrelerin adhezyonunu etkilemektedir (Choi ve ark, 2013). Probiyotik mikroorganizmaların adhezyon özellikleriyle birlikte sindirim sisteminde kolonize olmaları sonucunda hücre reseptörleri üzerinde engel oluşturarak veya sterik etkileşimler yoluyla patojenlerin erişimi engellenmiş olmaktadır. Bu özellik aynı zamanda insan veya hayvanların sindirim sisteminde düzeni sağlamak için rekabetçi bir avantaj sağlamaktadır (Mohkam ve ark, 2016).

4.11.2. Otoagregasyon Özellikleri

Kültürlerin otoagregasyon özellikleri Şekil 4.6’da verilmiştir. Otoagregasyon kapasitelerinin inkübasyon sırasında arttığı tespit edilmiştir. İnkübasyonun 20. ve 24. saatinde SPi ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 otoagregasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda otoagregasyonu en fazla olan izolatin %62.19 ile SPi olduğu tespit edilmiş olup, SC ve SD’nin ise sırasıyla %17.84 ve %25.64 ile en düşük otoagregasyon özelliğine sahip oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.6. % Otoagregasyon özellikleri (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086) ^{a,b,c} Her bakteri için farklı harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak ($p < 0.05$) birbirinden farklıdır.

Yapılmış bir çalışmada, iyi otoagregasyon özelliklerine sahip *Bacillus* izolatlarının patojenlerle etkileşime geçebilme kapasitelerini görebilmek açısından etkili olduğu, bunun da sindirim sisteminde terapötik etki oluşturabilmek amacıyla önemli bir özellik olduğu belirtilmiştir (Mohkam ve ark, 2016).

Bacillus spp.'nin kolonizasyon özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla otoagregasyon gibi yüzey özellikleri belirlenmektedir. Otoagregasyon özelliği, potansiyel probiyotik mikroorganizmaların insan veya hayvanların kullanımı için uygunluğunun değerlendirilmesinde ilk aşama olarak görülmektedir. Otoagregasyonun ve hücre yüzey hidrofobikliğin biyofilm oluşumunu destekleyebileceği, bunun da *Bacillus*'ların epitel hücrelere adhezyonunu ve sindirim sisteminin ekstrem koşullarında canlılığını korumasına katkı sağlayacağı belirtilmiştir (Mohkam ve ark, 2016).

Bazı bifidobakterler ve laktobasiller için otoagregasyon ve adhezyon yetenekleri arasında bir korelasyon olduğu yapılmış çalışmalarda belirlenmiştir. Ayrıca bazı laktobasiller üzerinde yapılmış çalışmalara göre, hidrokarbonlar üzerindeki adhezyon yetenekleriyle ölçülen hidrofobisiteleri ve adhezyon yetenekleri arasında da bir korelasyon olduğu da tespit edilmiştir (Perez ve ark, 1998; Del Re ve ark, 2000). Fakat bu korelasyonların aksini iddia eden araştırmalar da mevcuttur (Vinderola ve ark, 2004). Yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlara göre, bakterilerin adhezyonu ile otoagregasyonu arasında bir korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır.

4.11.3. Koagregasyon Özellikleri

Kültürlerin patojen ve patojen olmayan 4 farklı test bakterisi (*E. coli* NCTC 12241, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *B. subtilis* ve *Salmonella* spp.) ile farklı inkübasyon sürelerindeki (2 sa, 4 sa ve 24 sa) koagregasyon yetenekleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.14'de verilmiştir. Genel olarak bütün probiyotikler test kültürleri ile koagregasyon özelliği göstermiş olup koagregasyon yeteneklerinin suşlara ve inkübasyon süresine bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.14. Bakterilerin koagregasyon özellikleri (%)

Bakteriler	İnkübasyon süresi (saat)		
	2	4	24
<i>E. coli</i> NCTC 12241 ile koagregasyon			
SD	24.47±3.24 ^a	23.04±3.96 ^a	20.51±0.84 ^a
SC	19.25±1.64 ^{ab}	17.88±1.79 ^{ab}	5.46±3.34 ^b
Bc	15.64±0.72 ^{bc}	13.91±0.46 ^{bc}	3.03±1.34 ^b
SPi	11.31±0.20 ^c	10.22±0.79 ^{bc}	-8.46±1.69 ^c
STp	10.16±1.34 ^c	8.08±0.43 ^c	-3.54±4.35 ^{bc}
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 ile koagregasyon			
SD	23.96±0.33 ^a	23.80±0.79 ^a	28.84±0.70 ^a
SC	16.81±0.16 ^b	17.12±1.51 ^b	10.35±2.15 ^b
Bc	15.04±0.09 ^b	14.18±0.46 ^b	0.81±0.26 ^c
STp	8.86±0.46 ^c	8.45±0.41 ^c	1.29±2.63 ^c
SPi	7.38±1.44 ^c	6.55±1.68 ^c	-0.58±0.43 ^c
<i>B. subtilis</i> ile koagregasyon			
SD	22.51±1.29 ^a	22.42±1.49 ^a	21.96±0.97 ^a
SC	13.97±1.67 ^b	14.30±1.53 ^b	4.99±1.37 ^b
Bc	11.47±1.36 ^{bc}	15.23±0.73 ^b	-0.72±1.43 ^{bc}
STp	6.73±0.16 ^{cd}	6.80±0.59 ^c	-6.44±1.76 ^c
SPi	4.14±2.78 ^d	4.94±2.49 ^c	-6.52±2.42 ^c
<i>Salmonella</i> spp. ile koagregasyon			
STp	26.47±3.49 ^a	28.46±0.76 ^a	-5.72±5.53 ^a
SD	17.29±2.69 ^a	15.28±6.79 ^{ab}	1.39±7.51 ^a
SC	16.92±1.60 ^a	3.96±1.43 ^b	6.35±3.41 ^a
SPi	15.17±2.06 ^a	18.97±6.76 ^{ab}	-0.87±9.57 ^a
Bc	13.63±6.29 ^a	20.70±0.65 ^{ab}	10.22±3.87 ^a

^{a,b,c,d} Her test kültürü için ayrı ayrı olmak üzere, aynı kolonda farklı üstel harflerle belirtilen veriler istatistiksel olarak (p<0.05) birbirinden farklıdır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

En yüksek koagregasyon 4 sa inkübasyon sonunda SD izolatı ile *E. coli* NCTC 12241, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *B. subtilis* arasında gözlenmiştir. 4 sa inkübasyon sonunda *E. coli* NCTC 12241 ile en düşük koagregasyonun STp tarafından yapıldığı, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ile en düşük koagregasyonun SPi ve STp ile olduğu, *B. subtilis* ile en düşük koagregasyonun ise SPi ile olduğu belirlenmiştir. *Salmonella* spp. ile 4 sa inkübasyon sonunda en yüksek koagregasyon yeteneğinin STp ile olduğu, en düşük koagregasyonun ise SC ile olduğu tespit edilmiştir.

Potansiyel sindirim sistemi patojenleriyle koagregasyon özelliği probiyotikler için tercih edilen bir özelliktir. Hücrel agregasyonun yararlı mikroorganizmaların kolonizasyonuna olumlu yönde etki ettiği birçok çalışmada belirtilmiştir (Cesena ve ark, 2001; Collado ve ark, 2005; Collado ve ark, 2007).

Probiyotikler, patojenlerle koagregasyon özellikleri sayesinde sindirim sisteminde bulunan istenmeyen mikrobiyota üzerinde iyileştirici etki gösterebilmektedirler. Bu yüzden, agregasyon ve koagregasyon probiyotik mikroorganizmalar için arzu edilen özelliklerdendir. Farklı suşlar arasındaki (koagregasyon) bakteriyel agregasyon birçok ekolojik niş için özellikle de probiyotiklerin aktif olduğu insan sindirim sistemi için önem taşımaktadır (Collado ve ark, 2008).

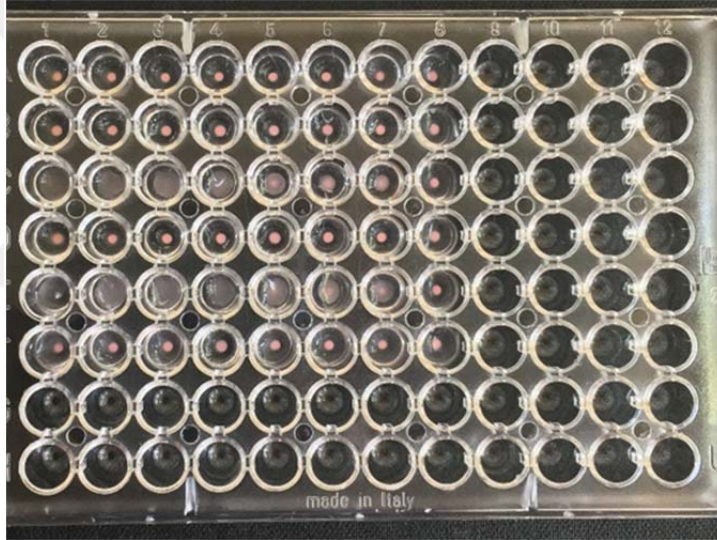
Probiyotik mikroorganizmaların koagregasyon yetenekleri üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. *Bifidobacterium* spp. ile *Clostridium* spp. (Vlkova ve ark, 2008), *Lactobacillus* spp. ile *Streptococcus mutans* (Keller ve ark, 2011) ve *Lactobacillus* spp. ile *S. salivarius* NBRC 13956 (Dlamini ve ark, 2019) üzerine yapılmış çalışmalarda koagregasyon özelliklerinin suşlara göre değiştiği belirtilmiştir. Benzer şekilde yaptığımız çalışmada, izole edilmiş tüm *B. coagulans*'ların kullanılan test kültürleriyle agregasyon yetenekleri olduğu fakat agregasyon yüzdesinin inkübasyon süresi ve suşa bağlı olduğu tespit edilmiştir.

4.12. Toksikolojik Özellikleri

Yaptığımız çalışmada hem PCR tekniği hem de ticari kitler kullanılarak toksijenik gen varlığı ve toksin üretimi araştırılmıştır.

4.12.1. Bakterilerde Enterototoksin Üretimi

Bakterilerde BCET-RPLA kiti (Oxoid) kullanılarak yapılan analizde Hbl enterotoksini üretiminin olmadığı (Şekil 4.7), Duopath Cereus Enterotoxins (Merck) kiti kullanılarak yapılan analizde ise nhe enterotoksini üretimi olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. BCET-RPLA kiti ile yapılan analiz

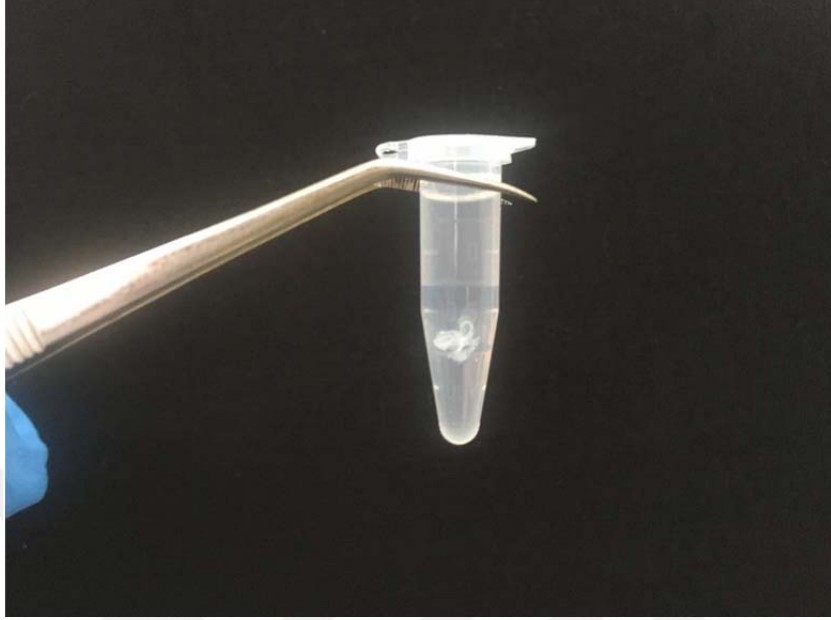
Mohkam ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, topraktan izole edilen probiyotik *Bacillus* spp.'lerin insanlar tarafından tüketiminin güvenilirliğinin tespit edilmesinde PCR tekniğinin yanı sıra ticari kitler kullanılmıştır. Hbl enterotoksininin belirlenmesinde BCET-RPLA kiti, Nhe'nin alt bileşeni NheA'nın tespitinde Tecra BDE kiti kullanılmış olup probiyotiklerde enterotoksin üretiminin tespit edilemediği belirtilmiştir.



Şekil 4.8. Duopath kitleri ile yapılan analiz

4.12.2. Enterotoksin Genlerinin Varlığı

Bu çalışmada kullanılan *B. coagulans*'larda *bceT*, *ces*, *cytK* ve *entFM* enterotoksin genlerinin varlığının tespit edilmesi amacıyla SC, SD, SPi ve STp suşlarından izole edilen DNA'ların (Şekil 4.9) PCR'da amplifikasyonundan sonra elektroforez ile jelde yürütülmüştür. Çalışmada 100 bp'lik (baz çifti) DNA ladder kullanılmıştır. Varlığı araştırılan enterotoksin genleri *bceT*, *ces*, *cytK* ve *entFM* için amplikon boyutu sırasıyla 303, 405, 515 ve 596 bp'dir. Elde edilen sonuçlara göre genlerin varlığını belirtecek olan beklenen aralıkta bant oluşumu gözlenmemiş olduğundan test edilen bakterilerin bu genleri barındırmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.9. *B. coagulans* suşlarından izole edilen DNA

Bacillus spp. arasında *B. anthracis* ve *B. cereus* dışında patojen suş olmamasına rağmen insan ve hayvan tüketimine güvenle sunulabilmesi için toksijenik potansiyellerinin değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir (Butkhot ve ark, 2019; Shinde ve ark, 2019a). EFSA (2020) tarafından, toksijenik gen bulundurmeyen *B. coagulans* suşlarının QPS listesinde olabileceği bildirilmiştir. Yapılmış çalışmalarda *in vivo* (Endres ve ark, 2009; Metlakunta ve Soman, 2020) ve *in vitro* (Saroj ve Gupta, 2020; Kim ve ark, 2021) olarak *B. coagulans*'ın toksisitesi araştırılmış olup, güvenlik açısından risk oluşturabilecek bir durum olmadığı belirtilmiştir.

4.12.3. Hemoliz ve Lesitinaz Aktiviteleri

Potansiyel bir virülans faktörü olan lesitinaz aktivitelerinin tespit edilmesi amacıyla MYP agar besiyerine ekilen *B. coagulans* suşlarında zon oluşumu gözlenmemiştir ve lesitinaz aktivitelerinin negatif olduğu sonucuna varılmıştır. Lesitinaz aktivitesinin hemolize ve miyonekroza (kas dokusunun hayatiyetini

kaybetmesi) neden olarak hayvansal hücrelerin yıkımına yol açtığı belirtilmektedir (Michelotti ve Bodansky, 2015).

Hemoliz aktivitesinin tespit edilmesi amacıyla %5 koyun kanı içeren Columbia agar (BioMérieux) besiyerine ekilen *B. coagulans* suşlarında zon oluşumu gözlenmemiş olup hemoliz aktivitelerinin negatif olduğu tespit edilmiştir.

Mohkam ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* izolatlarının zayıf β -hemoliz gösterdiği, γ -hemolizi ise göstermediği belirtilmiştir. γ -hemoliz arzu edilen bir özellik olmasına rağmen kan hücrelerinin sindirim sistemine girememesinden dolayı bu özelliğin bir öneminin kalmadığı ifade edilmiştir. Mohkam ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, potansiyel probiyotik *Bacillus* spp.'lerin lesitinaz aktivitelerinin negatif olduğu rapor edilmiştir.

4.13. Probiyotik Makarna Örneklerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

B. coagulans GBI-30, 6086 ve izole edilen *B. coagulans* suşlarının ilavesi ile üretilen probiyotik makarna örneklerinin ve kontrol olarak probiyotik kültür ilavesi olmadan üretilen makarna örneklerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir.

4.13.1. Nem ve Kül İçerikleri

Kontrol örneği ve probiyotik örneklerin 0. gün ve 6 ay depolama sonundaki % nem ve % kül içerikleri belirlenmiştir. Ayrıca üretimde kullanılan irmik örneğinde de nem ve kül analizi yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.15'te verilmiştir. 0. günde irmik nem içeriği %14.29, kül içeriği ise %0.85 olarak tespit edilmiştir. 0. günde makarna probiyotik makarna örnekleri arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık bulunmuştur. En yüksek nem içeriği SPi ile üretilen makarnalarda %13.43 olarak tespit edilmiştir. En düşük nem içeriği ise STp ile üretilen makarnalarda %10.55 olarak tespit edilmiştir. Kontrol olarak üretilen makarnada ise nem içeriği %12.49 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. Örneklerin kül ve nem içerikleri

Örnek	Depolama süresi (ay)		
	0		6
	Nem (%)	Kül (%)	Nem (%)
İrmik	14.29±0.37	0.85±0.01	-
Kontrol	12.49±0.12 ^{ab}	0.91±0.07	9.78±0.03 ^a
Bc	11.82±0.11 ^{ab}	0.86±0.08	10.02±0.08 ^{ac}
SC	11.31±0.06 ^{ab}	0.96±0.01	10.14±0.02 ^c
SD	10.68±0.01 ^b	0.91±0.05	10.46±0.05 ^b
SPi	13.43±0.13 ^a	0.93±0.01	10.09±0.08 ^c
STp	10.55±0.04 ^b	0.96±0.03	10.23±0.17 ^c

^{a,b} Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak ($p<0.05$) önemli fark bulunmaktadır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

0. günde yapılan kül analizlerine göre irmik örneğinde kül içeriği %0.85 olarak tespit edilmiştir. Probiyotik makarna örneklerinin 0. günde kül içerikleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmamıştır. En yüksek kül içeriği SC ve SD ile üretilen makarnalarda %0.96 olarak, en düşük kül içeriği ise %0.86 olarak *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnada tespit edilmiştir.

Kuru makarnaların nem oranları raf ömrünü ve mikrobiyolojik kaliteyi etkilediğinden, %12.5'in altında olması istenmektedir (Bustos ve ark, 2015). Çalışmamızda üretilen makarna örneklerinin nem içeriklerinin oda sıcaklığında depolama ile düştüğü tespit edilmiştir.

