

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

**FARKLI GIDALARDAN İZOLE EDİLEN MAYALARIN
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE
FONKSİYONEL GIDA GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Eda KILIÇ KANAK

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Temmuz 2024

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

**FARKLI GIDALARDAN İZOLE EDİLEN MAYALARIN
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE
FONKSİYONEL GIDA GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Eda KILIÇ KANAK

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suzan ÖZTÜRK YILMAZ

Temmuz 2024

Eda KILIÇ KANAK tarafından hazırlanan “Farklı gıdalardan izole edilen mayaların probiyotik özelliklerinin değerlendirilmesi ve fonksiyonel gıda geliştirilmesi ” adlı tez çalışması 18.07.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı :	Prof. Dr. Abdullah ÇAĞLAR Kocaeli Üniversitesi	
Jüri Üyesi :	Prof. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU Sakarya Üniversitesi	
Jüri Üyesi :	Prof. Dr. Bülent ÇETİN Atatürk Üniversitesi	
Jüri Üyesi :	Prof. Dr. Omca DEMİRKOL Sakarya Üniversitesi	
Jüri Üyesi :	Prof. Dr. Suzan ÖZTÜRK YILMAZ (Danışman) Sakarya Üniversitesi	



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “FARKLI GIDALARDAN İZOLE EDİLEN MAYALARIN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE FONKSİYONEL GIDA GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(02/07/2024).

Eda KILIÇ KANAK





Kızım Asya'ya,



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca beni yönlendiren ve destekleyen değerli danışmanım Prof. Dr. Suzan ÖZTÜRK YILMAZ ve komisyon üyeleri Prof. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU, Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e teşekkür ederim. Ayrıca imkanları konusunda yardımlarını esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümüne teşekkür ederim.

TÜBİTAK 1002-B Acil Destek Modülü" kapsamında 123O288 numaralı ve "Yeni İzole Edilen Probiyotik özellikli *Saccharomyces boulardii*'nin Mikroenkapsülasyonu ve Sükroz İçermeyen Prebiyotik Çikolatada Kullanımı" başlıklı projesinin yürütücüsü olarak tezimin büyük bir bölümünü tamamlamımı sağlayan TÜBİTAK'a bu desteğinden dolayı minnettarım. Ayrıca maddi desteklerinden dolayı Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2019-7-25-290) teşekkür ederim.

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve desteğini her gün hissettiren sevgili eşime varlığı ile hayatıma her gün neşe katan biricik kızıma, hayatım boyunca üzerimdeki haklarını ödeyemeyeceğim annem ve babama teşekkür ederim.

Eda KILIÇ KANAK



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xv
SİMGELER	xvii
TABLO LİSTESİ	xix
ŞEKİL LİSTESİ	xxi
ÖZET.....	xxiii
SUMMARY	xxvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Probiyotik Seçim Kriterleri	4
1.1.1. Hidrofobiklik.....	4
1.1.2. Otoagregasyon	5
1.1.3. Koagregasyon.....	6
1.1.4. Gastrointestinal sistemde hayatta kalma	6
1.1.5. Antibiyotik direnci	7
1.1.6. Antimikrobiyal aktivite	7
1.1.7. Antioksidan aktivite	8
1.1.8. Diğer özellikler	8
1.2. Fonksiyonel Gıdalar ve Mayalar	9
1.3. Çikolata	11
1.4. İnülin	12
1.5. Stevia.....	12
1.6. Enkapsülasyon.....	13
2. MATERYAL VE METOT	15
2.1. Materyal	15
2.2. Metot	15
2.2.1. Örneklerden mayaların izolasyonu	15
2.2.2. 37 °C sıcaklığa ve pH 2.0'a mayaların toleransının belirlenmesi.....	16
2.2.3. Mayaların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi.....	16
2.2.4. Mayaların gastrointestinal koşullarda hayatta kalma kapasitesinin belirlenmesi	16
2.2.5. Mayaların biyofilm oluşturma özelliklerinin belirlenmesi	17
2.2.6. Mayaların enzimatik aktivitelerinin belirlenmesi	18
2.2.7. Mayaların hidrokarbonlara tutunma aktivitelerinin belirlenmesi	19
2.2.8. Mayaların % otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi.....	20
2.2.9. Mayaların % koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi.....	20
2.2.10. Mayaların antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi.....	21
2.2.11. Mayaların antibiyotiğe dirençlerinin belirlenmesi	21
2.2.12. Mayaların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	22
2.2.13. Mayaların MALDITOF MS ile tanımlanması	23

2.2.14. İzole edilen mayaların 18S-28S rRNA ile tanımlanması	23
2.2.15. Dondurarak kurutma ile probiyotiklerin kapsüllenmesi ve kapsülleme verimliliği.....	24
2.3. Probiyotik Çikolata Özellikleri.....	25
2.3.1. Çikolatanın hazırlanması.....	25
2.3.2. Nem tayini	25
2.3.3. Sertlik	25
2.3.4. Çiçek oluşumu.....	25
2.3.5. pH ve Su Aktivitesi (α_w) ölçümü.....	25
2.3.6. Çikolata ile karıştırılmadan önce ve sonra kapsüllenmiş probiyotiklerin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi	26
2.3.7. Probiyotiğin çikolatalarda canlılığı	26
2.3.8. Probiyotik çikolatanın in vitro gastrointestinal sindirimi sırasında probiyotiklerin hayatta kalmasının test edilmesi.....	26
2.3.9. GC FID kullanarak yağ asitlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi	27
2.3.10. İstatistiksel analiz	28
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
3.1. Örneklerden Mayaların İzolasyonu	29
3.2. Mayaların Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi	31
3.3. Mayaların Gastrointestinal Koşullarda Hayatta Kalma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	31
3.4. Mayaların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Belirlenmesi.....	33
3.5. Mayaların Enzimatik Aktivitelerinin Belirlenmesi	34
3.5.1. Mayaların katalaz aktivitesi	35
3.5.2. Mayaların proteaz aktivitesi	35
3.5.3. Mayaların esteraz aktivitesi.....	35
3.5.4. Mayaların amilaz aktivitesi	35
3.5.5. Mayaların β -glikozidaz aktivitesi.....	35
3.6. Mayaların % Hidrokarbonlara Yapışma Değerleri.....	37
3.7. Mayaların % Otoagregasyon Değerleri	41
3.8. Mayaların % Koagregasyon Değerleri	43
3.9. Mayaların Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi	46
Mayaların Antibiyotiğe Dirençlerinin Belirlenmesi.....	49
3.10. Mayaların Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi.....	50
3.11. Mayaların MALDITOF Analizi ile Belirlenmesi.....	54
3.12. İzole Edilen Mayaların 18S-28S rRNA ile Tanımlanması.....	55
3.13. Dondurarak kurutma ile probiyotiklerin kapsüllenmesi ve kapsülleme verimliliği	56
3.14. Probiyotik Çikolatanın Özellikleri	57
3.14.1. Çikolatanın hazırlanması.....	57
3.14.2. Çikolata örneklerinin mikroskopta incelenmesi.....	58
3.14.3. Nem tayini	58
3.14.4. Sertlik	59
3.14.5. Çiçek oluşumu.....	60
3.14.6. pH ve su aktivitesi (α_w) ölçümü	60
3.14.7. Çikolata ile karıştırılmadan önce ve sonra kapsüllenmiş probiyotiklerin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi	62
3.14.8. Probiyotiğin çikolatalarda canlılığı	64

3.14.9. Probiyotik ikolatanın in vitro gastrointestinal sindirimi sırasında probiyotiklerin hayatta kalmasının test edilmesi	66
3.14.10. GC FID kullanarak yağ asitlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi	68
4. SONUÇ	73
KAYNAKLAR	77
EKLER	95
5. ÖZGEÇMİŞ	103