4.13.2. Pişme Süresi Tayini

Örneklerin pişme sürelerinin tayini amacıyla her 30 sn'de bir örnek alınıp iki lam arasında sıkıştırılmış ve makarnanın merkezindeki beyaz kısmın (Şekil 4.10) kaybolduğu süre pişme süresi olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11). Bütün makarna örneklerinde 0. gün ve 6 ay depolama sonunda 7. dakikada makarnanın merkezindeki beyaz alanın kaybolduğu gözlenmiş ve pişme süresi (PS) 7 dk olarak

belirlenmiştir. Tekstür, su absorpsiyonu, renk ve duyusal analiz için örneklerin pişme süresi PS+1 dk olarak belirlenmiş ve bu amaçla örnekler 8 dk pişirilmiiştir. Çalışmamızda depolama süresinin pişme süresi üzerine etki etmediğı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.10. Yetersiz pişme süresi



Şekil 4.11. Pişmiş makarna

4.13.3. Su Absorpsiyonu Analizi

Örneklerin su absorpsiyonu miktarları Çizelge 4.16’da verilmiştir. 0. gün örneklerinde en yüksek su absorpsiyonu miktarı kontrol örneklerinde tespit edilmiş olup, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen probiyotik makarnalarla istatistiksel açıdan benzerlik göstermiştir. 0. günde tespit edilen en düşük su absorpsiyon miktarı ise SPi ile üretilen probiyotik makarnalarda gözlenmiş olup, SC ve SD ile üretilen makarnalar arasında istatistiksel açıdan benzerlik tespit edilmiştir. Örneklerin 6 ay depolanmasından sonra su absorpsiyonu miktarlarına bakıldığında, en yüksek değer *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen probiyotik makarnalarda gözlenirken, kontrol örneği ile arasında istatistiksel açıdan benzerlik bulunmuştur. 6. ay örneklerinde en düşük absorpsiyonu miktarı ise SPi ile üretilen makarnalarda tespit edilmiş ve SD ile üretilen probiyotik makarnaların su absorpsiyon miktarları arasında istatistiksel açıdan benzerlik bulunmuştur.

Çizelge 4.13. Örneklerin su absorpsiyon miktarları

Örnek	Su absorpsiyonu (%)	
	0. gün örnekleri	6. ay örnekleri
Kontrol	269.46±9.50 ^a	300.36±7.09 ^a
Bc	246.36±19.36 ^{ac}	310.62±11.46 ^a
SC	179.30±7.54 ^{bd}	237.30±4.67 ^b
SD	186.70±16.44 ^{bc}	213.20±13.41 ^{bc}
SPi	139.20±10.72 ^b	183.70±9.96 ^c
STp	200.50±9.80 ^{cde}	243.60±12.68 ^b

^{a,b,c,d,e} Aynı sütunda farklı üstel harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak ($p<0.05$) birbirinden farklıdır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

Örneklerin su absorpsiyon miktarının depolama ile arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca *B. coagulans* GBI-30, 6086 ilavesiyle su absorpsiyonları 0. günde azalırken, 6 ay depolama sonunda artmıştır. Diğer *B. coagulans*’ların ilavesiyle ise örneklerin su absorpsiyon miktarları 0. gün ve 6. ayda azalmıştır. Çalışmada elde edilen

bulgular, depolama ile birlikte su absorpsiyonu miktarının arttığını belirten Kaur ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Depolama sırasında glutenin zayıflaması ile makarna örneklerinin su absorpsiyon miktarları artmaktadır (Manthey ve ark, 2008). Ayrıca düşük sıcaklıkta kurutulan makarnaların su absorpsiyon miktarlarının yüksek olduğu belirtilmiştir (Sicignano ve ark, 2015).

4.13.4. Pişme Kaybı Analizi

Makarna örneklerinin % pişme kaybı miktarları Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Makarna örneklerinde pişme kaybı (%)

Örnek	Depolama Süresi	
	0. gün	6. ay
Kontrol	6.82±0.09 ^a	7.20±0.11 ^a
Bc	6.06±0.07 ^b	6.89±0.19 ^a
SC	4.49±0.03 ^{cd}	5.14±0.16 ^b
SD	4.76±0.06 ^{ce}	5.03±0.08 ^b
SPi	4.39±0.11 ^d	4.85±0.06 ^b
STp	4.82±0.09 ^e	5.08±0.06 ^b

^{a,b,c,d,e} Aynı sütunda farklı üstel harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak ($p<0.05$) birbirinden farklıdır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

0. günde en yüksek pişme kaybı kontrol örneğinde (%6.82) gözlenmiştir ve bu örneğin, diğer örneklerden istatistiksel açıdan önemli ölçüde farklı olduğu tespit edilmiştir. Kontrol örneğini *B. coagulans* GBI-30, 6086, STp, SD, ve SC ile üretilen makarnalar izlemektedir. 0. günde en düşük pişme kaybı ise SPi (%4.39) ile üretilen probiyotik makarnalarda gözlenmiş olup, SPi ile SC (%4.49) kullanılarak üretilen makarnalar arasında istatistiksel açıdan benzerlik olduğu

sonucuna varılmıştır. 0. gün analiz sonuçlarına göre, SC ile SD örnekleri arasında ve SD ile STp örnekleri arasında istatistiksel açıdan benzerlik bulunmaktadır.

Örneklerin 6 ay depolanması sonunda pişme kaybı en yüksek olan örnek kontrol örneği (%7.20) olarak tespit edilmiştir. Kontrol örneği ile *B. coagulans* GBI-30, 6086 kullanılarak üretilen makarnalar arasında istatistiksel açıdan benzerlik bulunmaktadır. Kontrol örneğini *B. coagulans* GBI-30, 6086, SC, STp ve SD ile üretilen makarnalar izlemektedir. 6 ay depolama sonunda en düşük pişme kaybı SPi (%4.85) ile üretilen makarnalarda gözlenmiş olup, SC, SD ve STp ile üretilen makarnalar arasında istatistiksel açıdan benzerlik bulunmaktadır. Ayrıca, hem kontrol hem de *B. coagulans* ilavesi ile üretilen makarnaların 6 ay depolanma sonunda pişme kayıplarının arttığı tespit edilmiştir. Pişme kaybı ve su absorpsiyonu değerleri arasında doğru orantı bulunmaktadır (de la Peña ve Manthey, 2014). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer şekilde Marti ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, su absorpsiyonu artan makarnaların pişme kayıplarının da arttığı belirtilmiştir. Pişme kaybının %8'den fazla olması durumunda, makarnanın düşük kaliteli olduğu kabul edilmektedir (Bustos ve ark, 2013). Bu nedenle, bu çalışmada üretilen makarna örneklerinin pişme kaybı değerlerinin, makarnaların iyi kaliteye sahip olmaları için yeterli olduğu ve *B. coagulans* ilavesi ile üretilen makarnaların kontrol örneğine göre pişme kaybı değeri açısından daha iyi kalitede olduğu düşünülmektedir.

4.13.5. Tekstür Analizi

Probiyotik makarna örnekleri 0. günde ve 6 ay depolama sonunda pişirilerek tekstür analizleri yapılmıştır. 5 adet spagetti yan yana olacak şekilde yerleştirilerek örneklerin sertlik, elastikiyet, yapışkanlık ve direnç özellikleri belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir. 0. günde yapılan analizlerde örnekler arasında sertlik açısından istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmamaktadır. Örneklerin 6 ay depolanmasından sonra sertlik açısından SPi örneğinin istatistiksel olarak SC ve SD'den farklı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.15. Pişmiş makarnaların tekstür analiz sonuçları

DS (ay)	Örnek	Sertlik	Elastikiyet	Yapışkanlık	Direnç
0	Kontrol	4719.82±21.09 ^{aABC}	0.937±0.02 ^{aA}	0.722±0.03 ^{aA}	0.44±0.01 ^{aAC}
	Bc	4574.37±18.80 ^{aBC}	0.952±0.02 ^{aA}	0.709±0.02 ^{aA}	0.42±0.01 ^{aABC}
	SC	4330.89±327.87 ^{aB}	0.904±0.03 ^{aA}	0.593±0.01 ^{bA}	0.36±0.01 ^{aBC}
	SD	4920.08±779.96 ^{aBC}	0.828±0.06 ^{aA}	0.608±0.04 ^{bA}	0.41±0.05 ^{aABC}
	SPi	5391.01±420.16 ^{aABC}	0.887±0.06 ^{aA}	0.644±0.02 ^{abA}	0.44±0.01 ^{aAC}
	STp	5277.24±188.25 ^{aABC}	0.857±0.03 ^{aA}	0.646±0.01 ^{abA}	0.43±0.01 ^{aABC}
6	Kontrol	5832.23±167.54 ^{abCD}	0.944±0.01 ^{aA}	0.674±0.14 ^{aA}	0.52±0.01 ^{abAC}
	Bc	5621.11±103.79 ^{abABC}	0.846±0.03 ^{aA}	0.667±0.01 ^{aA}	0.46±0.00 ^{bA}
	SC	4676.45±72.39 ^{aABC}	0.911±0.11 ^{aA}	0.627±0.04 ^{aA}	0.38±0.04 ^{abABC}
	SD	4556.08±14.54 ^{aABC}	0.914±0.02 ^{aA}	0.590±0.00 ^{aA}	0.34±0.01 ^{aB}
	SPi	6061.81±769.69 ^{bAD}	0.949±0.07 ^{aA}	0.824±0.25 ^{aA}	0.41±0.02 ^{abABC}
	STp	5362.15±193.70 ^{abABC}	0.878±0.07 ^{aA}	0.648±0.03 ^{aA}	0.45±0.01 ^{bAC}

^{a,b} Aynı sütunda farklı depolama süreleri için farklı üstel harflerle gösterilen veriler istatistiksel olarak ($p<0.05$) birbirinden farklıdır. ^{A,B,C,D} Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen veriler istatistiksel olarak ($p<0.05$) birbirinden farklıdır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086; DS: Depolama süresi)

Genel olarak örneklerde depolama ile sertlik değerinin arttığı gözlenmiştir. Elastikiyet açısından örnekler arasında 0. gün ve 6. ay için istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilememiş olup depolamanın örneklerin elastikiyeti üzerinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık oluşturmadığı sonucuna varılmıştır. Örneklerin yapışkanlık özelliklerini tespit etmek için 0. günde yapılan analizlerde kontrol örneği ile SC ve SD makarnaları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu tespit edilmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnaların ise SC ve SD ile üretilen makarnalar arasında istatistiksel açıdan farklılık olduğu sonucuna varılmıştır.

6 ay depolanan örneklerde yapılan analizlerde yapışkanlık açısından örnekler arasında önemli bir farklılık bulunamamıştır. Örneklerde 0. günde yapılan

analizlerde direnç özellikleri açısından birbirleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunamamıştır. Direnç özellikleri için bakıldığında, 6 ay depolanan makarna örneklerinin SD ile üretilen makarnaların *B. coagulans* GBI-30, 6086 ve STp ile üretilen makarnalardan istatistiksel açıdan farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Örneklerin direnç özelliklerinin genel olarak 6 ay depolama sonunda arttığı tespit edilmiştir.

Makarna tekstür özellikleri, pişmiş makarna kalitesinin değerlendirilmesinde ana faktörlerden biridir (Gull ve ark, 2017). Yapılan çalışmada, makarna üretiminde *B. coagulans* kullanımının makarnanın sertlik, elastikiyet ve direnç özellikleri üzerinde kontrol örneğine göre önemli farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Almada-Erix ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, ekmek üretiminde *B. coagulans* ilavesi ekmeğin tekstür özelliklerini önemli ölçüde etkilememiştir. Çalışmamızda uygulanan düşük kurutma sıcaklığının aksine, yüksek sıcaklıkta kurutma tekstürel özellikler üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir (Sicignano ve ark, 2015).

4.13.6. Örneklerde Renk Analizi

Makarna örneklerinin 0. günde ve 6 ay depolama sonunda kuru ve pişmiş halde L^* , a^* ve b^* değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.19’de verilmiştir.

Çizelge 4.16. Kuru ve pişmiş makarna örneklerinin renk değerleri

DS (ay)	Örnek	Renk Değerleri					
		L*		a*		b*	
		Kuru	Pişiş	Kuru	Pişiş	Kuru	Pişiş
0	Kontrol	81.96±0.28 ^{aA}	75.66±0.10 ^{aA}	-1.50±0.05 ^{aA}	-4.18±0.24 ^{aA}	23.25±0.33 ^{aA}	22.81±0.80 ^{aA}
	Bc	81.17±0.04 ^{aA}	75.11±1.63 ^{aAB}	-1.45±0.10 ^{aA}	-3.93±0.07 ^{aA}	23.68±0.55 ^{aA}	22.07±0.38 ^{aB}
	SC	70.58±0.91 ^{bB}	68.47±2.02 ^{aAB}	-0.37±0.24 ^{bB}	-2.94±0.03 ^{bB}	19.18±0.76 ^{bBE}	15.60±1.38 ^{bDFG}
	SD	68.08±0.76 ^{bB}	67.04±2.54 ^{aAB}	0.63±0.41 ^{cC}	-3.03±0.30 ^{bB}	19.96±0.49 ^{abACE}	9.77±0.36 ^{cC}
	SPi	70.66±0.75 ^{bB}	71.09±7.32 ^{aAB}	-0.71±0.14 ^{abB}	-2.78±0.12 ^{bB}	19.68±1.42 ^{abC}	17.08±1.57 ^{bDF}
	STp	65.87±4.89 ^{bB}	64.55±3.07 ^{abB}	-0.92±0.26 ^{abB}	-2.70±0.03 ^{bB}	19.54±1.72 ^{bcC}	16.02±0.71 ^{bDF}
6	Kontrol	80.69±0.61 ^{aA}	75.24±3.17 ^{aAB}	-1.26±0.14 ^{aA}	-4.04±0.13 ^{aA}	20.58±0.81 ^{aACE}	15.14±0.16 ^{aD}
	Bc	80.02±0.15 ^{acA}	76.67±0.80 ^{aA}	-0.93±0.12 ^{aA}	-3.83±0.25 ^{aA}	20.48±0.13 ^{aACE}	15.50±0.14 ^{aD}
	SC	69.72±3.00 ^{bcB}	69.00±0.54 ^{bAB}	-0.56±0.24 ^{abB}	-2.75±0.04 ^{bB}	16.36±0.35 ^{bB}	12.60±1.75 ^{abEG}
	SD	67.74±1.99 ^{bB}	73.16±0.71 ^{abAB}	-0.01±0.24 ^{bD}	-3.05±0.14 ^{bB}	15.99±0.15 ^{bB}	15.06±0.32 ^{bDG}
	SPi	65.88±2.75 ^{bB}	66.99±0.62 ^{bAB}	-0.01±0.25 ^{bD}	-2.58±0.04 ^{bB}	15.52±0.89 ^{bB}	12.97±1.32 ^{abEG}
	STp	62.51±4.35 ^{bB}	76.54±1.69 ^{aA}	-0.49±0.25 ^{abB}	-2.48±0.29 ^{bB}	15.79±1.83 ^{bB}	10.57±0.73 ^{aE}

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı depolama sürelerinde farklı üstel harflerle belirtilen değerler arasında istatistiksel olarak ($p<0.05$) önemli farklılık bulunmaktadır. ^{A,B,C,D} Aynı sütunda farklı üstel harflerle belirtilen değerler arasında istatistiksel olarak ($p<0.05$) önemli farklılık bulunmaktadır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086; DS: Depolama süresi)

Kuru makarnalar için 0. günde ve 6. ayda yapılan renk analizlerinde, L* değerinde kontrol örneğinin SC, SD, SPi ve STp makarnalarından, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile yapılan makarnaların da 0. günde yapılan analizlerde SD, SPi ve STp ile üretilen makarnalardan, 6. ayda yapılan analizlerde ise SD, SPi ve STp ile üretilen makarnalardan istatistiksel açıdan farklı olduğu gözlenmiştir. Makarnaların L* değerinin depolama ile genel olarak azaldığı tespit edilmiştir. Örneklerin a* değerlerine bakıldığında, kontrol örneği ile SC ve SD ile üretilen makarnalar arasında 0. günde yapılan analizlerde istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğu bulunmuştur. *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile yapılan makarnaların 0. günde SC ile

arasında, SD ile üretilen makarnaların ise *B. coagulans* GBI-30, 6086, SC, SPi ve STp ile üretilen makarnalar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu tespit edilmiştir. 6 ay depolamadan sonra yapılan analizlerde ise a^* değerlerinde, kontrol örneği ile SD ve SPi arasında, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile yapılan makarnalarda da SD ve SPi arasında önemli farklılık bulunmuştur. Örneklerin 0. günde yapılan analizlerinde b^* değerine bakıldığında, kontrol örneği ile SC makarnaları arasında, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnalar ile SC ve STp arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu sonucuna varılmıştır. Örneklerin 6 ay depolanmasının ardından yapılan analizlerde ise b^* değerleri açısından, kontrol örneği ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile yapılan makarnaların istatistiksel olarak SC, SD, SPi ve STp ile üretilen makarnalardan farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Bütün kuru makarna örneklerinde b^* değerlerinin 6 ay depolama ile birlikte azaldığı sonucuna varılmıştır.

Pişmiş makarnalar için L^* değerine bakıldığında, 0. gün yapılan analizlerde örnekler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır. Örneklerin 6 ay depolanmasının ardından pişirilerek yapılan analizlerde ise L^* değerinin, kontrol örneği ile SPi arasında, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile yapılan makarnalar ile SC ve SPi arasında, STp ile yapılan makarnalar için de, SC ve SPi arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık bulunmuştur. Makarnaların a^* değerlerine bakıldığında, 0. günde yapılan analizlerde ve 6 ay depolanmasından sonra yapılan analizlerde kontrol örneği ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile yapılan makarnaların SC, SD, SPi ve STp ile üretilen makarnalar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu sonucuna varılmıştır. Makarna örneklerinin b^* değerlerine bakıldığında, kontrol örneği ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile yapılan makarnanın SC, SD, SPi ve STp ile arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu tespit edilmiştir. SD ile üretilen makarnaların ise SC, SPi ve STp ile üretilen makarnalar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu gözlenmiştir. Örneklerin 6 ay depolanmasından sonra ise, STp ile üretilen makarnalar ile *B. coagulans* GBI-30, 6086, SD ve kontrol örneği arasında

istatistiksel açıdan önemli farklılık olduğu bulunmuştur. Genel olarak pişmiş makarna örneklerinin b* değerlerinin 6 ay depolama ile azaldığı sonucuna varılmıştır.

Kuru ve pişmiş makarna örneklerinin 0. günde ve 6 ay depolama sonunda hue ve chroma değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.17. Kuru ve pişmiş makarna örneklerinin Hue ve Chroma değerleri

DS (ay)	Örnek	Hue değeri		Chroma değeri	
		Kuru	Pişmiş	Kuru	Pişmiş
0	Kontrol	-1.51±0.00 ^a	-1.39±0.01 ^a	23.30±0.33 ^{ac}	23.19±0.75 ^a
	Bc	-1.51±0.00 ^a	-1.39±0.00 ^a	23.73±0.55 ^a	22.42±0.37 ^a
	C	-1.55±0.01 ^a	-1.38±0.01 ^a	19.19±0.76 ^b	15.88±1.37 ^b
	D	1.54±0.01 ^b	-1.27±0.01 ^b	19.98±0.50 ^{ab}	10.23±0.43 ^c
	Pi	-1.54±0.01 ^a	-1.41±0.02 ^a	19.70±1.43 ^{ab}	17.31±1.53 ^b
	Pt	-1.53±0.02 ^a	-1.40±0.01 ^a	19.55±1.70 ^{bc}	16.25±0.69 ^b
6	Kontrol	-1.51±0.01 ^a	-1.31±0.00 ^a	20.62±0.81 ^a	15.68±0.19 ^a
	Bc	-1.53±0.01 ^a	-1.33±0.01 ^a	20.50±0.12 ^a	15.97±0.08 ^a
	C	-1.54±0.01 ^a	-1.36±0.04 ^a	16.38±0.35 ^b	12.89±1.69 ^{ab}
	D	0.00±2.21 ^a	-1.37±0.01 ^a	15.99±0.15 ^b	15.37±0.29 ^a
	Pi	0.00±2.21 ^a	-1.38±0.02 ^a	15.52±0.89 ^b	13.23±1.29 ^{ab}
	Pt	-1.54±0.01 ^a	-1.34±0.04 ^a	15.79±1.82 ^b	10.87±0.64 ^b

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı depolama sürelerinde farklı üstel harflerle belirtilen değerler arasında istatistiksel olarak (p<0.05) önemli farklılık bulunmaktadır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086; DS: Depolama süresi)

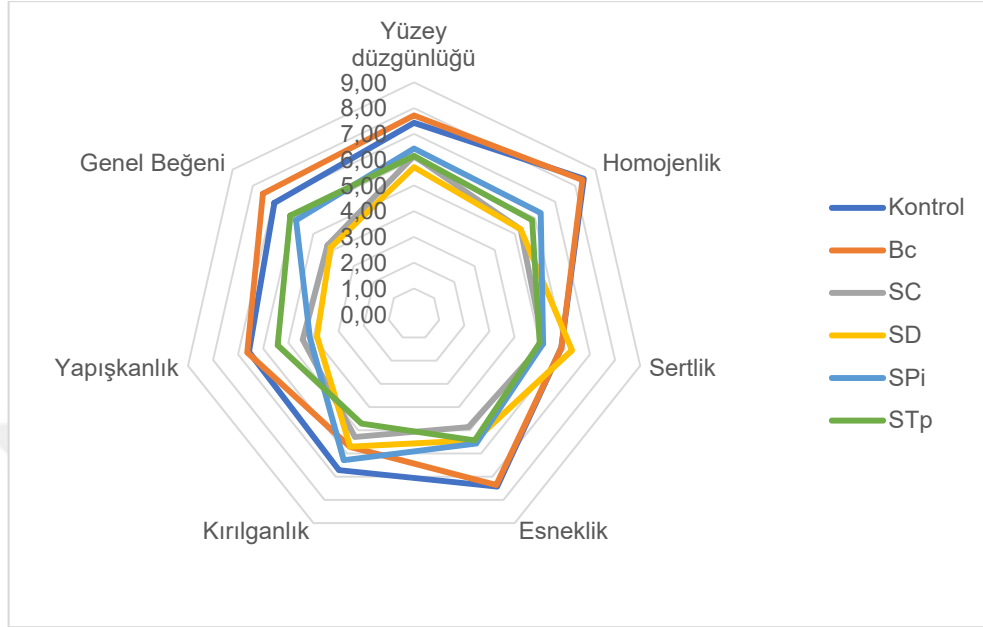
Renk, gıdaların tüketici tarafından kabulü için en önemli kriterlerden biridir (Gull ve ark, 2017). Makarnanın rengi üretim ve depolama sırasında farklılık göstermektedir. Pişme karakteristikleri makarnanın tercihinde önemli bir rol oynasa da makarnanın marketten satın alınması sırasında ürünün görsel olarak değerlendirilmesi başlamış olmakta ve bu nedenle kuru makarnanın tek düze ve

kehribar sarısı renginde olması önemlidir. Koyu renkli makarnalar tüketici tarafından düşük kaliteli olarak kabul edilir ve tercih edilmez (Vimercati ve ark, 2020; Bresciani ve ark, 2021). Makarnanın sarılık miktarının irmik karakteristiklerine bağlı olduğu, üretimde kullanılan irmiğin b* değerinin 30'dan fazla olması durumunda sarılık özelliği yüksek kaliteye sahip makarnaların üretileceği belirtilmiştir. Fakat üretim proseslerinden karıştırma ve yoğurma aşamalarında ortamda bulunan oksijenin pigment oksidasyonuna yol açması da ürün rengini etkilemektedir (Carpentieri ve ark, 2022).

4.13.7. Duyusal Analiz

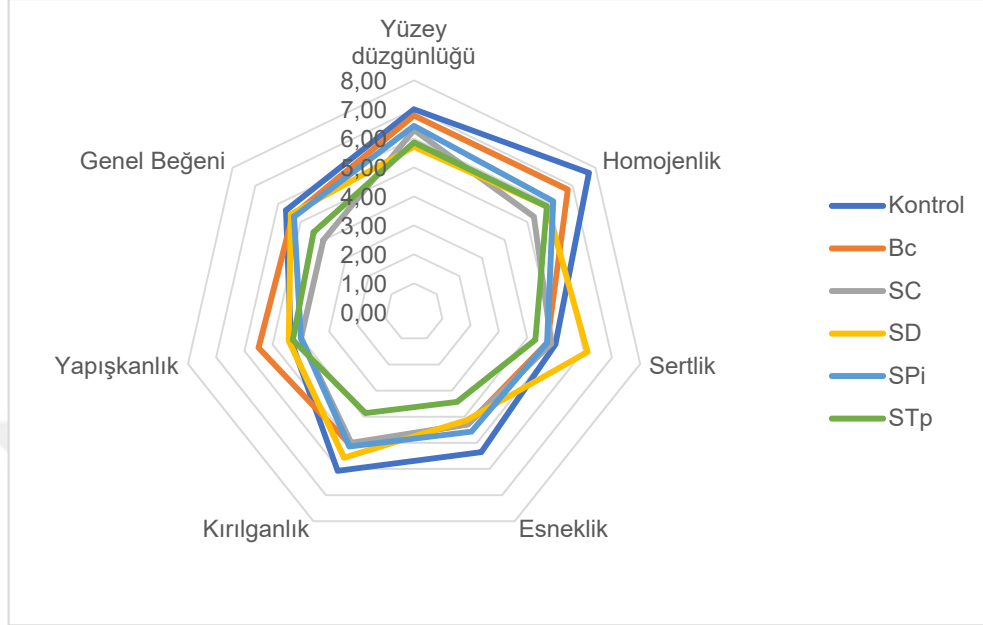
Örnekler üretim günü ve 6 ay depolanmalarının ardından pişirilmiş ve duyusal analizi yapılmıştır. Örneklerin değerlendirilmesinde 1-10 arası puan verilmiş olup, 1 en düşük değeri, 10 ise en yüksek değeri ifade etmektedir.

Şekil 4.12'de görüldüğü gibi, üretim gününde yapılan analizlerde genel beğeni açısından en yüksek puanı *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnalar alırken, onu kontrol, STp ve SPi örnekleri izlemektedir. Genel beğeni açısından en az puanı alan örnek ise SD ile üretilen makarnalar olmuştur. Fakat genel beğeni açısından örnekler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnaların esneklik değeri açısından kontrol, SD, SPi ve STp ile üretilen makarnalardan istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SC ile üretilen makarnaların da esneklik değeri açısından kontrol örneğinden önemli ölçüde farklı olduğu bulunmuştur. Yapışkanlık değerleri açısından bakıldığında, sadece kontrol örneği ile SD ile üretilen makarnalar arasında önemli ölçüde fark olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. Örneklerin 0. günde yapılan duyu analizi sonuçları

Örneklerin 6 ay depolanmasının ardından yapılan analizlerde (Şekil 4.13), değerlendirilen parametreler arasında istatistiksel olarak önemli ölçüde fark gözlenmemiştir. Genel beğeni açısından en yüksek puanı kontrol örneği alırken onu, SD ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen örnekler izlemiştir. Genel beğeni açısından en az puanı alan örneklerin ise SC ve STp ile üretilen makarnalar olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. Örneklerin 6 ay depolama sonunda duyu analizi sonuçları

Yeni fonksiyonel ürün üretiminde gıdaların duyu parametreleri, kullanılan bileşenlere bağlı olarak değişebilmekte ve bu durum ürünün tüketici tarafından kabul edilebilirliğini etkileyebilmektedir (Bianchi ve ark, 2021). Bu nedenle farklı bileşenler ile üretilen ürünlerin duyu karakteristiklerinin değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Adibpour ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotik ilavesi ile üretilen şekerlerin probiyotik ilavesi olmadan üretilen şekerlerden genel beğeni açısından farklı olmadığı tespit edilmiştir. Miranda ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, jöleli şeker üretiminde *B. coagulans* GBI-30, 6086 ilavesinin ürünün duyu özellikleri üzerinde olumsuz etkiye yol açmadığı belirtilmiştir. Ayrıca Danışman ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, kuru kayısılar ile üretilen atıştırmalığa *B. coagulans* GBI-30, 6086 ilavesinin ürünün duyu parametreleri arasında renk ve görünüş üzerinde önemli farklılık oluşturmadığı, hatta probiyotik ilavesi ile

zenginleştirilmiş ürünün tekstür, tat ve aroma açısından en beğenilen ürün olduğu belirtilmiştir.

4.14. Probiyotik Makarna Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Probiyotik makarna üretim aşamalarında hamur, etüv öncesi ve kuru makarna aşamalarında örnek alınarak toplam aerob mezofilik bakteri (TAMB) sayısı, sporlu mikroorganizma (SM) sayısı ve *B. coagulans* sayısı belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.21’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Probiyotik makarnaların üretim aşamalarında mikrobiyolojik analiz sonuçları (log kob/g)

Örnek	Bakteri	TAMB	SM	<i>B. coagulans</i>
Hamur	Bc	6.84±0.27 ^b	8.89±0.08 ^a	8.50±0.29 ^a
	SC	3.38±0.06 ^c	7.41±0.06 ^c	7.17±0.02 ^{cd}
	SD	3.46±0.11 ^c	7.10±0.01 ^d	7.08±0.11 ^c
	SPi	7.46±0.02 ^a	7.83±0.01 ^b	7.71±0.01 ^{bd}
	STp	3.78±0.05 ^c	7.96±0.03 ^b	7.83±0.01 ^b
Yaş Makarna	Bc	6.29±0.41 ^a	8.86±0.08 ^a	8.49±0.13 ^a
	SC	3.19±0.11 ^b	7.37±0.04 ^c	7.01±0.04 ^c
	SD	3.47±0.11 ^b	7.32±0.09 ^c	7.04±0.02 ^c
	SPi	6.23±0.09 ^a	7.62±0.03 ^b	7.68±0.25 ^b
	STp	3.24±0.34 ^b	7.76±0.01 ^b	7.74±0.04 ^b
Kuru Makarna	Bc	4.64±0.17 ^a	8.58±0.27 ^a	8.30±0.29 ^a
	SC	2.72±0.66 ^b	7.05±0.12 ^{bc}	6.93±0.05 ^b
	SD	3.29±0.06 ^b	6.91±0.01 ^{bc}	6.98±0.04 ^b
	SPi	4.89±0.03 ^a	7.31±0.44 ^{ac}	7.41±0.33 ^{ab}
	STp	2.38±0.02 ^b	7.41±0.65 ^{ac}	7.46±0.59 ^{ab}
6 ay Depolanan Kuru Makarna	Bc	2.74±0.06 ^{bc}	7.51±1.17 ^a	7.34±0.03 ^a
	SC	3.79±0.02 ^a	6.94±0.04 ^a	6.79±0.06 ^b
	SD	3.63±0.04 ^a	6.93±0.09 ^a	6.89±0.06 ^{bc}
	SPi	2.85±0.05 ^b	6.45±0.05 ^a	7.32±0.09 ^a
	STp	2.62±0.06 ^c	6.41±0.06 ^a	7.22±0.16 ^{ac}

^{a,b,c,d} Aynı sütunda her örnek için farklı üstel harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak (p<0.05) birbirinden farklıdır. (TAMB: Toplam aerob mezofil bakteri; SM: Sporlu mikroorganizma; Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

Hamur örneklerinde TAMB sayısı en fazla SPi (7.46 log kob/g) ilave edilmiş olan hamur olarak tespit edilmiş olup, en düşük TAMB sayısı ise SC (3.38 log kob/g) ile üretilen makarna hamurunda tespit edilmiştir. *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile SPi'nin hem birbiri arasında hem de SC, SD ve STp ile üretilen makarnalar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık bulunmuştur. Ekstrüzyon sonrası elde edilen makarna örneklerinde TAMB sayısı en fazla *B. coagulans* GBI-30, 6086 (6.29 log kob/g) ile üretilen makarnalarda tespit edilmiş olup, en düşük TAMB sayısı ise SC (3.19 log kob/g) ile üretilen örneklerde gözlenmiştir. İstatistiksel olarak *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile SC, SD ve STp ile üretilen örneklerin ve SPi ile SC, SD ve STp ile üretilen örneklerin TAMB sayıları arasında önemli farklılık bulunmuştur. Kuru makarnalarda *B. coagulans* GBI-30, 6086 ve SPi kullanılarak üretilen makarnalar ile SC, SD ve STp arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık bulunmuştur. Kurutma işlemi sırasında örneklerin TAMB yüklerinde azalma görülmüş olup en fazla azalma %26 ile *B. coagulans* GBI-30, 6086 ve STp ile üretilmiş makarnalarda gözlenmiş olup onları %21 ile SPi, %14 ile SC izlemektedir. Kurutma işlemi sırasında TAMB sayısındaki azalma miktarı en az olan örneğin ise SD ile üretilen makarna olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin 6 ay depolanmasının ardından yapılan analizde TAMB sayıları göz önünde bulundurulduğunda, *B. coagulans* GBI-30, 6086 kullanılarak üretilen makarnalar ile SC ve SD arasında istatistiksel açıdan farklılık bulunmaktadır. Depolama süresince *B. coagulans* GBI-30, 6086 ve SPi ile üretilen makarnaların TAMB sayılarında yaklaşık olarak %40 azalma olduğu tespit edilmiştir. Depolamanın örneklerin içerdiği TAMB sayısı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bağımlı t-testine göre *B. coagulans* GBI-30, 6086 ve SPi ilavesi ile üretilen örneklerde TAMB sayısının depolamadan önemli ölçüde etkilendiği, SC, SD ve STp ile üretilen örneklerde ise önemli farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Örneklerde SM sayısına bakıldığında, hamur aşamasında alınan örneklerde en fazla SM sayısı *B. coagulans* GBI-30, 6086'da (8.89 log kob/g) tespit edilmiş olup, SC, SD, SPi, ve STp kullanılarak üretilen makarnalar ile arasında istatistiksel

açıdan farklılık bulunmaktadır. Hamurlardan alınan örneklerde en düşük SM sayısı ise SD (7.10 log kob/g) örneğinde tespit edilmiş ve bu örneğin diğer örneklerle arasında istatistiksel açıdan farklılık olduğu tespit edilmiştir. Ekstrüzyon aşamasından sonra alınan örneklerin SM sayısına bakıldığında, en yüksek SM sayısı *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen örneklerde tespit edilmiş olup, bu örneklerin istatistiksel açıdan diğer örneklerden farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Kuru makarnalarda tespit edilen SM sayıları açısından *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnaların istatistiksel olarak SC ve SD ile üretilen makarnalardan farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Kuru makarnalarda en yüksek SM sayısı *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnalarda (8.58 log kob/g) tespit edilmiş olup kurutma işleminin bu örnekte SM sayısını %3 oranında azalttığı gözlenmiştir. Örneklerin 6 ay depolanmasının ardından yapılan analiz sonuçlarına göre, SM sayıları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır. En yüksek SM sayısı *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnalarda (7.51 log kob/g) gözlenmiş olup, en düşük SM sayısı ise STp ile üretilen örneklerde (6.41 log kob/g) gözlenmiştir. Örneklerin 6 ay depolanması ile SM sayısında en fazla azalma STp (%13) ile üretilmiş makarnalarda gözlenmiş olup, onu *B. coagulans* GBI-30, 6086 (%12), ve SPi (%11) ile üretilen makarnalar izlemektedir. Depolamanın örneklerin içerdiği SM sayısı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bağımlı t-testine göre depolamanın örnekler için önemli farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Hamur aşamasında alınan örneklerin *B. coagulans* sayıları değerlendirildiğinde, en yüksek değer *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen hamurlarda (8.50 log kob/g) olduğu ve bu örneğin istatistiksel açıdan diğer örneklerden farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu aşamada en düşük *B. coagulans* sayısı ise SD hamurunda (7.08 log kob/g) tespit edilmiştir. Ekstrüzyon sonrası alınan örneklerde en yüksek *B. coagulans* sayısı *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnalarda (8.49 log kob/g) tespit edilmiş olup, bu örneğin SC, SD, SPi ve STp ile üretilen makarnaların *B. coagulans* sayılarından istatistiksel açıdan

farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Kurutma işlemi uygulanan makarnaların *B. coagulans* sayılarına bakıldığında, *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnaların SC ve SD ile üretilen makarnalardan istatistiksel olarak farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Uygulanan kurutma işlemiyle *B. coagulans* sayısında en çok azalma %3 ile STp ve SPi kullanılarak üretilen örneklerde gözlenmiş olup, onu %2 ile *B. coagulans* GBI-30, 6086, %1 ile SC ile üretilen makarnalar izlemektedir. Örneklerin 6 ay depolanmasının ardından yapılan analiz sonuçlarına göre, *B. coagulans* sayıları göz önünde bulundurulduğunda, *B. coagulans* GBI-30, 6086 kullanılarak üretilen makarna ile SC ve SD kullanılarak üretilen makarnalar arasında istatistiksel olarak önemli farklılık görülmektedir. En yüksek *B. coagulans* sayısı *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnalarda (7.34 log kob/g) tespit edilmiş olup, en düşük sayı ise SC ile üretilen makarnalarda (6.79 log kob/g) tespit edilmiştir. Ayrıca depolama ile birlikte *B. coagulans* sayısında en fazla azalma *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnalarda (%11) tespit edilmiş olup, onu STp (%3) ve SC (%2) ile üretilen örnekler izlemektedir. Örneklerin içerdiği *B. coagulans* sayısı üzerinde depolamanın etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bağımlı t-testine göre SC ilavesi ile üretilen örneklerde *B. coagulans* sayısının depolama ile önemli ölçüde etkilendiği, *B. coagulans* GBI-30, 6086, SD, SPi ve STp ile üretilen örneklerde ise önemli farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

4.14.1. Pişmiş Örneklerin *B. coagulans* Sayısı

Makarnaların pişirilme işlemi sırasında 5., 7., 9. ve 11. dakikalarda alınan örneklerin *B. coagulans* sayıları tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.22'de verilmiştir.