KISALTMALAR

ADI	: Acceptable Daily Intake - Günlük alınmasına izin verilen miktar
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists (Resm Analitik Kimyacılar Derneği)
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali
FAO	: Food and Agriculture Organization (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım rgt)
FDA	: Food and Drug Association (ABD Gıda ve İlaç İdaresi)
FOS	: Fruktooligosakkaritler
GC	: Gaz kromotografisi
GIT	: Gastrointestinal sistem
GRAS	: Generally Recognise as Safe (Genellikle güvenli olarak kabul edilen)
Kob	: Koloni Oluşturan Birim
OD	: Optical density (Optik dansite)
Rpm	: Revolutions per Minute (Dakikada devir sayısı)
spp.	: Species plural (Türler)
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık rgt)



SİMGELER

°C : Santigrat derece (°)

% : Yüzde

g : Gram

mm : Milimetre

s : Saniye

ml : Mililitre

L :Litre



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi.....	22
Tablo 3.1. Mayaların izolasyonunda kullanılan kaynaklar, izolatların numaralandırılmaları ve koloni morfolojileri.	29
Tablo 3. 2. Maya izolatlarının mide sıvısında ve pankreatik sindirimde hayatta kalma yüzdeleri.	32
Tablo 3. 3. İzolatların biyofilm oluşturma ve enzim aktivite sonuçları.	35
Tablo 3. 4. Mayaların hidrokarbonlara tutunma özelliklerinin belirlenmesi.	38
Tablo 3. 5. Maya suşlarının % otoagregasyon sonuçları.	42
Tablo 3. 6. Maya suşlarının % koagregasyon sonuçları.	44
Tablo 3. 7. Mayaların patojen bakteriler karşısında antimikrobiyal zon çapları (mm).	47
Tablo 3. 8. Maya suşlarının antibiyotiklere karşı gösterdiği duyarlılık test sonuçları.	50
Tablo 3. 9. Mayaların antioksidan aktivitesi (%).	50
Tablo 3. 10. Mayaların MALDITOF ile elde edilen sonuçları.....	54
Tablo 3. 11. Çikolata örneklerinin 0. ve 120. gün nem içerikleri (%).	58
Tablo 3. 12. Çikolata örneklerinin 0. ve 120. gün sertlikleri (N).	59
Tablo 3.13. 25 °C'de depolama sırasında probiyotik çikolataların pH ve a_w değerleri.	61
Tablo 3. 14. 25 °C'de depolama sırasında probiyotik çikolataların maya sayıları.	65
Tablo 3.15. <i>S. boulardii</i> 'nin 25 °C'de 1 gün ve 120 gün depolamanın ardından in vitro sindirime tabi tutulan çikolatada hayatta kalma oranı.	66
Tablo 3.16. Kapsüllü ve kapsülsüz çikolatların 0. ve 120. gün yağ asidi değerleri (%).....	68



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3. 1. Mayaların antioksidan değerleri.....	53
Şekil 3. 2. Kapsüllü çikolata örnekleri.....	57
Şekil 3. 3. Kapsülsüz çikolata örnekleri.....	57
Şekil 3. 4. Çikolata örneklerinin 0. ve 120. gün nem içerikleri (%).....	58
Şekil 3. 5. Çikolata örneklerinin 0. ve 120. gün sertlikleri (N).....	59
Şekil 3. 6. 25 °C'de depolama sırasında probiyotik çikolataların pH değerleri.....	62
Şekil 3. 7. 25 °C'de depolama sırasında probiyotik çikolataların a_w değerleri.....	62
Şekil 3. 8. Kapsüllenmiş <i>S. boulardii</i> 'nin SEM görüntüleri.....	63
Şekil 3. 9. Çikolata örnekleri içinde kapsüllenmiş <i>S.boulardii</i> 'nin SEM görüntüleri.....	63
Şekil 3. 10. Çikolata örnekleri içinde kapsüllenmemiş <i>S.boulardii</i> 'nin SEM görüntüleri.....	64
Şekil 3. 11. 25 °C'de depolama sırasında probiyotik çikolataların maya sayıları.....	65
Şekil 3. 12. <i>S. boulardii</i> 'nin 25 °C'de 1 gün ve 120 gün depolamanın ardından in vitro sindirime tabi tutulan çikolatada hayatta kalma oranı.....	67
Şekil 3. 13. Kapsüllü çikolata örneklerinin 0. gün yağ asidi değerleri.....	69
Şekil 3. 14. Kapsüllü çikolata örneklerinin 120. gün yağ asidi değerleri.....	69
Şekil 3. 15. Kapsülsüz çikolata örneklerinin 0. gün yağ asidi değerleri.....	70
Şekil 3. 16. Kapsülsüz çikolata örneklerinin 120. gün yağ asidi değerleri.....	70



FARKLI GIDALARDAN İZOLE EDİLEN MAYALARIN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE FONKSİYONEL GIDA GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Bu doktora tez çalışmasında, 19 ev yapımı doğal çökelek peyniri, karın kaymağı peyniri, tereyağ, kefir, yoğurt, tel peyniri, mantar turşusu, salatalık turşusu, lahana turşusu, fasulye turşusu, taflan turşusu, yabandağı alıcı sirkesi, Trabzon hurması sirkesi, ekşidağ elması sirkesi, kırmızı pancar lahana havuç biber sirkesi, elma sirkesi, üzüm sirkesi, çiçek balı sirkesi ve dağ kızılıcığı sirkesi örneklerinden izole edilen 85 maya suşunun probiyotik potansiyeli araştırılmıştır. Elde edilen maya suşlarının tamamı, mide ve bağırsak geçişi sırasında simüle edilmiş koşullara maruz kaldıktan sonra gastrointestinal koşullarda hayatta kalma potansiyeli göstermiştir. İzolatların %10,58'i orta, %34,11'i zayıf biyofilm üreticisi olarak tanımlanırken, %55,29'unun biyofilm oluşturma özelliğinin olmadığı belirlenmiştir. Tüm izolatlarda katalaz enzim üretimi tespit edilmiştir. İzolatlardan %83,52'sinin orta, %16,47'sinin ise güçlü prtoteaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. İzolatların %2,35'sinde esteraz aktivitesi görülmeyip, %95,29'unda orta düzeyde, %2,35'inde güçlü esteraz aktivitesi tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların %95,29'unda orta düzeyde amilaz aktivitesi, %2,35'inde güçlü amilaz aktivitesi tespit edilirken %2,35'inde ise amilaz aktivitesi tespit edilmemiştir. İzolatların %50,58'inde güçlü β -glukozidaz aktivitesi görülürken %49,41'inde aktivite görülmemiştir. Hidrokarbonlara yapışma yeteneğinin ise cinse ve türe özgü olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca hidrofobisiteninin hidrokarbonlara göre değiştiği belirlenmiştir. Çalışmamızda tüm suşlar için inkübasyon süresinin uzamasıyla otoagregasyon yüzdelerinin arttığı belirlenmiştir. 24 saatin sonunda tüm izolatlarda % otoagregasyon değeri %60'ın üzerinde tespit edilmiştir. Maya suşlarının *E.coli* ATCC 25922 suşu ile koagregasyon yetenekleri %0,0- 95,7 arasında bulunmuştur. Maya suşlarının *S. Typhimurium* ATCC 14028 ile % koagregasyon değerleri %0,0 -%91,9 arasında tespit edilmiştir. Maya suşlarının; *S. aureus* ATCC 25923 ile % koagregasyon yetenekleri %0,0-95,1 arasında bulunmuştur. Maya suşlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu ile koagregasyon yetenekleri %0,0-88,7 arasında bulunmuştur. Bu çalışmada; koagregasyon yeteneğinin, inkübasyon süresine ve suşuna bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen mayaların çoğunun *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *C. sakazakii* ATCC 29544, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923, *S. Typhimurium* ATCC 140828'e karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan, mayaların test edilen tüm antibiyotiklere karşı ise direnç gösterdiği doğrulanmıştır. Hücrelerin 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radikal süpürme aktivitesi, test edilen tüm maya suşlarında hücrelerin antioksidan aktivitesi hücre içi ekstraktlarından daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

MALDITOF ile tanımlaması yapılan mayalar daha sonra 18S-28S rRNA analizi ile tanımlanmıştır. En yüksek probiyotik potansiyeli bulunan mayalardan birisi olan *Saccharomyces boulardii* %39,76 kakao kütlesi, %41,85 kakao yağı, %14,80 inülin,