Çizelge 4.19. Farklı pişme sürelerinde örneklerde bulunan *B. coagulans* sayıları (log kob/g)

Depolama Süresi (Ay)	Kullanılan Bakteri	5	7	9	11
0	Bc	7.20±0.03 ^a	6.57±0.23 ^a	6.27±0.11 ^a	6.08±0.09 ^a
	SC	6.75±0.07 ^a	6.63±0.04 ^a	6.45±0.08 ^a	6.23±0.07 ^a
	SD	6.86±0.35 ^a	6.84±0.19 ^a	6.60±0.28 ^a	6.20±0.42 ^a
	SPi	7.20±0.28 ^a	6.50±0.49 ^a	6.24±0.34 ^a	6.13±0.25 ^a
	STp	6.83±0.18 ^a	6.68±0.13 ^a	6.39±0.13 ^a	5.96±0.17 ^a
6	Bc	7.73±0.82 ^a	7.43±0.18 ^a	7.08±0.08 ^a	6.00±0.70 ^a
	SC	6.72±0.04 ^{ab}	6.54±0.08 ^b	6.26±0.06 ^b	6.14±0.09 ^a
	SD	6.70±0.07 ^{ab}	6.47±0.06 ^b	6.33±0.07 ^b	6.12±0.11 ^a
	SPi	6.39±0.21 ^b	6.35±0.28 ^b	6.23±0.18 ^b	5.95±0.11 ^a
	STp	6.28±0.17 ^b	6.19±0.27 ^b	6.08±0.18 ^b	5.91±0.29 ^a

^{a,b} Aynı sütunda her bir depolama süresi için farklı üstel harfle belirtilen değerler istatistiksel olarak ($p<0.05$) birbirinden farklıdır. (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086)

Probiyotik makarnaların üretim gününde yapılmış pişme analizlerinde 5., 7., 9. ve 11. dk'da alınan örneklerde farklı *B. coagulans* kullanımının örneklerde bulunan *B. coagulans* sayısı üzerinde istatistiksel açıdan önemli farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir. Örneklerin 5 dk pişirilmelerinin ardından *B. coagulans* sayısında en fazla düşme oranı *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnalarda (%13) görülmüş olup, onu STp (%8) takip etmektedir. Örneklerin 7, 9 ve 11 dk pişirilmesinin ardından *B. coagulans* sayısında en fazla düşme oranı *B. coagulans* GBI-30, 6086 (sırasıyla %20, %24 ve %26) ile üretilen makarnalarda gözlenmiştir. İzole edilmiş *B. coagulans*'lar arasında 7. ve 9. dk'da *B. coagulans* sayısında en fazla azalma olan örnek SPi (sırasıyla %12 ve %15) ile üretilen makarnalar olup, onu STp (%10 ve %14) ile üretilen makarnalar izlemektedir. Örneklerin 11 dk pişirilmesinin ardından ise *B. coagulans* sayılarında tespit edilen

en fazla azalma oranı %20 ile STp kullanılarak üretilen makarnalarda gözlenmiş olup, onu %17 kayıp ile SPi kullanılarak üretilen makarnalar izlemektedir.

Probiyotik makarna örneklerinin 6 ay depolanmasının ardından 5 dk pişirilmesi ile *B. coagulans* sayıları açısından *B. coagulans* GBI-30, 6086 kullanılarak üretilen makarnalar ile SPi ve STp ilave edilerek üretilen makarnalar arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmuştur. Pişirme işleminin 5., 7., ve 9. dk'larında alınan örnekler arasında *B. coagulans* sayısında en fazla kayıp oranı STp (sırasıyla %13, %14 ve %15) kullanılarak üretilen makarnalarda tespit edilmiş olup, bunu SPi ile üretilen makarnalar (sırasıyla %12, %13 ve %14) izlemektedir. Örneklerin 6 ay depolanmalarının ardından 11 dk pişirilmesi ile birbirleri arasında *B. coagulans* sayısı açısından istatistiksel olarak önemli farklılık olmadığı tespit edilmiş olup, *B. coagulans* GBI-30, 6086, SPi ve STp ile üretilen makarnalarda *B. coagulans* sayısının %18 oranında düştüğü tespit edilmiştir. Hem üretim gününde hem de 6 ay depolanan örnekler arasında pişirme sırasında *B. coagulans* sayısında en az azalma oranı olan örnek ise SC ile üretilen makarnalar olup, azalma yüzdeleri 5 dk, 7 dk, 9 dk ve 11 dk pişirilen örnekler için sırasıyla üretim gününde alınan örneklerde %2, %4, %6, ve %10 olarak, 6 ay depolanan örneklerde ise %1, %3, %7, ve %9 olarak tespit edilmiştir.

Pişiş makarna örneklerinin içerdığı *B. coagulans* sayısı üzerine depolamanın etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bağımlı t-testine göre 5 dk pişirilen örneklerde SPi ve STp ilavesi ile üretilen makarnalarda depolamanın *B. coagulans* sayısını önemli ölçüde etkilediğı sonucuna varılmıştır. Örneklerin 7 dk pişirilmeleri sonucunda sadece *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile üretilen makarnaların içerdikleri *B. coagulans* sayıları önemli ölçüde etkilenmiştir. Örneklerin 9 dk pişirilmeleri ile sadece SC örneğinde bulunan *B. coagulans* sayısının depolamadan önemli ölçüde etkilendiğı tespit edilmiştir. Makarna örneklerinin 11 dk pişirilmelerinin ardından ise örnekler arasında depolamanın istatistiksel açıdan önemli farklılık oluşturmadiğı sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, farklı gıda kaynaklarından izole edilerek moleküler ve geleneksel yöntemlerle tanımlamaları yapılmış 4 farklı *B. coagulans* ile ticari probiyotik bir bakteri olan *B. coagulans* GBI-30, 6086'nın probiyotik ve toksikolojik özellikleri belirlenmiş olup, izole edilmiş *B. coagulans*'lardan elde edilen sonuçlar *B. coagulans* GBI-30, 6086 ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Ardından izole edilmiş *B. coagulans* sporları ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 kullanılarak probiyotik makarna üretimi gerçekleştirilmiştir. Makarnaların hem üretim günü hem de 6 ay oda sıcaklığında depolanmalarının ardından kalite ve mikrobiyolojik özellikleri belirlenmiştir. Aşağıda, araştırmadan elde edilen genel sonuç ve öneriler verilmektedir:

- *B. coagulans*'ların izole edildiği örnekler Zittau (Almanya) şehrinde bulunan yerel marketlerden temin edilmiştir.
- *B. coagulans* sporlarına 80°C ve 90°C'de 30 dk ısıtma işlemi uygulanması spor konsantrasyonunda gerçekleşen düşüşün 1 log kob/mL değerinden daha az olduğu gözlemlenmiştir. 100°C'de 30 dk ısıtma işlemi uygulanmasının ardından *B. coagulans* GBI-30, 6086 spor sayısı 4.91 log kob/mL'ye düşerken, SC sporları 4.97 log/mL'ye, SD sporları 4.46 log kob/mL'ye, SPi sporları 5.47 log kob/mL'ye, ve STp sporları ise 3.24 log kob/mL'ye düşmüştür.
- *B. coagulans* sporlarının k değerleri hesaplanmış olup, en yüksek k değerinin 100°C'de STp (1.27) suşunun sporlarına ait olduğu, en düşük k değerinin ise 80°C'de SPi (0.09) suşunun sporlarına ait olduğu bulunmuştur.
- Başlangıçta 6 log kob/mL konsantrasyonunda olan *B. coagulans* suşlarının pH 1 olan ortamda 1 saat inkübe edilmeleriyle *B. coagulans* GBI-30, 6086 sayısı yaklaşık olarak 2 log kob/mL düşerken, hücre sayısında en fazla

azalma olan SC sayısı ise 4 log kob/mL düşmüş ve inkübasyon sonunda 2 log kob/mL konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir. STp hücre sayısının ise 1.70 log kob/mL azaldığı tespit edilmiştir. Bakterilerin pH 1 olan ortamda 3 saat inkübasyonu sonunda *B. coagulans* GBI-30, 6086 sayısı 2 log kob/mL azalırken, STp sayısı 2.5 log kob/mL, SD sayısı ise 3 log kob/mL azalmış olarak bulunmuştur. Bakterilerin pH 2 olan ortamda 1 saat inkübasyonun ardından *B. coagulans* GBI-30, 6086 ve SD hücre sayılarında 2 log kob/mL azalma olurken, SPi ve STp sayılarında yaklaşık olarak 1.5 log kob/mL kadar azalma tespit edilmiştir. 3 saat inkübasyonun ardından ise SD ve STp hücre sayılarında önemli bir azalma olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, izole edilen *B. coagulans* hücrelerinin düşük pH'larda canlılıklarını koruyabildikleri, böylece düşük pH'ya sahip olan sindirim sisteminde de canlılıklarını sürdürebilecekleri sonucuna varılmıştır.

- *B. coagulans* GBI-30, 6086 ve izole edilen bakterilerin safra tuzuna dayanımları ile ilgili elde edilen sonuçlara göre, %0.3 safra tuzu içeren ortamda 1 ve 3 saat inkübasyonun ardından SD hücre sayısının *B. coagulans* GBI-30, 6086 sayısı ile benzer olduğu tespit edilmiş olup, diğer izole edilmiş *B. coagulans*'ların da canlılıklarını önemli ölçüde korudukları gözlenmiştir. %0.5 safra tuzu içeren ortamda ise 1 saat inkübasyondan sonra SC hücreleri, 3 saat inkübasyondan sonra ise hem SC hem de SPi hücreleri tespit edilememiştir. Fakat 3 sa inkübasyonun sonunda SD hücre sayısı *B. coagulans* GBI-30, 6086 sayısı ile istatistiksel olarak benzerlik göstermiş olup STp hücreleri de (2.30 log kob/mL) ortamda varlığını sürdürmeye devam etmiştir. Böylece SD ve STp hücrelerinin safra tuzu bulunan sindirim sisteminde canlılıklarını sürdürebileceği sonucuna varılmıştır.

- Bakterilerin lizozim dirençlerine bakıldığında, en yüksek direncin SD'de olduğu, onu SPi, STp ve *B. coagulans* GBI-30, 6086'nın takip ettiği, en düşük lizozim direncinin ise SC'de olduğu tespit edilmiştir.
- Bakterilerin biyofilm üretimi özelliklerine bakıldığında, çalışılan tüm bakterilerin biyofilm üretebilme yeteneğine sahip olduğu, SD hariç diğer bakterilerin *B. coagulans* GBI-30, 6086'nın biyofilm üretimleri ile benzer olduğu sonucuna varılmıştır.
- Bakterilerin antibakteriyel aktivitelerine bakıldığında, *B. cereus*, *E. coli* NCTC 12241, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *Salmonella* spp. üzerinde genel olarak *B. coagulans* GBI-30, 6086'dan daha fazla inhibe edici etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.
- Antibiyotik dirençleri açısından incelendiğinde, genel olarak test edilen tüm antibiyotikler için en az direnç *B. coagulans* GBI-30, 6086'da gözlenmiştir.
- Bakterilerin adhezyon özelliklerine bakıldığında, en yüksek adhezyon kapasitesinin *B. coagulans* GBI-30, 6086'da (%68) olduğu, onu %31 adhezyon ile SPi ve %23 adhezyon ile STp'nin izlediği tespit edilmiştir.
- Otoagregasyon özellikleri açısından incelendiklerinde sonuçların inkübasyon süresine göre değiştiği tespit edilmiştir. 2 saat inkübasyonun ardından en yüksek adhezyon SC'de gözlenirken, 16 sa, 20 sa ve 24 sa inkübasyonun ardından en yüksek adhezyon *B. coagulans* GBI-30, 6086'da gözlenmiş olup, onu SPi ve STp takip etmektedir.
- Bakterilerin test kültürleriyle (*E. coli* NCTC 12241, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *B. subtilis* ve *Salmonella* spp.) koagregasyon yeteneklerine bakıldığında, genel olarak bütün *B. coagulans*'ların koagregasyon yeteneğine sahip olduğu fakat bu özelliğin inkübasyon süresi ile değiştiği tespit edilmiştir. *E. coli* NCTC 12241, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *B. subtilis* ile en yüksek koagregasyon değerleri SD ile 2 ve 4 saat inkübasyon

sonunda gözlenirken, *Salmonella* spp. ile en yüksek koagregasyon ise STp ile gözlenmiştir.

- Toksikolojik özellikleri açısından incelendiğinde hem PCR hem de ticari kitlerle yapılan analizlerde, bakterilerin toksijenik gen bulundurmadığı ve toksin üretiminin gerçekleşmediği sonucuna varılmıştır.
- Bakterilerin hemoliz ve lesitinaz aktivitelerinin negatif olduğu tespit edilmiştir.
- Probiyotik makarna örneklerinin nem içeriklerinin 6 ay depolamayla birlikte azaldığı gözlenmiştir.
- Depolama işleminin makarnaların pişme süresi üzerine etki etmediği sonucuna varılmıştır.
- Makarna örneklerinin su absorpsiyonu değerlerine bakıldığında, su absorpsiyonlarının depolama ile arttığı ve probiyotik ilavesi ile azaldığı tespit edilmiştir.
- Pişme kayıpları açısından incelendiğinde, makarnaların depolanması ile pişme kayıp değerlerinin arttığı tespit edilmiş olup, probiyotik ilavesi ile ise azaldığı gözlenmiştir.
- Probiyotik makarna örneklerinde tekstür özellikleri dikkate alındığında, depolama ile sertlik değerlerinin arttığı tespit edilmiştir.
- Renk değerleri bakımından incelendiğinde, üretim gününde yapılan analizlerde pişmiş örneklerin L* değerlerinin istatistiksel açıdan benzer olduğu tespit edilmiştir. Kuru örneklerin depolama ile L* değerleri düşerken, pişmiş örneklerde ise artış olmuştur. Hem pişmiş hem de kuru örneklerin a ve b değerleri depolama ile birlikte genel olarak düşmüştür.
- Duyusal analiz sonuçları incelendiğinde, üretim günü ve depolamanın ardından en çok kontrol örneği ve *B. coagulans* GBI-30, 6086 ilavesiyle üretilen örnekler beğenilmiş olsa da, izole edilmiş *B. coagulans* ilavesiyle

üretilen makarnaların genel olarak kabul edilebilir değerin üzerinde olduğu sonucuna varılmıştır.

- Makarnaların üretim gününde ve 6 ay depolama sonunda probiyotik gıda olarak değerlendirilebilmeleri için yeterli sayıda ($> 6 \log \text{ kob/g}$) *B. coagulans* içerdikleri tespit edilmiştir.
- Makarnaların üretimi günü ve 6 ay depolama sonunda 9 dk pişirilmelerinin ardından içerdikleri *B. coagulans* değerlerinin $6 \log \text{ kob/g}$ sınırından yukarıda olduğu tespit edilmiştir.
- Makarnaların 11 dk pişirilmelerinin ardından ise, STp ile üretilen makarnaların üretim gününde ve depolamadan sonra *B. coagulans* sayılarının bu sınırın altına düştüğü, SPi ile üretilen makarnaların ise sadece depolamadan sonra bu sınırın altına düştüğü tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada sebzelerden izole edilen *B. coagulans*'lar kullanılarak termal direnç, düşük pH ve safra tuzu dirençleri, lizozim ve antibiyotik duyarlılıkları, biyofilm üretimleri, adhezyon ve agregasyon özellikleri ve antibakteriyel özellikleri değerlendirilmiş ve bu bakteriler kullanılarak fonksiyonel gıda çeşidini arttırmak amacıyla probiyotik makarnalar üretilmiştir. Üretilen probiyotik makarnalar erişim ve hazırlanmasının kolaylığı, uzun raf ömrü, oda sıcaklığında depolanabilmesi, düşük maliyetli olması ve vegan bir ürün olmasıyla geniş çapta tüketicilerin ilgisini çekecek bir probiyotik fonksiyonel gıda olacağı düşünülmektedir.

Probiyotik kültürlerin sahip oldukları özellikler suşa bağlı olduğundan, yeni probiyotik kültürlerin izole edilmesi her zaman önem arz etmektedir. İzole edilen *B. coagulans* kültürlerinin probiyotik olarak kullanılmaları amacıyla önemli özelliklere sahip oldukları tespit edilmiş olsa da probiyotik olarak tüketime sunulmadan önce *in vivo* özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca yapılacak çalışmalarla hücre duvarlarının bileşimleri ve özellikleri belirlenerek

hidrokarbonlara adhezyon, otoagregasyon ve koagregasyon mekanizmaları daha iyi anlaşılacaktır. Bunlara ek olarak, bu bakteriler kullanılarak, farklı probiyotik fonksiyonel gıdaların üretilmesi üzerine çalışılmalı, ayrıca ürünlerin gıda endüstrisinde üretilibilmeleri göz önünde bulundurularak, gıda endüstrisinde kullanılan proseslerde çeşitli işlemlere maruz kalan bakterilerin canlılıkları değerlendirilmelidir.



KAYNAKLAR

- AACC, 1999a. Moisture. AACC Approved Methods of Analysis, 11th Edition 44-19.01. <https://doi.org/10.1094/AACCIntMethod-44-19.01>.
- AACC, 1999b. Total Ash. AACC Approved Methods of Analysis, 11th Edition 08-12.01. <https://doi.org/10.1094/AACCIntMethod-08-12.01>
- Abada, E., A., E., M., 2008. Isolation and characterization of a antimicrobial compound from *Bacillus coagulans*. Animal Cells and Systems, 12(1):41-46. <https://doi.org/10.1080/19768354.2008.9647152>
- Abdhul, K., Ganesh, M., Shanmughapriya, S., Vanithamani, S., Kanagavel., M., Anbarasu., K., ve Natarajaseenivasan., K., 2015. Bacteriocinogenic potential of a probiotic strain *Bacillus coagulans* [BDU3] from Ngari. International Journal of Biological Macromolecules 79:800–806.
- Acquistucci, R., 2000. Influence of maillard reaction on protein modification and colour development in pasta. Comparison of Different Drying Conditions. Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 33:48-52.
- Adibpour, N., Hosseininezhad, M., ve Pahlevanlo, A., 2019. Application of spore-forming probiotic *Bacillus* in the production of Nabat - A new functional sweetener LWT - Food Science and Technology, 113:108277.
- Agüero, N., D., L., Frizzo, L., S., Ouwehand, A., C., Aleu, G., ve Rosmini, M., R., 2020. Technological characterisation of probiotic lactic acid bacteria as starter cultures for dry fermented sausages. Foods, 9(5):1–18. <https://doi.org/10.3390/foods9050596>
- Alexandri, M., Neu, A., K., Schneider, R., López-Gómez, J., P., ve Venus, J., 2019. Evaluation of various *Bacillus coagulans* isolates for the production of high purity L-lactic acid using defatted rice bran hydrolysates. International Journal of Food Science & Technology, 54(4):1321-1329.