%1,60 steviosid ve %0,15 soya lesitini içeren şekerli prebiyotik ve probiyotik özellikli çikolata enkapsülasyon yöntemi ile üretilmiştir. Bu çalışmada *S. boulardii* kakao tozu: Na-aljinat: fruktooligosakkaritler sırasıyla (10:1:1) oranında karışım dondurarak kurutucu ile kapsüllenmiştir. Kapsülleyici karışım %93,57 ± 1,02 kapsülleme verimliliği göstermiştir. Nihai ürünlerde en az 10⁷ log kob/g canlı probiyotik sayısı sağlanmıştır. Çikolata örneklerinin kristal morfolojileri incelendiği zaman hacim artırıcı maddelerin (inülin) pürüzlü bir yapıya neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durum viskozite farkından dolayı kaynaklanmıştır. 25 °C'de 120 gün depolamadan sonra çikolata numunelerinin nem ve sertliğinde önemli bir değişiklik ($P \geq 0.05$) olmamıştır. Ayrıca örneklerin hiçbirinde depolama boyunca çiçeklenme gözlenmemiştir. Çikolata örneklerinde probiyotiklerin varlığında, 25 °C'de 120 gün boyunca depolama sırasında pH değerlerinde önemli ($P < 0.05$) artış, su aktivitesi değerlerinde ise düşüş olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Taramalı elektron mikroskopunda kapsüllü mayaların çikolata içinde hapsedildiği görülmüştür. Yuvarlak şeklindeki mayalar homojen bir şekilde dağılmış ve kapsüllenmiş probiyotiklerin hücre görünümü, tüm örneklerde aynı olmuştur. SEM görüntüleri, kapsülleyici karışımla dondurarak kurutma sırasında ve ayrıca kapsüllenmiş çikolatalarda; probiyotik bakterilerin, normal boyutunun ve şeklinin değişmediğini göstermiştir. Depolamanın ilk gününde tüm çikolata uygulamalarında başlangıç probiyotik sayılarının benzer (>11 log) olduğu görülmüştür. En önemlisi, kapsüllenmiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş çikolatada, 25 °C'de 120 günlük depolama boyunca probiyotik sayısı 8,08 log kob/g'nin üzerinde kalmıştır. Kapsüllenmemiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş çikolatalarda depolama sırasında probiyotik sayılarında önemli ($P < 0.05$) ve yaklaşık 5,97 logluk kademeli bir düşüş ortaya çıkmıştır. Kapsüllemelerin koruyucu etkileri çikolatalarda karşılaştırıldığında, kapsüllenmemiş probiyotiklere kıyasla kapsüllenmiş çikolatalarda 120 gün sonunda daha fazla sayıda (2,51 log) probiyotik tespit edilmiştir ve bu da enkapsülanların koruyucu etkileri olduğunu kanıtlamıştır. 25 °C'de bir günlük saklamanın ardından yapılan in vitro analizde, 2 saatlik mide sindirimine (pH 3) maruz bırakıldığında kapsüllenmemiş probiyotiklerle takviye edilmiş çikolatada 6,42 ± 0,0 log'luk önemli ($P < 0,05$) bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak kapsüllenmiş probiyotik çikolata içeren numunede yalnızca 3,99 ± 0,2 log azalma olmuştur. Çikolatalarda probiyotiklerin daha düşük log azalması; hem kapsüllemenin hem de çikolatanın taşıyıcı olarak kullanılmasının, in vitro sindirim sırasında probiyotikler üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Zorlu gastrik koşullara sahip olan midedeki pH 3 değeri ile karşılaştırıldığında bağırsaktaki; pH 7 değerinin probiyotik büyümesi için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar; kapsüllenmiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş probiyotik çikolatanın, uzun süreli depolama sırasında minimum terapötik limitleri koruyabildiğini açıkça göstermiştir. Ayrıca çikolata bileşenlerinin kompleks karışımının gastrointestinal kanalda, probiyotik büyümesi için iyi bir besin kaynağı olduğu sonucuna varılmıştır. Çikolata örneklerinde yağ asidi analizi GC-FID kullanılarak belirlenmiştir. Tüm örneklerde en fazla stearik asit tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde kapsüllü çikolatalarda depolamaya bağlı olarak Kaproik (C6:0), Palmitik (C16:0), Stearik (C18:0), Oleik (C18:1n9c), Linoleik (C18:2n6c), Araşidonik (C20:0), cis-15-Tetrakozenoik asit (C24:1n9) yağ asitlerinde önemli bir değişim görülmemiştir ($P > 0,05$), fakat depolamanın 120. gününde farklı olarak Laurik (C12:0) yağ asiti %1,649 oranında tespit edilmiştir. Kapsülsüz çikolatalarda Palmitik (C16:0), Stearik (C18:0), Oleik (C18:1n9c), Linoleik (C18:2n6c), Araşidonik (C20:0), Lignoserik (C24:0), cis-15-Tetrakozenoik asit (C24:1n9) yağ asitlerinde önemli bir değişim tespit edilmemiştir ($P > 0,05$).

Depolamanın 120. gününde farklı olarak Behenik (C22:0) yağ asitleri %0,955 oranında belirlenmiştir. Kapsüllü çikolatalarda kapsülsüz çikolatalardan farklı olarak Kaproik asit (C6:0) %0,714 oranında tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu doktora tez çalışmasında, maya suşlarının umut verici probiyotik potansiyele sahip olduğu gösterilmiş olup geleneksel olarak üretilen ürünlerde bulunan probiyotiklerin fonksiyonel özellikleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışmanın bulgularına göre, *S. boulardii* ile zenginleştirilmiş probiyotik çikolatanın iyi bir besin kaynağı ve insan sağlığı açısından potansiyel prebiyotik özelliği olan fonksiyonel bir atıştırmalık olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.





EVALUATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF YEASTS ISOLATED FROM DIFFERENT FOODS AND DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FOODS

SUMMARY

This PhD thesis investigated the probiotic potential of 85 yeast strains isolated from 19 homemade natural cottage cheese, belly cream cheese, butter, kefir, yoghurt, string cheese, pickled mushrooms, pickled cucumbers, sauerkraut, bean pickles, taflan pickles, wilddag buyer vinegar, persimmon vinegar, Ekşidağ apple vinegar, red beet, cabbage, carrot pepper vinegar, , apple cider vinegar, grape vinegar, flower honey vinegar and mountain cranberry vinegar samples. The obtained yeast strains demonstrated the potential to survive gastrointestinal conditions after being exposed to simulated conditions during stomach and intestinal transit. It was determined that 10.58% of the isolates were moderate biofilm producers, 34.11% were weak biofilm producers, and 55.29% did not have biofilm formation capability. Catalase enzyme production was detected in all isolates. It was found that 83.52% of the isolates exhibited moderate protease activity, while 16.47% exhibited strong protease activity. Esterase activity was not observed in 2.35% of the isolates, 95.29% had moderate esterase activity, and 2.35% showed strong esterase activity. Moderate amylase activity was detected in 95.29% of the isolates, strong amylase activity in 2.35%, and no amylase activity in 2.35%. Strong β -glucosidase activity was observed in 50.58% of the isolates, while no activity was observed in 49.41%. It was concluded that the adhesion ability to hydrocarbons was species and strain-specific. Additionally, hydrophobicity varied depending on the type of hydrocarbon. Our study determined that the autoaggregation percentages increased with the extension of the incubation period for all strains. After 24 hours, the autoaggregation percentage was over 60% in all isolates. The coaggregation abilities of the yeast strains with *E. coli* ATCC 25922 ranged from 0.0% to 95.7%. The coaggregation values with *S. Typhimurium* ATCC 14028 ranged from 0.0% to 91.9%, with *S. aureus* ATCC 25923 from 0.0% to 95.1%, and with *L. monocytogenes* ATCC 7644 from 0.0% to 88.7%. It was concluded that the coaggregation ability depended on the incubation time and strain. Most of the obtained yeasts exhibited antimicrobial effects against *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157H7, *B. cereus*, *C. sakazakii* ATCC 29544, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923, and *S. Typhimurium* ATCC 140828. The results confirmed resistance to all tested antibiotics. The 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity indicated that the antioxidant activity of the cells was higher than that of the intracellular extracts in all tested yeast strains.