- Algburi, A., Volski, A., Cugini, C., Walsh, E., M., Chistyakov, V., A., Mazanko, M., S., Bren, A., B., Dicks, L., M., T. ve Chikindas, M., L., 2016. Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*, 6:432-452. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.66043>
- Almada-Érix, C. N., Almada, C. N., Pedrosa, G. T. S., Biachi, J. P., Bonatto, M. S., Schmiele, M., Nabeshima, E. H., Clerici, M. T. P. S., Magnani, M., ve Sant'Ana, A. S., 2022. Bread as probiotic carriers: Resistance of *Bacillus coagulans* GBI-30 6086 spores through processing steps. *Food Research International*, 155:111040. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111040>
- Amoah, K., Dong, X., H., Tan, B., P., Zhang, S., Chi, S., Y., Yang, Q. H., Li, H. Y., Yang, Y. Z., ve Zhang, H., 2021. Effects of three probiotic strains (*Bacillus coagulans*, *B. licheniformis* and *Paenibacillus polymyxa*) on growth, immune response, gut morphology and microbiota, and resistance against *Vibrio harveyi* of northern whittings, *Sillago sihama* Forsskål (1775). *Animal Feed Science and Technology*, 277:114958. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114958>
- Anaya-Loyola, M., Enciso-Moreno, J., A., Lopez-Ramos, J., E., Garcia-Marin, G., Alvarez, M., Y., O., Vega-Garcia, A., M., Mosqueda, J., García-Gutiérrez, D., G., Keller, D., ve Pérez-Ramírez, I., F., 2019. *Bacillus coagulans* GBI-30, 6068 decreases upper respiratory and gastrointestinal tract symptoms in healthy Mexican scholar-aged children by modulating immune-related proteins. *Food Research International*, 125:108567.
- Arani, N., M., Emam-Djomeh, Z., Tavakolipour, H., Sharafati-Chaleshtori, R., Soleimani, A., ve Asemi, Z., 2019. The effects of probiotic honey consumption on metabolic status in patients with diabetic nephropathy: a randomized, double-blind, controlled trial. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11:1195–1201. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9468-x>

- Arena, M., Caggianiello, G., Fiocco, D., Russo, P., Torelli, M., Spano, G., ve Capozzi, V., 2014. International Journal of Molecular Sciences, 15:3025-3039.
- Aspri, M., Papademas, P., ve Tsaltas, D., 2020. Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products. Fermentation, 6:30. doi:10.3390/fermentation6010030
- Aşan Özusağlam, M., 2010. Hayvan beslemede *Bacillus coagulans* bakterisinin probiyotik olarak önemi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 5(1):50-57.
- Atraki, R., ve Azizkhani, M., 2021. Survival of probiotic bacteria nanoencapsulated within biopolymers in a simulated gastrointestinal model. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 72:102750. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102750>
- Aulitto, M., Fusco, S., Nickel, D., B., Bartolucci, S., Contursi, P., ve Franzén, C., J., 2019. Seed culture pre-adaptation of *Bacillus coagulans* MA-13 improves lactic acid production in simultaneous saccharification and fermentation. Biotechnology for Biofuels, 12(1):45.
- Ayriç Danışman, F., Taştan, Ö., ve Baysal, T., 2022. Development of intermediate-moisture apricot with impregnation of *Bacillus coagulans* GBI-30 6086 as a functional snack: Quality assessment during storage. Journal of Food Processing and Preservation, 46(3):e16348. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16348>
- Ayyash, M., Olaimat, A., Al-Nabulsi, A., ve Liu, S. Q., 2020. Bioactive properties of novel probiotic *Lactococcus lactis* fermented camel sausages: Cytotoxicity, angiotensin converting enzyme inhibition, antioxidant capacity, and antidiabetic activity. Food Science of Animal Resources, 40(2):155–171. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e1>

- Bagkar, P., Dixit, Y., Tiwari, A., Gupta, A., K., ve Maity, C., 2021. Process and storage stability of *Bacillus coagulans* LBSC in food matrices and appraisal of calorific restriction. *Applied Food Biotechnology*, 8(1):57-69. <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v8i1.31212>
- Baiano, A., Conte, A., ve Del Nobile, M., A., 2006. Influence of drying temperature on the spaghetti cooking quality. *Journal of Food Engineering*, 76:341-347.
- Baiano, A., Di Chio, A. G., ve Scapola, D., 2019. Analysis of cracking and breakage in dried pasta: a case study. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11(8): 713-717.
- Barbosa, T., M., Serra, C., R., La Ragione, R., M., Woodward, M., J., ve Henriques, A., O., 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:968-978.
- Benson, K., F., Redman, K., A., Carter, S., G., Keller, D., Farmer, S., Endres, J., R., ve Jensen, G., S., 2012. Probiotic metabolites from *Bacillus coagulans* GanedenBC30™ support maturation of antigen-presenting cells in vitro. *World Journal of Gastroenterology*, 28, 18(16):1875-1883
- Berer, K., ve Krishnamoorthy, G., 2012. Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta Neuropathol*, 123:639–651. doi:10.1007/s00401-012-0949-9
- Bianchi, F., Tolve, R., Rainero, G., Bordiga, M., Brennan, C. S., ve Simonato, B., 2021. Technological, nutritional and sensory properties of pasta fortified with agro-industrial by-products: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 56, 4356-4366. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15168>
- Boricha, A., A., Shekh, S., L., Pithva, S., P., Ambalam, P., S., ve Vyas, B., R., M., 2019. In vitro evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin. *LWT - Food Science and Technology*, 106:201–208.

- Borrelli, G., M., De Leonardis, A., M., Fares, C., Platani, C., ve Di Fonzo, N., 2003. Effects of modified processing conditions on oxidative properties of semolina dough and pasta. *Cereal Chem.* 80(2):225–231.
- Boukid, F., 2021. *Cereal-based foodstuffs: The backbone of Mediterranean Cuisine* (1st ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-69228-5>
- Bozkurt, H., ve Aslım, B., 2004. İmmobilizasyonun Probiyotik Kültürlerde Kullanımı. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(7):01-14.
- Bresciani, A., Giuberti, G., Cervini, M., ve Marti, A., 2021. Pasta from yellow lentils: How process affects starch features and pasta quality. *Food Chemistry*, 364: 130387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130387>
- Bruneel, C., Buggenhout, J., Lagrain, B., Brijs, K., ve Delcour, J., A., 2016. Redox agents and N-ethylmaleimide affect protein polymerization during laboratory scale dry pasta production and cooking. *Food Chemistry*, 196:646-653.
- Bruneel, C., Pareyt, B., Brijs, K., ve Delcour, J. A., 2010. The impact of the protein network on the pasting and cooking properties of dry pasta products. *Food Chemistry*, 120:371–378. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.069
- Bustos, M., C., Perez, G., T., ve León, A. E., 2011a. Sensory and nutritional attributes of fibre-enriched pasta. *LWT - Food Science and Technology* 44:1429-1434.
- Bustos, M., C., Perez, G., T., ve León, A. E., 2011b. Effect of four types of dietary fiber on the technological quality of pasta. *Food Sci Tech Int*, 17(3):0213–9.
- Bustos, M., C., Perez, G., T., ve León, A., E., 2013. Combination of resistant starches types II and IV with minimal amounts of oat bran yields good quality, low glycaemic index pasta. *International Journal of Food Science and Technology*, 48:309-315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03188.x>

- Bustos, M., C., Perez, G., T., ve León, A., E., 2015. Structure and quality of pasta enriched with functional ingredients. *RSC Advances*, 5(39):30780-30792.
- Butkhot, N., Soodsawaeng, P., Vuthiphandchai, V., ve Nimrat, S., 2019. Characterisation and biosafety evaluation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus velezensis* BUU004. *International Food Research Journal* 26(5):1617-1625.
- Cao, J., Yu, Z., Liu, W., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., ve Chen, W., 2020. Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. *Journal of Functional Foods*, 64:103643.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D., T., Corfe, B., M., ve Owen, L., J., 2015. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26(1):26191. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26191>
- Carpentieri, S., Larrea-Wachtendorff, D., Donsi, F., ve Ferrari, G., 2022. Functionalization of pasta through the incorporation of bioactive compounds from agri-food by-products: Fundamentals, opportunities, and drawbacks. *Trends in Food Science & Technology*, 122:49-65. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.011>
- Cattani, F., Dolan, K., D., Oliveira, S., D., Mishra, D., K., Ferreira, C., A., S., Periago, P., M., Aznar, A., Fernandez, P., S., ve Valdramidis, V., P., 2016. One-step global parameter estimation of kinetic inactivation parameters for *Bacillus sporothermodurans* spores under static and dynamic thermal processes. *Food Research International* 89:614–619.
- Celandroni, F., Vecchione, A., Cara, A., Mazzantini, D., Lupetti, A., ve Ghelardi, E., 2019. Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. *PLoS ONE* 14(5):e0217021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217021>
- Cencic, A., ve Chingwaru, W., 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, 2:611–625.

- Cesena, C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T., Vilpponen-Salmela, T., ve Von Wright, A., 2001. *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. *Journal of Dairy Science*, 84(5):1001-1010.
- Choi, N., Y., Kim, B., R., Bae, Y., M., ve Lee, S., Y., 2013. Biofilm formation, attachment, and cell hydrophobicity of foodborne pathogens under varied environmental conditions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56(2):207–220. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-3253-4>
- Choi, Y., Park, E., Kim, S., Ha, J., Oh, H., Kim, Y., Lee, Y., Seo, Y., Kang, J., Lee, S., Lee, H., Yoon, Y., ve Choi, K., H., 2021. Alleviation of periodontal disease using *Lactobacillus curvatus* SMFM2016-NK. *Journal of Functional Foods*, 83:104531. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104531>
- Coelho, L., F., Beitel, S., M., Sass, D., C., Neto, P., M., A., ve Contiero, J., 2018. High-titer and productivity of L-(+)-lactic acid using exponential fed-batch fermentation with *Bacillus coagulans* arr4, a new thermotolerant bacterial strain. *3 Biotech*, 8(4):213.
- Coleri Cihan, A., Karaca, B., Ozel, B., P., ve Kilic, T., 2017. Determination of the biofilm production capacities and characteristics of members belonging to *Bacillaceae* family. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(6):1–13. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2271-0>
- Collado, M., C., Gueimonde, M., Hernandez, M., Sanz, Y., ve Salminen, S., 2005. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of food protection*, 68(12):2672-2678. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.12.2672>
- Collado, M., C., Meriluoto, J., ve Salminen, S., 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226:1065-1073.

- Collado, M., C., Meriluoto, J., ve Salminen, S., 2007. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 71(1):71–74. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.07.005>
- Condon, S., Bayante, M., ve Sala, F. J., 1992. Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 73:251–256.
- Cunin, C., Handschin, S., Walther, P., ve Escher, F., 1995. Structural changes of starch during cooking of durum wheat pasta. *Food Science and Technology – Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28(3):323–328.
- Cunningham, S., E., McMinn, W., A., M., Magee, T., R., A., ve Richardson, P., S., 2007. Modelling water absorption of pasta during soaking. *Journal of Food Engineering* 82:600–607.
- Cutting, S. M., 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* 28:214–220.
- De Angelis, M., Di Cagno, R., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., Gaenzle, M., Ciati, R., ve Gobbetti, M., 2006. Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Agric. Food Chem.* 54:9873–9881.
- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N., A., ve Devos, P., 2004. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Systematic & Applied Microbiology*, 27(1):50–60.
- de la Peña, E., ve Manthey, F. A., 2014. Ingredient composition and pasta:water cooking ratio affect cooking properties of nontraditional spaghetti. *International Journal of Food Science and Technology*, 49:2323–2330. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12549>
- De Palma, G., Collins, S., M., Bercik, P., ve Verdu, E., F., 2014. The microbiota–gut–brain axis in gastrointestinal disorders: stressed bugs, stressed brain or both? *J Physiol* 592(14):2989–2997. doi:10.1113/jphysiol.2014.273995

- Del Nobile, M., A., Baiano, A., Conte, A., ve Mocci, G., 2005. Influence of protein content on spaghetti cooking quality. *Journal of Cereal Science* 41:347–356
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., ve Palenzona, D., 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31:438-442.
- Desai, A., S., Brennan, M., A., ve Brennan, C., S., 2019. Influence of semolina replacement with salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) powder on the physicochemical attributes of fresh pasta. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(5):1497–1505. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13842>
- Dib, W., Grar, H., Gourine, H., El Mecherfi, K. E., Negaoui, H., Biscola, V., Kaddouri, H., Chobert, J., M., Haertle, T., Saidi, D., ve Kheroua, O., 2019. Prophylactic properties of *Bacillus subtilis* in a bovine β -lactoglobulin sensitized mice model. *European Food Research and Technology*, 245(7):1357-1364.
- Din, A., U., Hassan, A., Zhu, Y., Zhang, K., Wang, Y., Li, T., Wang, Y., ve Wang, G., 2020. Inhibitory effect of *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 on colitis and its mechanism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 79:108353. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108353>
- Dizlek, H., Özer, M. S., ve Gül, H., 2013. Farklı kükürt dozlarının ekmeklik ve makarnalık buğdayların nitelikleri üzerine etkileri. *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, 13:19-30.
- Dizlek, H., ve Ozer, M. S., 2016. The impacts of various ratios of different hydrocolloids and surfactants on quality characteristics of corn starch based gluten-free bread. *Cereal Research Communications* 44(2):298–308.

- Dlamini, Z., C., Langa, R., L., S., Aiyegoro, O., A., ve Okoh, A., I., 2019. Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2):397–402. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9430-y>
- Donskey, C., J., Hoyen, C., K., Das, S., M., Farmer, S., Dery, M., ve Bonomo, R., A., 2001. Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized mice. *Lett Appl Microbiol*, 33(1):84-88.
- Drago, L., Gismondo, M., R., Lombardi, A., de Haën, C., ve Gozzini, L., 1997. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiology Letters*, 153:455-463.
- Duc, L., H., Hong, H., A., Barbosa, T., M., Henriques, A., O., ve Cutting, S., M., 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied And Environmental Microbiology*, 70(4):2161–2171.
- Duysburgh, C., den Abbeele, P., V., Krishnan, K., Bayne, T., F., ve Marzorati, M., 2019. A synbiotic concept containing spore-forming *Bacillus* strains and a prebiotic fiber blend consistently enhanced metabolic activity by modulation of the gut microbiome in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*: X, 1:100021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2019.100021>
- EFSA, 2013. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). 11(11):3449.
- EFSA, 2020. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. *EFSA Journal*, 18(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6174>
- Elshaghabe, F., M., F., Rokana, N., Gulhane, R., D., Sharma, C., Panwar, H., 2017. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Frontiers Microbiol*, 8:1490.

- Endres, J., R., Clewell, A., Jade, K., A., Farber, T., Hauswirth, J., ve Schauss, A., G., 2009. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. Food and Chemical Toxicology, 47:1231–1238. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.018>
- Erginkaya, Z., Sarıkodal, E., Özkütük, S. T., Konuray, G., ve Ünal Turhan, E., 2019. Probiyotik bitter çikolata üretiminde mikroenkapsüle *Lactobacillus rhamnosus* kullanımı. Gıda, 44(2):238-247. doi: 10.15237/gida.GD19021
- Erginkaya, Z., ve Konuray, G., 2017. Natural preservatives: an alternative for chemical preservative used in foods. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Nutrition and Food Engineering, 11(4):311-316.
- Erginkaya, Z., Ünal, E., ve Kalkan, S., 2011. Importance of microbial antagonisms about food attribution. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. A. Méndez-Vilas (Ed.), Formatex. 1342-1348.
- Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nat. Rev. Microbiol, 1:117-126.
- Fadhil, Z., H., ve Akın, M., 2016. Probiyotik bakteri ile sebze sularının fermentasyonu. Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi Fen Dergisi, 42(1):01-09.
- Fakhry, S., Sorrentini, I., Ricca, E., De Felice, M., ve Baccigalupi, L., 2008. Characterization of spore forming Bacilli isolated from the human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology 105:2178–2186.
- Fan, R., Burghardt, J., P., Xiong, T., ve Czermak, P., 2020. Removal of small-molecular byproducts from crude fructo-oligosaccharide preparations by fermentation using the endospore-forming probiotic *Bacillus coagulans*. Fermentation, 6:6. doi:10.3390/fermentation6010006

- Fan, R., Ebrahimi, M., Quitmann, H., Aden, M., ve Czermak, P., 2016. An innovative optical sensor for the online monitoring and control of biomass concentration in a membrane bioreactor system for lactic acid production. *Sensors*, 16:411.
- Fares, C., Menga, V., Martina, A., Pellegrini, N., Scazzina, F. ve Torriani, S., 2015. Nutritional profile and cooking quality of a new functional pasta naturally enriched in phenolic acids, added with B-glucan and *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. *Jornal of Cereal Science*, 65:260-266. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.017>
- Feillet, P., Autran, J. C., ve Icard-Verniere, C., 2000. Pasta brownness: An assessment. *Journal of Cereal Science*, 32:215–233
- Ferrer, M., D., López-López, A., Nicolescu, T., Perez-Vilaplana, S., Boix-Amorós, A., Dzidic, M., Garcia, S., Artacho, A., Llena, C., ve Mira, A., 2020. Topic Application of the probiotic *Streptococcus dentisani* improves clinical and microbiological parameters associated with oral health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(465):1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00465>
- Ficco, D., B., M., Mastrangelo, A., M., Trono, D., Borrelli, G., M., De Vita, P., Fares, C., Beleggia, R., Platani, C., ve Papa, R., 2014. The colours of durum wheat: a review. *Crop & Pasture Science*, 65:1–15.
- Fitzpatrick, L., R., Small, J., S., Greene, W., Karpa, K., D., ve Keller, D., 2011. *Bacillus coagulans* GBI-30 (BC30) improves indices of *Clostridium difficile*-induced colitis in mice. *Gut Pathogens*, 3:16.
- Forrester, I., T., ve Wicken, A., J., 1966. The chemical composition of the cell walls of some thermophilic bacilli. *Microbiology*, 42(1):147–154.
- Foschia, M., Peressini, D., Sensidoni, A., ve Brennan, C., S., 2013. The effects of dietary fibre addition on the quality of common cereal products. *Journal of Cereal Science* 58:216-227.