Yeasts identified by MALDITOF were subsequently determined by 18S-28S rRNA analysis. One of the yeast strains with the highest probiotic potential, *Saccharomyces boulardii*, was used to produce sugar-free prebiotic and probiotic chocolate containing 62.2% cocoa mass, 7% cocoa butter, 30% inulin, 0.50% stevioside, and 0.30% soy lecithin using the encapsulation method. In this study, the mixture of *S. boulardii* cocoa powder: Na-alginate: fructooligosaccharides in the ratio (10:1:1) was encapsulated by

freeze dryer. The encapsulating mixture showed an encapsulation efficiency of $93.57 \pm 1.02\%$. At least 10^7 log CFU/g of live probiotic count was achieved in the final products. When the crystal morphologies of the chocolate samples were examined, it was found that bulking agents (inulin) caused a rough texture, which was attributed to differences in viscosity. There was no significant change ($P \geq 0.05$) in the moisture and hardness of the chocolate samples after 120 days of storage at 25°C . Additionally, no blooming was observed in any of the samples during storage. It was determined that in the presence of probiotics in chocolate samples, a significant ($P < 0.05$) increase in pH values and a decrease in water activity values ($P < 0.05$) were observed during storage at 25°C for 120 days. Scanning electron microscopy revealed that encapsulated yeasts were trapped within the chocolate. The round-shaped yeasts were uniformly distributed, and the appearance of the encapsulated probiotic cells was consistent across all samples. SEM images showed that probiotic bacteria's average size and shape did not change during freeze-drying with the encapsulating mixture or in encapsulated chocolates. On the first day of storage, all chocolate applications had similar initial probiotic counts (>11 log). Notably, the probiotic count remained above 8.08 log CFU/g throughout the 120-day storage period at 25°C in the chocolate enriched with encapsulated probiotics. In contrast, chocolates enriched with non-encapsulated probiotics showed a significant ($P < 0.05$) and gradual decrease in probiotic counts by approximately 5.97 logs during storage. When the protective effects of encapsulations in chocolates were compared, a higher number of probiotics (2.51 log) were detected at the end of 120 days in encapsulated chocolates compared to non-encapsulated probiotics, demonstrating the protective effects of encapsulants. In vitro analysis, after one day of storage at 25°C , revealed a significant reduction (6.42 ± 0.0 log, $P < 0.05$) in chocolates supplemented with non-encapsulated probiotics when exposed to 2-hour gastric digestion (pH 3). However, only a 3.99 ± 0.2 log reduction was observed in samples containing encapsulated probiotics. The lower log reduction of probiotics in chocolates indicated that encapsulation and using chocolate as a carrier protected probiotics during in vitro digestion. It was concluded that pH 7 in the intestine was more suitable for probiotic growth compared to pH 3 in the stomach, which has harsh gastric conditions. These results demonstrated that probiotic chocolate enriched with encapsulated probiotics could maintain minimum therapeutic limits during long-term storage. Additionally, it was concluded that the complex mixture of chocolate components served as a good nutrient source for probiotic growth in the gastrointestinal tract. Fatty acid analysis of the chocolate samples was determined using GC-FID, with stearic acid being the most abundant in all samples. When the results are examined, depending on storage in encapsulated chocolates, Caproic (C6:0), Palmitic (C16:0), Stearic (C18:0), Oleic (C18:1n9c), Linoleic (C18:2n6c), Arachidonic (C20:0), cis-15-Tetracosenoic acid (C24:1n9) fatty acids showed no significant change ($P > 0.05$), but unlike the 120th age of storage, Lauric (C12:0) fatty acid was detected at a rate of 1.649%. In non-encapsulated chocolates, Palmitic (C16:0), Stearic (C18:0), Oleic (C18:1n9c), Linoleic (C18:2n6c), Arachidonic (C20:0), Lignoceric (C24:0), cis-15-Tetracosenoic acid. No significant change was detected in (C24:1n9) fatty acids ($P > 0.05$). On the 120th day of storage, Behenik (C22:0) fatty acids were detected at a different rate of 0.955%. Unlike unencapsulated chocolates, caproic acid (C6:0) was detected at a rate of 0.714% in encapsulated chocolates.