- Fu, B., X., 2008. Asian noodles: History, classification, raw materials, and processing. *Food Research International*, 41:888–902.
- Fu, B., X., Assefaw, E., G., Sarkar, A., K., ve Carson, G., R., 2006. Evaluation of durum wheat fine flour for alkaline noodle processing. *Cereal Foods World*, 51(4):178-183.
- Fu, B., X., Schlichting, L., Pozniak, C., J., ve Singh, A., K., 2013. Pigment loss from semolina to dough: Rapid measurement and relationship with pasta colour. *Journal of Cereal Science*, 57:560-566.
- Fuad, T., ve Prabhasankar, P., 2010. Role of Ingredients in Pasta Product Quality: A Review on Recent Developments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50:787–798.
- Gaucher, F., Rabah, H., Kponouglo, K., Bonnassie, S., Pottier, S., Dolivet, A., Marchand, P., Jeantet, R., Blanc, P., ve Jan, G., 2020. Intracellular osmoprotectant concentrations determine *Propionibacterium freudenreichii* survival during drying. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(7):3145–3156. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10425-1>
- Gaudana, S., B., Dhanani, A., S., ve Bagchi, T., 2010. Probiotic attributes of *Lactobacillus strains* isolated from food and of human origin. *British Journal of Nutrition*, 103,1620–1628.
- Gonzalez-Aguilar, G., A., Ayala-Zavala, J., F., Olivas, G., I., De La Rosa, L., A., ve Alvarez-Parrilla, E., 2010. Preserving quality of fresh-cut products using safe technologies. *J. Verbr. Lebensm*, 5:65–72.
- Goubet, A., G., Wheeler, R., Fluckiger, A., Qu, B., Lemaître, F., Iribarren, K., Mondragon, L., Alou, M. T., Pizzato, E., Durand, S., Derosa, L., Aprahamian, F., Bossut, N., Moya-Nilges, M., Derrien, D., Chen, G., Leduc, M., Joseph, A., Pons, N., Le Chatelier, E., Segata, N., Yonekura, S., Iebba, V., Kepp, O., Raoult, D., Andre, F., Kroemer, G., Boneca, I. G., Zitvogel, L., ve Daillère, R., 2021. Multifaceted modes of action of the anticancer probiotic *Enterococcus hirae*. *Cell Death and Differentiation*, 28(7):2276–2295. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00753-8>

- Gull, A., Prasad, K., ve Kumar, P. 2017. Quality changes in functional pasta during storage in two different packaging materials: LDPE and BOPP. Journal of Food Processing and Preservation, 41(5):e13115. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13115>
- Guo, X., Chen, D. D., Peng, K. S., Cui, Z. W., Zhang, X. J., Li, S., ve Zhang, Y. A., 2016. Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. Fish & Shellfish Immunology, 52:74-84.
- Güler, S., Köksel, H., ve Ng, P.K.W., 2002. Effects of industrial pasta drying temperatures on starch properties and pasta quality. Food Research International 35: 421–427.
- Halkman, A., K., 2005. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Merck, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara, 358.
- Hamdy, A., A., Elattal, N., A., Amin, M., A., Ali, A., E., Mansour, N., M., Awad, G., E., A., Awad, H., M., ve Esawy, M., A., 2017. Possible correlation between levansucrase production and probiotic activity of *Bacillus* sp. isolated from honey and honey bee. World J Microbiol Biotechnol, 33:69.
- Heenan, C., N., Adams, M., C., Hosken, R., W., ve Fleet, G. H., 2004. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. LWT - Food Science and Technology, 37(4):461-466. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.11.001>
- Heneen, W., K., ve Brismar, K., 2003. Structure of cooked spaghetti of durum and bread wheats. Starch/Stärke 55, 546–557.
- Henriques, A., O., ve Moran Jr., C., P., 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. Annu. Rev. Microbiol, 61:555-588.
- Heo, S., Kim, J., H., Kwak, M., S., Sung, M., H., ve Jeong, D., W., 2021. Functional annotation genome unravels potential probiotic *Bacillus velezensis* strain KMU01 from traditional korean fermented Kimchi. Foods, 10:563. <https://doi.org/10.3390/foods10030563>

- Hernández-Gómez, J., G., López-Bonilla, A., Trejo-Tapia, G., Ávila-Reyes, S., V., Jiménez-Aparicio, A., R., ve Hernández-Sánchez, H., 2021. In vitro bile salt hydrolase (Bsh) activity screening of different probiotic microorganisms. *Foods*, 10(3):1–10. <https://doi.org/10.3390/foods10030674>
- Heydari, S., Amiri-Rigi, A., Ehsani M., R., Mohammadifar, M., A., Khorshidian, N., Koushki, M., R. ve Mortazavian, A., M., 2018. Rheological behaviour, sensory properties and syneresis of probiotic yoghurt supplemented with various prebiotics. *International Journal of Dairy Technology*, 71:175-184. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12491>
- Heyrman, J., ve Swings, J., 2001. 16S rDNA Sequence Analysis of Bacterial Isolates from Biodeteriorated Mural Paintings in the Servilia Tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). *Systematic and Applied Microbiology*, 24:417–422.
- Hojjati, M., Behabehani, B., A., ve Falah, F., 2020. Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic *Lactobacillus brevis* gp104 against *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 147:104420. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104420>
- Honda, H., Gibson, G., R., Farmer, S., Keller, D., ve McCartney, A., L., 2011. Use of a continuous culture fermentation system to investigate the effect of GanedenBC30 (*Bacillus coagulans* GBI-30, 6086) supplementation on pathogen survival in the human gut microbiota. *Anaerobe* 17:36-42.
- Hong, H., A., Khaneja, R., Tam, N., M., K., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M., Brisson, A., Gasbarrini, A., Barnes, I., ve Cutting, S. M., 2009a. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in Microbiology* 160, 134-143.

- Hong, H., A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E., ve Cutting, S. M., 2009b. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Research in Microbiology*, 160, 375-379.
- Hong, H., A., Huang, J., M., Khaneja, R., Hiep, L., V., Urdaci, M., C., ve Cutting, S., M., 2008. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*. 105, 510-520.
- Horie, M., Koike, T., Sugino, S., Umeno, A., ve Yoshida, Y., 2018. Evaluation of probiotic and prebiotic-like effects of *Bacillus subtilis* BN on growth of lactobacilli. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 64:26–33.
- Horneck, G., Bücker, H., ve Reitz, G., 1994. Long-term survival of bacterial spores in space. *Advances in Space Research*, 14(10):41–45.
- Hu, J., Zhang, Z., Lin, Y., Zhao, S., Mei, Y., Liang, Y., ve Peng, N., 2015. High-titer lactic acid production from NaOH-pretreated corn stover by *Bacillus coagulans* LA204 using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation under non-sterile condition. *Bioresour. Technol*, 182, 251–257.
- Huang, L., 2019. Reconciliation of the D/z model and the Arrhenius model: The effect of temperature on inactivation rates of chemical compounds and microorganisms. *Food Chemistry* 295:499–504.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A., H., ve Deschamps, A., 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 61:193–197.
- Icard-Vernière, C., ve Feillet, P., 1999. Effects of mixing conditions on pasta dough development and biochemical changes. *Cereal Chem.* 76(4):558–565.
- Ilango, S., ve Anthony, U., 2021. Probiotic microorganisms from non-dairy traditional fermented foods. *Trends in Food Science & Technology*, 118(A), 617-638. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.034>

- Jäger, R., Purpura, M., Farmer, S., Cash, H. A., ve Keller, D., 2018. Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 Improves Protein Absorption and Utilization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10:611-615.
- Jayani, T., Sanjeev, B., Marimuthu, S., ve Uthandi, S., 2020. Bacterial cellulose nano fiber (BCNF) as carrier support for the immobilization of probiotic, *Lactobacillus acidophilus* 016. *Carbohydrate Polymers*, 250:116965. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116965>
- Jazaeri, S., Bock, J. E., Bagagli, M. P., Iametti, S., Bonomi, F., ve Seetharaman, K., 2015. Structural modifications of gluten proteins in strong and weak wheat dough during mixing. *Cereal Chem.* 92(1):105–113.
- Jeon, H., L., Lee, N., K., Yang, S., J., Kim, W., S., ve Paik, H., D., 2017. Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. *Food Sci Biotechnol*, 26(6):1641–1648.
- Joubert, M., Lullien-Pellerin, V., ve Morel, M., H., 2018. Fate of SDS-insoluble glutenin polymers from semolina to dry pasta. *Food Chemistry*, 240:189–195.
- Jung, S., Woo, C., Fugaban, J., I., I., Bucheli, J., E., V., Holzapfel, W., H., ve Todorov, S., D., 2021. Bacteriocinogenic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from kimchi, a traditional korean fermented cabbage. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09772-w>
- Juturu, V., ve Wu, J., C., 2018. Production of high concentration of l-lactic acid from oil palm empty fruit bunch by thermophilic *Bacillus coagulans* JI12. *Biotechn. App. Biochem.*, 65:145–149.
- Kadam, S., U., ve Prabhasankar, P., 2010. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. *Food Research International*, 43:1975–1980.

- Kahraman, M., Karahan, A. G., ve Terzioğlu, M. E., 2022. Characterization of some microorganisms from human stool samples and determination of their effects on CT26 colorectal carcinoma cell line. *Current Microbiology*, 79:225. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02915-4>
- Kahraman, M., ve Karahan, A. G., 2018. Probiyotiklerin tümör baskılayıcı etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 75(4):421-442. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2018.15428>
- Kalkan, S., 2016. Probiyotik laktik asit bakterilerinin *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyel etkilerinin farklı matematiksel modeller ile analizi. *Sinop Uni J Nat Sci*, 1(2):150–159.
- Kalman, D., S., Schwartz, H., I., Alvarez, P., Feldman, S., Pezzullo, J., C., ve Krieger, D., R., 2009. A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-group dual site trial to evaluate the effects of a *Bacillus coagulans*-based product on functional intestinal gas symptoms. *BMC Gastroenterol*, 9:85.
- Kanwar, N., ve Thakur, V., 2020. Probiotics role in general & oral health: A review. *International Journal of Medical and all body Health Research*, 1(1):32-35.
- Karri, S., K., Majeed, M., Natarajan, S., Sivakumar, A., Ali, F., Pande, A., ve Majeed, S., 2016. Evaluation of anti-diarrhoeal activity of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 and its effect on gastrointestinal motility in Wistar Rats. *Int J Pharm Bio Sci*, 7(1):311-316.
- Katı, H., Karaca, B., ve Gülşen, Ş., H., 2016. Toprakta izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması. *SAÜ Fen Bil Der*, 20(2):281-290.
- Kaur, G., Sharma, S., Nagi, H., P., S., ve Dar, B., N., 2012. Functional properties of pasta enriched with variable cereal brans. *Journal of Food Science and Technology*, 49(4):467–474. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0294-3>.

- Kaur, S., ve Das, M., 2011. Functional foods: an overview. Food Science and Biotechnology, 20(4):861-875.
- Kaur, S., Kaur, R., Rani, N., Sharma, S., ve Joshi, M., 2021. Sources and Selection Criteria of Probiotics. In: Goel, G., Kumar, A. (eds) Advances in Probiotics for Sustainable Food and Medicine. Microorganisms for Sustainability, 21. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6795-7_2
- Keller, M., K., Hassl f, P., Stecks n-Blicks, C., ve Twetman, S., 2011. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: An in vitro study. Acta Odontologica Scandinavica, 69(5):263–268. <https://doi.org/10.3109/00016357.2011.554863>
- Kesenk ş, H., K n k,  ., Se kin, K., G n  Erg n l, P., ve Akan, E., 2016. Ke i s t nden  retilen sinbiyotik beyaz peynirde *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* sayılarının de işimi. Ege  niv. Ziraat Fak. Derg., 53(1):75-81.
- Kim, Y., S., Lee, J., Heo, S., Lee, J., H., ve Jeong, D., W., 2021. Technology and safety evaluation of *Bacillus coagulans* exhibiting antimicrobial activity for starter development. LWT - Food Science and Technology, 137:110464.
- Kimmel, M., Keller, D., Farmer, S., ve Warrino, D., E., 2010. A controlled clinical trial to evaluate the effect of GanedenBC30 on immunological markers. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 32(2):129.
- Klu, Y., A., K., ve Chen, J., 2015. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. LWT - Food Science and Technology, 62(2):983-988. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.018>

- Kobus-Cisowska, J., Szymanowska, D., Maciejewska, P., Szczepaniak, O., Kmiecik, D., Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., ve Cielecka-Piontek, J., 2019. Enriching novel dark chocolate with *Bacillus coagulans* as a way to provide beneficial nutrients. Food & Function, 10:997-1006. <https://doi.org/10.1039/C8FO02099J>.
- Kodali, V., P., ve Sen, R., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. Biotechnology Journal, 3:245-251.
- Kodali, V., P., Das, S., ve Sen, R., 2009. An exopolysaccharide from a probiotic: Biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity. Food Research International 42:695–699.
- Kodali, V., P., Perali, R., S., ve Sen, R., 2011. Purification and partial elucidation of the structure of an antioxidant carbohydrate biopolymer from the probiotic bacterium *Bacillus coagulans* RK-02. Journal of Natural Products, 74:1692-1697.
- Konishi, H., Isozaki, S., Kashima, S., Moriichi, K., Ichikawa, S., Yamamoto, K., Yamamura, C., Ando, K., Ueno, N., Akutsu, H., Ogawa, N., ve Fujiya, M., 2021. Probiotic *Aspergillus oryzae* produces anti-tumor mediator and exerts anti-tumor effects in pancreatic cancer through the p38 MAPK signaling pathway. Scientific Reports, 11(1):1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90707-4>
- Konuray Altun, G., ve Erginkaya, Z., 2021. Identification and characterization of *Bacillus coagulans* strains for probiotic activity and safety. LWT - Food Science and Technology, 151, 112233. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112233>
- Konuray, G., ve Erginkaya, Z., 2017. antimicrobial effect of probiotics, prebiotics and synbiotics. Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs (A. Méndez-Vilas, Ed.), 213-218, Formatex, Badajoz, Spain.

- Konuray, G., ve Erginkaya, Z., 2020. Quality evaluation of probiotic pasta produced with *Bacillus coagulans* GBI-30. Innovative Food Science and Emerging Technologies 66, 102489. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102489>
- Landry, B., K., U., François, Z., N., Wang, R., Y., Taicheng, Z., ve Li, Y., 2018. Viability and stress response of putative probiotic *Lactobacillus plantarum* strains in honey environment. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10:629–637. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9358-7>
- Lee, N., K., Kim, S., Y., Chang, H., I., Park, E., ve Paik, H., D., 2013. Immunomodulatory and antigenotoxic properties of *Bacillus amyloliquefaciens* KU801. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 41(2):249–252. <http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1301.01008>
- Li, X., Lin, S., X., Q., Chen, X., D., Chen, L., ve Pearce, D., 2006. Inactivation kinetics of probiotic bacteria during the drying of single milk droplets. Drying Technology, 24:695–701.
- Lin, H., Ding, B., Chen, L., Zhang, Z., He, H., Wang, J., Wang, X., Zhang, L., Ni, X., ve Fronte, B., 2020. The effect of *Aspergillus niger* as a dietary supplement on blood parameters, intestinal morphology, and gut microflora in Haidong chicks reared in a high altitude environment, Veterinary World, 13(10):2209-2215.
- Liu, S., Wang, S., Cai, Y., Li, E., Ren, Z., Wu, Y., Guo, W., Sun, Y., ve Zhou, Y., 2020. Beneficial effects of a host gut-derived probiotic, *Bacillus pumilus*, on the growth, non-specific immune response and disease resistance of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. Aquaculture, 514:734446. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734446>
- Lorusso, A., Verni, M., Montemurro, M., Coda, R., Gobbetti, M., ve Rizzello, C., G., 2017. Use of fermented quinoa flour for pasta making and evaluation of the technological and nutritional features. LWT - Food Science and Technology, 78:215-221.

- Lv, X., Yu, B., Tian, X., Chen, Y., Wang, Z., Zhuang, Y., ve Wang, Y., 2016. Effect of pH, glucoamylase, pullulanase and invertase addition on the degradation of residual sugar in L-lactic acid fermentation by *Bacillus coagulans* HL-5 with corn flour hydrolysate. J. Taiwan Inst. Chem. Eng, 61:124–131.
- Lv, R., Zou, M., Chantapakul, T., Chen, W., Muhammad, A. I., Zhou, J., Ding, T., Ye, X., ve Liu, D., 2019. Effect of ultrasonication and thermal and pressure treatments, individually and combined, on inactivation of *Bacillus cereus* spores. Applied Microbiology and Biotechnology, 103:2329-2339. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9559-3>
- Ma, K., Hu, G., Pan, L., Wang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Ruan, Z., ve He, M., 2016. Highly efficient production of optically pure l-lactic acid from corn stover hydrolysate by thermophilic *Bacillus coagulans*. Bioresource Technology, 219:114-122.
- Maas, R., H., W., Bakker, R. R., Jansen, M., L., A., Visser, D., de Jong, E., Eggink, G., ve Weusthuis, R. A., 2008. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: Neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate. Appl. Microbiol. Biotechnol, 78:751-758.
- Maathuis, A., J., H., Keller, D., ve Farmer, S., 2010. Survival and metabolic activity of the GanedenBC30 strain of *Bacillus coagulans* in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine. Beneficial Microbes, 1(1):31-36.
- Mainville, I., Arcand, Y., ve Farnworth, E., R., 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. International Journal of Food Microbiology, 99:287-296.

- Maity, C., ve Gupta, A., K., 2019. A prospective, interventional, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study to evaluate the efficacy and safety of *Bacillus coagulans* LBSC in the treatment of acute diarrhea with abdominal discomfort. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 75:21-31. <https://doi.org/10.1007/s00228-018-2562-x>
- Majeed, M., Majeed, S., Arumugam, S., Ali, F., ve Beede, K., 2020. Comparative evaluation for thermostability and gastrointestinal survival of probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 85(4):962–971. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbaa116>
- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K., ve Ali, F., 2019. Evaluation of probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 viability after tea and coffee brewing and its growth in GIT hostile environment. *Food Research International*, 121:497-505.
- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Natarajan, S., Sivakumar, A., ve Ali, F., 2016a. Evaluation of the stability of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 during processing and storage of functional foods. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(4):894-901. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13044>
- Majeed, M., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Majeed, S., ve Ali, F., 2018. *Bacillus coagulans* MTCC 5856 for the management of major depression with irritable bowel syndrome: a randomised, doubleblind, placebo controlled, multi-centre, pilot clinical study. *Food & Nutrition Research*, 62:1218. <http://dx.doi.org/10.29219/fnr.v62.1218>
- Majeed, M., Nagabhushanam, K., Natarajan, S., Sivakumar, A., Eshuis-de Ruiter, T., Booi-Veurink, J., de Vries, Y., P., ve Ali, F., 2016b. Evaluation of genetic and phenotypic consistency of *Bacillus coagulans* MTCC 5856: a commercial probiotic strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(4):60. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2027-2>

- Manthey, F., A., Sinha, S., Wolf-Hall, C., E., ve Hall, C., A., 2008. Effect of flaxseed flour and packaging on shelf life of refrigerated pasta. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(1):75–87. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2007.00166.x>.
- Marti, A., ve Pagani, M., A., 2013. What can play the role of gluten in gluten free pasta? *Trends in Food Science & Technology*, 31:63-71.
- Marti, A., Seetharaman, K., ve Pagani, M., A., 2010. Rice-based pasta: A comparison between conventional pasta-making and extrusion-cooking. *Journal of Cereal Science*, 52(3):404–409. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.07.002>.
- Martinez, C., S., Ribotta, P., D., Leon, A., E., ve Anon, M., C., 2007. Physical, sensory and chemical evaluation of cooked spaghetti. *Journal of Texture Studies* 38:666–683.
- Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, A. S.L., Stringheta, P. C., Pinto, C. L. D. O., ve Martins, J. M., 2013. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51:764-770. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.047>
- Marzorati, M., Abbeele, P., V., D., Bubeck, S., S., Bayne, T., Krishnan, K., Young, A., Mehta, D., ve DeSouza, A., 2020. *Bacillus subtilis* HU58 and *Bacillus coagulans* SC208 probiotics reduced the effects of antibiotic-induced gut microbiome dysbiosis in an M-SHIME® model. *Microorganisms*, 8:1028. doi:10.3390/microorganisms8071028
- Matei, P., M., Martín-Ramos, P., Sánchez-Báscones, M., García-González, M., C., Martín-Villullas, M., T., Hernández-Navarro, S., Navas-Gracia, L., M., ve Martín-Gil, J., 2017. Thermal death kinetics in dry air of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots. *European Journal of Plant Pathology*, 148:1–12. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1063-y>

- Matsuzaki, C., Nakashima, Y., Endo, I., Tomabeche, Y., Higashimura, Y., Itonori, S., Hosomi, K., Kunisawa, J., Yamamoto, K., ve Hisa, K., 2021. Enzymatically synthesized exopolysaccharide of a probiotic strain *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 shows adjuvant activity to promote IgA antibody responses. *Gut Microbes*, 13(1):e1949097. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1949097>
- McFarlin, B., K., Henning, A., L., Bowman, E., M., Gary, M., A., ve Carbajal, K., M., 2017. Oral spore-based probiotic supplementation was associated with reduced incidence of post-prandial dietary endotoxin, triglycerides, and disease risk biomarkers. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 8(3):117-126. doi:10.4291/wjgp.v8.i3.117
- McKenney, P., T., Driks, A., ve Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1):33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Meidong, R., Buatong, A., Nakao, M., Sakai, K., ve Tongpim, S., 2021. Mixed culture of *Bacillus aerius* B81e and *Lactiplantibacillus paraplantarum* L34b-2 derived from in vivo screening using hybrid catfish exhibits high probiotic effects on *Pangasius bocourti*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132(4):423-428. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.06.006>
- Metlakunta, A., S., ve Soman, R., J., 2020. Safety evaluation of *Bacillus coagulans* SNZ 1969 in Wistar rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 104538. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104538>
- Michelotti, F., ve Bodansky, H., J., 2015. *Bacillus cereus* causing widespread necrotising skin infection in a diabetic person. *Practical Diabetes*, 32(5):169-170a.

- Mikulski, D., Jankowski, J., Mikulska, M., ve Demey, V., 2020. Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on productive performance, egg quality, and body composition in laying hens fed diets varying in energy density. *Poultry Science*, 99(4):2275–2285. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.046>
- Miranda, J., S., Costa, B., V., de Oliveira, I., V., de Lima, D., C., N., Martins, E., M., F., Junior, B., R., D., C., L., Benevenuto, W., C., A., D., N., Queiroz, I., C., D., da Silva, R., R., ve Martins, M., L., 2020. Probiotic jelly candies enriched with native Atlantic Forest fruits and *Bacillus coagulans* GBI-30 6086. *LWT - Food Science and Technology* 126:109275.
- Mirković, M., Mirković, N., Miočinović, J., Radulović, A., Paunović, D., Ilić, M., ve Radulović, Z., 2021. Probiotic yogurt and cheese from ultrafiltered milk: Sensory quality and viability of free-living and spray dried *Lactiplantibacillus plantarum* 564 and *Lactiplantibacillus plantarum* 299v. *Journal of Food Processing and Preservation*, 00:e15713. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15713>
- Mishra, V., ve Prasad, D., N., 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103:109-115.
- Mohanty, D., Panda, S., Kumar, S., ve Ray, P., 2019. In vitro evaluation of adherence and anti-infective property of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM 69 against *Salmonella enterica*. *Microbial Pathogenesis*, 126:212–217.
- Mohkam, M., Nezafat, N., Berenjian, A., Zamani, M., Dabbagh, F., Bigharaz, R., ve Ghasemi, Y., 2020. Multifaceted toxin profile of *Bacillus* probiotic in newly isolated *Bacillus* spp. from soil rhizosphere. *Biologia*, 75(2):309-315. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00357-1>

- Mohkam, M., Rasoul-Amini, S., Shokri, D., Berenjian, A., Rahimi, F., Sadraei, M., Khalvati, B., Gholami, A., ve Ghasemi, Y., 2016. Characterization and in vitro probiotic assessment of potential indigenous *Bacillus* strains isolated from soil rhizosphere. *Minerva Biotechnologica*, 28(1):19-28.
- Mohtashami, M., Mohamadi, M., Azimi-Nezhad, M., Saeidi, J., Nia, F., F., ve Ghasemi, A., 2020. *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus plantarum* improve diabetic wound healing through modulating inflammatory factors. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 0(0):1-11. <https://doi.org/10.1002/bab.2064>
- Moir, A., 2006. How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology*, 101:526-530.
- Montville, T. J., ve Sapers, G. M., 1981. Thermal resistance of spores from pH elevating strains of *Bacillus licheniformis*. *Journal of Food Science*, 46:1710-1715.
- Monzón-Atienza, L., Bravo, J., Torrecillas, S., Montero, D., Gonzales-de Canales, A. F., Banda, I., G., D., L., Galindo-Villegas, J., Ramos-Vivas, J., ve Acosta, F., 2021. Isolation and characterization of a *Bacillus velezensis* D-18 strain, as a potential probiotic in european seabass aquaculture. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09782-8>
- Moore, E., Arnscheidt, A., Krüger, A., Strömpl, C., ve Mau, M., 2004. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 1905–1919. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2177-0_101
- Morgan, B., H., ve Reed, J., M., 1954. Resistance of bacterial spores to gamma irradiation. *Food Research*, 19(4):357-366.

- Moschopoulos, C., Kratimenos, P., Koutroulis, I., Shah, B., V., Mowes, A., ve Bhandari, V., 2018. The neurodevelopmental perspective of surgical necrotizing enterocolitis: the role of the gut-brain axis. *Mediators of Inflammation*, 7456857:1–8.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., ve Maneerat, S., 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8):1337-1345.
- Neu, A.K., Pleissner, D., Mehlmann, K., Schneider, R., Puerta-Quintero, G.I., ve Venus, J., 2016. Fermentative utilization of coffee mucilage using *Bacillus coagulans* and investigation of down-stream processing of fermentation broth for optically pure L-(+)-lactic acid production. *Bioresour. Technol*, 211:398–405.
- Nicholson, W., L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H., J., ve Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3):548-572.
- Nilusha, R. A. T., Jayasinghe, J. M. J. K., Perera, O. D. A. N., ve Perera, P. I. P. P., 2019. Development of pasta products with nonconventional ingredients and their effect on selected quality characteristics: a brief overview. *Hindawi International Journal of Food Science*, 6750726. <https://doi.org/10.1155/2019/6750726>
- Nithya, V., ve Halami, P., M., 2013. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Ann Microbiol*, 63:129–137
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sánchez, B., Margolles, A., ve De Los Reyes-Gavilán, C., G., 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low PH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1):79–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.003>

- Nyangale, E., P., Farmer, S., Cash, H., A., Keller, D., Chernoff, D., ve Gibson, G., R., 2014. *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 modulates *Faecalibacterium prausnitzii* in older men and women. The Journal of Nutrition Nutrition and Disease, 145(7):1446-1452.
- Ogbuewu, I., P., Okoro, V., M., ve Mbajiorgu, C., A., 2020. Probiotic-yeast improves performance indicators in broiler chickens: Evidence from meta-analysis. Applied Ecology and Environmental Research, 18(2):2823–2843. https://doi.org/10.15666/aeer/1802_28232843
- Okada, Y., Tsuzuki, Y., Sugihara, N., Nishii, S., Shibuya, N., Mizoguchi, A., Itoh, S., Tanemoto, R., Inaba, K., Hanawa, Y., Horiuchi, K., Wada, A., Higashiyama, M., Watanabe, C., Kurihara, C., Komoto, S., Tomita, K., Miura, S., ve Hokari, R., 2021. Novel probiotic yeast from Miso promotes regulatory dendritic cell IL-10 production and attenuates DSS-induced colitis in mice. Journal of Gastroenterology, 56:829-842. <https://doi.org/10.1007/s00535-021-01804-0>
- Oliveira, M., E., G., D., Garcia, E., F., Queiroga, R., D., C., R., D., E, ve Souza, E., L., D., 2012. Techno-logical, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. Scientia Agricola, 69(6):370-379.
- Oomes, S. J. C. M., van Zujilen, A. C. M., Hehenkamp, J. O., Witsenboer, H., van der Vossen, J. M. B. M., ve Brul, S., 2007. The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. International Journal of Food Microbiology, 120:85-94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.013>
- Ou, M., S., Awasthi, D., Nieves, I., Wang, L., Erickson, J., Vermerris, W., Ingram, L., O., ve Shanmugam, K., T., 2016. Sweet sorghum juice and bagasse as feedstocks for the production of optically pure lactic acid by native and engineered *Bacillus coagulans* strains. Bioenergy. Res, 9:123–131.

- Özcan, B., D., 2005. Sıcaklığa dirençli amilaz genlerinin klonlanması üzerine çalışmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı Doktora Tezi.
- Özgören, E., ve Yapar, A., 2015. Makarnanın zenginleştirilmesine yönelik yaklaşımlar. Journal of Food and Health Science 1(2):103-108.
- Özyurt, G., Uslu, L., Yuvka, I., Gökdoğan, S., Atıcı, G., Ak, B., ve Işık, O., 2015. Evaluation of the cooking quality characteristics of pasta enriched with *Spirulina platensis*. Journal of Food Quality, 38(4):268-272.
- Palavecino, P., M., Bustos, M., C., Heinzmann Alabí, M., B., Nicolazzi, M., S., Penci, M., C., ve Ribotta, P., D., 2017. Effect of ingredients on the quality of gluten-free sorghum pasta. Journal of Food Science, 82(9):2085–2093. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13821>
- Palop, A., Marco, A., Raso, J., Sala, F. J., ve Condon, S., 1997. Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. International Journal of Food Microbiology, 38:25-30.
- Palop, A., Raso, J., Pagan, R., Condon, S., ve Sala, F., J., 1999. Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. International Journal of Food Microbiology, 46:243–249.
- Paparo, L., Tripodi, L., Bruno, C., Pisapia, L., Damiano, C., Pastore, L., ve Berni Canani, R., 2020. Protective action of *Bacillus clausii* probiotic strains in an in vitro model of Rotavirus infection. Scientific Reports, 10(1):1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69533-7>
- Partrick, K., A., Rosenhauer, A., M., Auger, J., Arnold, A., R., Ronczkowski, N., M., Jackson, L., M., Lor, M. N., Abdulla, S. M., Chassaing, B., ve Huhman, K., L., 2021. Ingestion of probiotic (*Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum*) alters intestinal microbial structure and behavioral expression following social defeat stress. Scientific Reports, 11(1):1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83284-z>

- Patel, A., K., Ahire, J., J., Pawar, S., P., Chaudhari, B. L., ve Chincholkar, S., B., 2009. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. *Food Research International*, 42(4):505–510. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.013>
- Payot, T., Chemaly, Z., ve Fick, M., 1999. Lactic acid production by *Bacillus coagulans*-Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme Microbial Technol*, 24:191–199.
- Paytuví-Gallart, A., Sanseverino, W., ve Winger, A., M., 2020. Daily intake of probiotic strain *Bacillus subtilis* DE111 supports a healthy microbiome in children attending day-care. *Beneficial Microbes*, 11(7):611–620. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0022>
- Perez, P., F., Minnaard, Y., Disalvo, E., A., ve De Antoni, G., L., 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied Environmental Microbiology*, 64(1):21-26.
- Petitot, M., Abecassis, J., ve Micard, V., 2009a. Structuring of pasta components during processing: impact on starch and protein digestibility and allergenicity. *Trends in Food Science & Technology*, 20:521-532.
- Petitot, M., Boyer, L., Minier, C., ve Micard, V., 2010. Fortification of pasta with split pea and faba bean flours: Pasta processing and quality evaluation. *Food Research International*, 43(2):634–641. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.020>.
- Petitot, M., Brossard, C., Barron, C., Larré, C., Morel, M., H., ve Micard, V., 2009b. Modification of pasta structure induced by high drying temperatures. Effects on the in vitro digestibility of protein and starch fractions and the potential allergenicity of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 116(2):401-412.

- Pimentel, T., C., Da Costa, W., K., A., Barao, C., E., Rosset, M., ve Magnani, M., 2021. Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. *Food Research International*, 140:110033. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110033>
- Pimentel, T. C., de Oliveira, L. I. G., de Souza, R. C., ve Magnani, M., 2022. Probiotic ice cream: A literature overview of the technological and sensory aspects and health properties. *International Journal of Dairy Technology*, 75(1): 59-76. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12821>
- Prado, F., C., Parada, J., L., Pandey, A., ve Soccol, C., R., 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41(2):111-123. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010>
- R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R foundation for statistical computing. <http://www.R-project.org/>
- Rada, V., Splichal, I., Rockova, S., Grmanova, M., ve Vlkova, E., 2010. Susceptibility of bifidobacteria to lysozyme as a possible selection criterion for probiotic bifidobacterial strains. *Biotechnology Letters*, 32(3):451–455. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0170-7>
- Rani, R., P., Anandharaj, M., Sabhapathy, P., ve Ravindran, A., D., 2017. Physiochemical and biological characterization of novel exopolysaccharide produced by *Bacillus tequilensis* FR9 isolated from chicken. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.122>
- Recchia, L., Cappelli, A., Cini, E., Pegna, F., G., ve Boncinelli, P., 2019. Environmental sustainability of pasta production chains: An integrated approach for comparing local and global chains. *Resources*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/resources8010056>

- Riazi, S., Wirawan, R., E., Badmaev, V., ve Chikindas, M., L., 2009. Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050. *Journal of Applied Microbiology*, 106:1370–1377.
- Ricca, E., ve Cutting, S., M., 2003. Emerging applications of bacterial spores in nanobiotechnology. *Journal of Nanobiotechnology*, 1:6.
- Ringel, Y., Quigley, E. M., ve Lin, H. C., 2012. Using probiotics in gastrointestinal disorders. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*, 1(1):34.
- Ritter, A., C., Correa, A., P., F., Veras, F., F., ve Brandelli, A., 2018. Characterization of *Bacillus subtilis* available as probiotics. *Journal of Microbiology Research*, 8(2):23-32
- Rohith, H., S., ve Halami, P., M., 2021. In vitro validation studies for adhesion factor and adhesion efficiency of probiotic *Bacillus licheniformis* MCC 2514 and *Bifidobacterium breve* NCIM 5671 on HT-29 cell lines. *Archives of Microbiology*, 203(6):2989–2998. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02257-y>
- Ruiz, L., Margolles, A., ve Sánchez, B., 2013. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 4:1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00396>
- Russo, M., D., Spagnuolo, C., Moccia, S., Angelino, D., Pellegrini, N., ve Martini, D., 2021. Nutritional quality of pasta sold on the Italian market: The food labelling of Italian products (FLIP) study. *Nutrients*, 13:171. <https://doi.org/10.3390/nu13010171>
- Saget, S., Costa, M., Barilli, E., Wilton de Vasconcelos, M., Santos, C., S., Styles, D., ve Williams, M., 2020. Substituting wheat with chickpea flour in pasta production delivers more nutrition at a lower environmental cost. *Sustainable Production and Consumption*, 24:26–38. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2020.06.012>

- Saglam, H., Sarioglu, T., Karahan, A. G., ve Oner, Z., 2017. An investigation for the development of whey-based probiotic beverages. *Rom Biotechnol Lett*, 24(6):1097-1106. <https://doi.org/10.25083/rbl/24.6/1097.1106>
- Salas-Jara, M., Ilabaca, A., Vega, M., ve García, A., 2016. Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, 4(3):35. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030035>
- Salveti, E., Orru, L., Capozzi, V., Martina, A., Lamontanara, A., Keller, D., Cash, H., Felis, G. E., Cattivelli, L., Torriani, S., ve Spano, G., 2016. Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains: *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 as a case study. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100:4595–4605
- Sarles, W., B., ve Hammer, B., W., 1932. Observations on *Bacillus coagulans*. *Journal of bacteriology*, 23(4):301-314.
- Saroj, D., B., ve Gupta, A., K., 2020. Genome based safety assessment for *Bacillus coagulans* strain LBSC (DSM 17654) for probiotic application. *International Journal of Food Microbiology*, 318:108523. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108523>
- Sasaki, K., Sasaki, D., Inoue, J., Hoshi, N., Maeda, T., Yamada, R., ve Kondo, A., 2020. *Bacillus coagulans* SANK 70258 suppresses *Enterobacteriaceae* in the microbiota of ulcerative colitis in vitro and enhances butyrogenesis in healthy microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 7:1-9. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10506-1>
- Schrezenmeir, J., ve de Vrese, M., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2):361-364.
- Sekhvatizadeh, S., S., Aminlari, M., Gheisari, H., R., Shekarforoush, S., S., ve Golmakani, M., T., 2019. Physicochemical and microbiological properties of probiotic kashk containing *Bacillus coagulans*. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 14(4):377-387.

- Senaka Ranadheera, C., Evans, C., A., Adams, M., C., ve Baines, S., K., 2012. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Research International*, 49(2):619–625. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.007>
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101:514-525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
- Setlow, P., 2011. Resistance of bacterial spores. *Bacterial Stress Responses*, 2nd ed. Edited by Gisela Storz and Regine Hengge, ASM Press, Washington, DC.
- Sharifi, M., Far, H., A., Pahlevanlo, A., ve Hosseinienezhad, M., 2021. The first report of bacteriocin production by the *Bacillus coagulans* IS2 and its antibacterial effects. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 52(2):195-202.
- Sharma, R., Dar, B. N., Sharma, S., ve Singh, B., 2021. In vitro digestibility, cooking quality, bio-functional composition, and sensory properties of pasta incorporated with potato and pigeonpea flour. *International Journal of Gastronomy and Food Science* 23:100300. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100300>
- Sheng, K., He, S., Sun, M., Zhang, G., Kong, X., Wang, J., ve Wang, Y., 2020. Synbiotic supplementation containing: *Bifidobacterium infantis* and xylooligosaccharides alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. *Food and Function*, 11(5):3964–3974. <https://doi.org/10.1039/d0fo00518e>
- Shinde, T., Perera, A., P., Vemuri, R., Gondalia, S., V., Beale, D., J., Karpe, A., V., Shastri, S., Basheer, W., Southam, B., Eri, R., ve Stanley, R., 2020. Synbiotic supplementation with prebiotic green banana resistant starch and probiotic *Bacillus coagulans* spores ameliorates gut inflammation in mouse model of inflammatory bowel diseases. *European Journal of Nutrition*, 17:1-21.

- Shinde, T., Perera, A., P., Vemuri, R., Gondalia, S., V., Karpe, A., V., Beale, D., J., Shastri, S., Southam, B., Eri, R., ve Stanley, R., 2019b. Synbiotic supplementation containing whole plant sugar cane fibre and probiotic spores potentiates protective synergistic effects in mouse model of IBD. *Nutrients*, 11:818; doi:10.3390/nu11040818
- Shinde, T., Vemuri, R., Shastri, M., D., Perera, A., P., Tristram, S., Stanley, R., ve Eri, R., 2019a. Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. *Journal of Functional Foods*, 52:100-108.
- Shivangi, A., Devi, P., B., Ragul, K., ve Shetty, P., H., 2020. Probiotic potential of *Bacillus* strains isolated from an acidic fermented food idli. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12:1502–1513.
- Sicignano, A., Di Monaco, R., Masi, P., ve Cavella, S. 2015. From raw material to dish: pasta quality step by step. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(13):2579-2587. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7176>
- Sidira, M., Karapetsas., A., Galanis, A., Kanellaki, M., ve Kourkoutas, Y., 2014. Effective survival of immobilized *Lactobacillus casei* during ripening and heat treatment of probiotic dry-fermented sausages and investigation of the microbial dynamics. *Meat Science*, 96:948–955.
- Simmonds, P., Mossel, B., L., Intaraphan, T., ve Deeth, H., C., 2003. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *Journal of Food Protection*, 66(11):2070–2075.
- Slizewska, K., Markowiak-Kopeć, P., ve Śliżewska, W., 2021. The role of probiotics in cancer prevention. *Cancers*, 13(1):1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers13010020>

- Soares, M., B., Martinez, R., C., R., Pereira, E., P., R., Balthazar, C., F., Cruz, A., G., Ranadheera, C., S., ve Sant'Ana, A., S., 2019. The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food Research International*, 125:108542.
- Sobota, A., ve Zarzycki, P., 2013. Effect of pasta cooking time on the content and fractional composition of dietary fiber. *Journal of Food Quality*, 36:127-132
- Sorokulova, I., B., Pinchuk, I., V., Denayrolles, M., Osipova, I., G., Huang, J., M., Cutting, S., M., ve Urdaci, M., C., 2008. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Dig. Dis. Sci*, 53:954-963.
- Spinosa, M., R., Braccini, T., Ricca, E., De Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., ve Oggioni, M., R., 2000. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res. Microbiol*, 151:361-368.
- Steenbergen, L., Sellaro, R., van Hemert, S., Bosch, J., A., ve Colzato, L., S., 2015. A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48:258-264. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.003>
- Sudha, M., R., Chauhan, P., Dixit, K., Babu, S., ve Jamil, K., 2010. Molecular typing and probiotic attributes of a new strain of *Bacillus coagulans* – Unique IS-2: a potential biotherapeutic agent. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, GEBJ-7.
- Sui, L., Zhu, X., Wu, D., Ma, T., Tuo, Y., Jiang, S., ve Qian, F., 2020. In vitro assessment of probiotic and functional properties of *Bacillus coagulans* T242. *Food Bioscience* 36:100675.

- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., ve Kailasapathy, K., 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62:47–55. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00380-9)
- Sun, X., Hill, P., Liu, J., Qian, J., Ma, Y., ve Zhou, S., 2021. Marine-source quorum quenching enzyme ytnp to improve hygiene quality in dental units. *Marine Drugs*, 19(4):1–12. <https://doi.org/10.3390/MD19040225>
- Sung, W., C., ve Stone, M., 2005. Microstructural studies of pasta and starch pasta. *Journal of Marine Science and Technology*, 13(2):83-88.
- Svec, I., Hrušková, M., Vítová, M., ve Sekerová, H., 2008. Colour evaluation of different pasta samples. *Czech J. Food Sci.*, 26(6):421-427.
- Talebi, S., Makhdoumi, A., Bahreini, M., Matin, M., M., ve Moradi, H., S., 2018. Three novel *Bacillus* strains from a traditional lacto-fermented pickle as potential probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 125:888-896.
- Tao, Y., Huang, F., Zhang, Z., Tao, X., Wu, Q., Qiu, L., ve Wei, H., 2020. Probiotic *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 ameliorates pathobiont-induced miscarriage through bacterial antagonism and Th1-Th2 modulation in pregnant mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(12):5493–5504. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10609-9>
- Taranto, M., P., Perez-Martinez, G., de Valdez, G. F., 2006. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology*, 157:720–725. doi: 10.1016/j.resmic.2006.04.002
- Theegala, M., Arévalo, R., A., C., Viana, V., Olson, D., ve Aryana, K., 2021. Effect of flaxseed on bile tolerances of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, and *Streptococcus thermophilus*. *Food and Nutrition Sciences*, 12:670-680. <https://doi.org/10.4236/fns.2021.127050>

- Thomas, P., 2004. Isolation of *Bacillus pumilus* from in vitro grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. Journal of Applied Microbiology, 97:114-123.
- Thomas, P., 2012. Long-term survival of *Bacillus* spores in alcohol and identification of 90% ethanol as relatively more spori/bactericidal. Current Microbiology, 64:130-139.
- Thomas, P., Sekhar, A., C., ve Mujawar, M., M., 2014. Vulnerability of *Bacillus* spores and of related genera to physical impaction injury with particular reference to spread-plating. Journal of Applied Microbiology, 117:1358-1372.
- Todorov, S., D., LeBlanc, J., G., ve Franco, B., D., G., M., 2012. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(3):973–984.
- Toprak Kavas, S., 2007. Probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistem uyumluluğu ve enterik patojenlere etkisi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Alan Tezi.
- Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A. G., Postollec, F., Leguerinel, I., Couvert, O., Carlin, F., ve Coroller, L., 2018. Effect of incubation temperature and pH on the recovery of *Bacillus weihenstephanensis* spores after exposure to a peracetic acid-based disinfectant or to pulsed light. International Journal of Food Microbiology, 278:81–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.014>
- Tseng, C., C., Lin, Y., J., Liu, W., Lin, H., Y., Chou, H., Y., Thia, C., Wu, J., H., Chang, J., S., Wen, Z., H., Chang, J., J., ve Wang, H., M., D., 2020. Metabolic engineering probiotic yeast produces 3S, 3'S-astaxanthin to inhibit B16F10 metastasis. Food and Chemical Toxicology, 135:110993. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110993>

- Tudorica, C., M., Kuri, V., ve Brennan, C., S., 2002. Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50:347-356.
- Tuohy, K., M., Pinart-Gilberga, M., Jones, M., Hoyles, L., McCartney, A., L., ve Gibson, G., R., 2007. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 102:1026-1032.
- Türk Gıda Kodeksi, 2005. Makarna Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ 2005/29. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/06/20050629-16.htm>
- Urgesi, R., Casale, C., Pistelli, R., Rapaccini, G., L., ve De Vitis, I., 2014. A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial on efficacy and safety of association of simethicone and *Bacillus coagulans* (Colinox®) in patients with irritable bowel syndrome. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18:1344-1353.
- Uzundumlu, S., A., Yıldırım, B., Z., ve Kurtoğlu, S., 2018. Erzurum ilinde ekmek tüketimini etkileyen faktörlerin belirlenmesi. *The Journal of Academic Social Sciences*, 6(77):17–31. <https://doi.org/10.16992/asos.14023>
- Ünal Turhan, E., 2019. Optimization of entrapment substances for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* Shirota against gastric conditions. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 25(4):531-537, 2019. DOI: 10.9775/kvfd.2018.21274
- Ünal Turhan, E., 2021. Mikroenkapsüle ve serbest probiyotik kültür ilavesiyle fonksiyonel keçiyoynuzu pekmezi üretimi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 11(1):307-317. DOI: 10.31466/kfbd.910655
- Ünal Turhan, E., Erginkaya, Z., Bozdoğan, A., Aslan, Z., 2017b. Farklı kaplama materyalleri ile kaplanmış *Lactobacillus rhamnosus*'un termal inaktivasyon kinetiği. *Gıda ve Yem Bilimi – Teknolojisi Dergisi*, 17(12):12-20.

- Ünal Turhan, E., Erginkaya, Z., Polat, S., ve Özer, E. A., 2017a. Design of probiotic dry fermented sausage (sucuk) production with microencapsulated and free cells of *Lactobacillus rhamnosus*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 41, 5(3):598-603. <https://doi.org/10.3906/vet-1701-76>
- Ünal Turhan, E., Erginkaya, Z., Uney, M. H., ve Özer, E. A., 2017c. Inactivation effect of probiotic biofilms on growth of *Listeria monocytogenes*. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 23 (4): 541-546. doi: 10.9775/kvfd.2016.17253
- Ünal Turhan, E., ve Erginkaya, Z., 2019. Bakteriyel biyofilmlerdeki antimikrobiyel direnç mekanizması. Akademik Gıda, 17(1):131-139. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.544978>
- Van der Pol, E., C., Eggink, G., ve Weusthuis, R., A., 2016. Production of L-(+)-lactic acid from acid pretreated sugarcane bagasse using *Bacillus coagulans* DSM2314 in a simultaneous saccharification and fermentation strategy. Biotechnology for Biofuels, 9:248.
- Vecchi, E., ve Drago, L., 2006. *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: Misidentification or mislabelling. International Journal of Probiotics and Prebiotics, 1(1):3-10.
- Vera-Pingitore, E., Jimenez, M., E., Dallagnol, A., Belfiore, C., Fontana, C., Fontana, P., von Wright, A., Vignolo, G., ve Plumed-Ferrer, C., 2016. Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. LWT - Food Science and Technology, 71:288-294.
- Vesty, A., Gear, K., Boutell, S., Taylor, M., W., Douglas, R., G., ve Biswas, K., 2020. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of oral probiotic *Streptococcus salivarius* M18 on head and neck cancer patients post-radiotherapy: a pilot study. Scientific Reports, 10(1):1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70024-y>

- Vimercati, W. C., Macedo, L. L., Araujo, C. D. S., Filho, A. M. M., Saraiva, S. H., ve Teixeira, L. J. Q., 2020. Effect of storage time and packaging on cooking quality and physicochemical properties of pasta with added nontraditional ingredients. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(9), e14637. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14637>
- Vinderola, C., G., Medici, M., ve Perdigon, G., 2004. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 96(2):230-243.
- Vlková, E., Rada, V., Šmehilová, M., ve Killer, J., 2008. Auto-aggregation and Co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiologica*, 53(3):263-269. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0040-z>
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., R., Ludwig, W., Rainey, F., A., Scheifer, K., H., ve Whitman, W., B., (Eds.), 2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3)*. Springer Science & Business Media.
- Wang, Y., Chen, C., Cai, D., Wang, Z., Qin, P., ve Tan, T., 2016. The optimization of L-lactic acid production from sweet sorghum juice by mixed fermentation of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* under unsterile conditions. *Bioresource Technology*, 218:1098–1105.
- Wang, L. H. Pyatkovskyy, T., Yousef, A., Zeng, X. A., ve Sastry, S. K., 2020. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation induced by moderate electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 62:102349. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102349>
- WHO/FAO, 2002. Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand. Rome: FAO and WHO.

- Xin, J., Zeng, D., Wang, H., Sun, N., Zhao, Y., Dan, Y., Pan, K., Jing, B., ve Ni, X., 2020. Probiotic *Lactobacillus johnsonii* BS15 promotes growth performance, intestinal immunity, and gut microbiota in piglets. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(1):184–193. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9511-y>
- Xing, S., C., Mi, J., D., Chen, J., Y., Hu, J., X., ve Liao, X., D., 2020. Metabolic activity of *Bacillus coagulans* R11 and the health benefits of and potential pathogen inhibition by this species in the intestines of laying hens under lead exposure. *Science of the Total Environment*, 709:134507. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134507>
- Xu, Y., Hlaing, M., M., Glagovskaia, O., Augustin, M., A., ve Terefe, N., S., 2020. Fermentation by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains enhances the carotenoid and fibre contents of carrot juice. *Foods*, 9(12):1803. <https://doi.org/10.3390/foods9121803>
- Yalçinkaya, S., Yalçın Azarkan, S., ve Karahan Çakmakçı, A. G., 2022. Determination of the effect of *L. plantarum* AB6-25, *L. plantarum* MK55 and *S. boulardii* T8-3C microorganisms on colon, cervix, and breast cancer cell lines: Molecular docking, and molecular dynamics study. *Journal of Molecular Structure*, 1261:132939. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132939>
- Yang, G., Shen, K., Yu, R., Wu, Q., Yan, Q., Chen, W., Ding, L., Kumar, V., Wen, C., ve Peng, M., 2020. Probiotic (*Bacillus cereus*) enhanced growth of Pengze crucian carp concurrent with modulating the antioxidant defense response and exerting beneficial impacts on inflammatory response via Nrf2 activation. *Aquaculture*, 529:735691. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735691>
- Yapıcıoğlu Yıldızdaş, H., 2016. Probiyotikler ve çocuklarda bağışıklık sistemi. *Klinik Tıp Pediatri Dergisi*, 8(3):5-10.

- Yilmaz, M., Soran, H., ve Beyatli, Y., 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological Research*, 161:127-131.
- Zhang, B., Zhang, L., Cheng, T., Guan, X., ve Wang, S., 2020. Effects of water activity, temperature and particle size on thermal inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 in red pepper powder. *Food Control*, 107:106817.
- Zhang, Y., Chen, X., Luo, J., Qi, B., ve Wan, Y., 2014. An efficient process for lactic acid production from wheat straw by a newly isolated *Bacillus coagulans* strain IPE22. *Bioresource Technology*, 158:396–399.
- Zweifel, C., Handschin, S., Escher, F., ve Conde-Petit, B., 2003. Influence of high-temperature drying on structural and textural properties of durum wheat pasta. *Cereal Chemistry*, 80(2):159-167.

ÖZGEÇMİŞ

Gözde KONURAY ALTUN, İlk ve orta öğrenimini Adana'da tamamladı. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünü kazanarak lisans eğitime başladı ve 2011 yılında Erasmus Öğrenci Değişim Programı ile bir eğitim dönemi süresince İtalya'da Catania Üniversitesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümünde eğitim aldı. 2012 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Yüksek lisans öğrenimi sırasında 2014 yılında Araştırma Görevlisi olarak atandı ve 2015 yılında yüksek lisans öğrenimini bitirerek aynı yıl doktora öğrenimine başladı. Doktora öğrenimi sırasında Erasmus+ Öğrenci Değişim Programı ile 6 aylık bir süre boyunca Almanya'da Zittau/Görlitz Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Matematik/Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoteknoloji Laboratuvarında staj yaptı.



EKLER



Ek 1. Duyusal analiz formu

Probiyotik makarnalarda duyusal analiz değerlendirme formu

Ad Soyad:

Tarih:

Duyusal Özellikler	Tanım	Örnek No	Puan (1-10)
Yüzey düzgünlüğü	Çatlak ve pürüzlülüğün olmadığını gösterir. (1: az; 5: orta; 10: çok)		
Homojenlik	Spaghetti telinin merkezi ile yüzeyinin arasındaki tekstür (1: heterojen; 10: homojen)		
Sertlik	Merkezi kesici dişleri kullanarak kesmek için gereken kuvvet (1: yumuşak; 5: orta; 10: sert)		
Esneklik	Deforme edici kuvvet uygulandıktan sonra tekrar eski haline dönme derecesi (1: az; 5: orta; 10: çok)		
Kırılganlık	Parçalanma derecesi (1: ufalanan; 5: orta, 10: gevrek)		
Yapışkanlık	(1: az; 5: orta; 10: çok)		
Genel beğeni	(1: az; 5: orta; 10: çok)		

Ek 2. İzole edilen *B. coagulans*'ların sekans dizilimleri

SC izolatu

AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGG
GATAACGCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAGTTTTTCTCCGCA
TGGAGGAAAAAGGAAAGGCGGCTTCGGCTGCCACTTACAGATGGGCCC
GCGGCGCATTAGCTAGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGGCAACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTC
GTAAAACTCTGTTGCCGGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAACAGGGCGG
CGCCTTGACGGTACCCGGCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTCTGATGTGAAATCTTGCGGCT
CAACCGCAAGCGGTCATTGGAAACTGGGAGGCTTGAGTGCAGAAGAGG
AGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGCTCTGGAATTGACGCTGAAGCG
CCAAATCGTGGCCAGAAAACCGGATTACATA

SD izolatu

CAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTA
TTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGC
AGGCGGGTTGCAGCCTGCAATCCGAACCTGGGAATGGTTTTCTGGGATTG
GCTTAACCTCGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGT
GTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCT
TCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCT
GGCAACTAAGGTCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
CTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTGTGTCCC
CCGAAGGGGAAGGCCCTGTCTCCAGGGAGGTCAGAGGATGTCAAGACC
TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCT

TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACT
CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAA
ACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTA
TCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTCTCGCCTCAGCGTCAGTTACAGA
CCAGAGAGACGCCCTTCTCCACTGCGGTGCCTTCCACATCTCTACACGT
TTCACCGCTACACGTGGGAGATCCCCTCTCCTCT

SPi izolati

CAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTA
TTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGC
AGGCGGGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGGGAATGGTTTTCTGGGATTG
GCTTAACCTCGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGT
GTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCT
TCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCT
GGCAACTAAGGTCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
CTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCC
CCGAAGGGGAAGGCCCTGTCTCCAGGGAGGTCAGAGGATGTCAAGACC
TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCT
TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACT
CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAA
ACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTA
TCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTCTCGCCTCAGCGTCAGTTACAGA
CCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTT
CACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGCCTCCC
AGTTTCCAATGACCGCTTTGCGGTTGAGCCGCAAGATTTACATCCAGA
CTTAAGAAGCCGCCTGCCGCGCGCTTTAACGCCCAATAATTTCTGGACA
ACGCTTGCCCGCCTACGTATTAATCGCGGCTG

STp izolati

CAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTA
TTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGC
AGGCGGGTTGCAGCCTGCAATCCGAACCTGGGAATGGTTTTCTGGGATTG
GCTTAACCTCGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGT
GTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCT
TCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCT
GGCAACTAAGGTCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
CTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCC
CCGAAGGGGAAGGCCCTGTCTCCAGGGAGGTCAGAGGATGTCAAGACC
TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCT
TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACT
CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAA
ACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTA
TCTAATCCTGTTTGCTCTCCACGCTTTCGCGCCTCACCGCCTGTTACAGA
TCAACAGAGACCCCCTTC

Ek 3. *B. coagulans*'ların farklı sıcaklıklar (80°C, 90°C ve 100°C) için termal ölüm eğrilerinin çizilerek k değerlerinin hesaplanması (Bc: *B. coagulans* GBI-30, 6086; C: SC; D: SD; Pi: SPi; Pt: STp)