In conclusion, this PhD thesis demonstrated that yeast strains possess promising probiotic potential and provided significant insights into the functional properties of probiotics found in traditionally produced products. Based on the findings of this study, it was concluded that probiotic chocolate enriched with *S. boulardii* could be considered a functional snack with potential prebiotic functions and a good nutrient source for human health.





1. GİRİŞ

Mayalar, gıda endüstrisinde biyoteknolojik potansiyeli olan ökaryotik mikroorganizmalardır. Maya, farklı tür substratlar kullanılarak hazırlanan alkollü içeceklerden, peynir de dahil fermente süt ürünlerinden, tahıl bazlı mayalı ürünlerden ve çeşnilerden olmak üzere geniş bir yelpazede fermente ürünlerin üretiminden sorumludur (Rai ve Jeyaram, 2017). Maya, gıda fermantasyonu sırasında organik asitlerin üretimi ve kullanımı, lezzet, aroma ve dokunun iyileştirilmesi, besin özelliklerinin artırılması ve toksinlerinin azaltılması gibi birçok önemli rol oynar (Chaves-Lopez ve ark., 2014; Rai ve Jeyaram, 2017). Doğal olarak fermente edilmiş birkaç gıdadan izole edilen ve karakterize edilen maya suşları, endüstriyel seviyede fonksiyonel gıdaların üretimi için başlatıcı / yardımcı başlatıcı olarak başarıyla uygulanmıştır (Padilla ve ark., 2015; Rai ve ark., 2017; Rai ve Jeyaram, 2017). Fonksiyonel gıdalar, normal diyetin bir parçası olarak alınan ve beslenme özelliklerinin ötesinde sağlık yararları gösteren gıda ürünleridir. Fermente gıda ürünlerinde mayalar, enzim, metabolit üretimi ile biyoaktif bileşenleri artırır veya fonksiyonel özelliklerin geliştirilmesine yol açan diğer mikroorganizma gruplarıyla birlikte sinerjistik bir şekilde etki eder (Rai ve ark., 2016). Ayrıca, mayalar mikotoksin ve antibiyotik faktörlerin üretilmesiyle düşük ürün kalitesinden sorumlu olan mikroorganizmaların neden olduğu istenmeyen bozulmaların azaltılmasından veya ortadan kaldırılmasından da sorumludur (Rai ve Jeyaram, 2017).

Fonksiyonel gıda araştırması, insan beslenmesi ile ilgili yükselen bir çalışma alanıdır (Saad ve ark., 2011). Bu tür yiyeceklere olan talebin artması, artan sağlık maliyetleri, yaşam beklentisi ve yaşam kalitesini iyileştirme konusundaki genel isteklerden kaynaklanabilir (Abd El-Salam ve ark., 2011). Son yıllarda, probiyotik destekli ürünler, bilim dünyasında önemli bir rol oynamaktadır ve birçok probiyotik çalışması, şu anda dünya probiyotik ticaretinde baskın olan fermente süt ve yoğurtlara odaklanmıştır (Saad ve ark., 2011). Bununla birlikte, vejeteryanlığın artmasıyla birlikte, süt ürünü olmayan probiyotik yiyeceklere olan talep de artmaktadır. Ek olarak,

laktoz intoleransı ve kolesterol içeriği, fermente süt ürünleri ile ilgili iki önemli dezavantajdır (Prado ve ark., 2010).

Takviye veya fermente edilmiş yiyecekler formundaki probiyotik mikroorganizmalar, sağlığın iyileştirilmesinde kullanılır. Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak nitelendirilmesi için ihtiyaç duyulan düşük pH'da ve safrada büyüme, hücre yüzeyi hidrofobikliği ve oto agregasyonunu tolere etme yeteneğini içeren çeşitli özellikler vardır (Fadda ve ark., 2017). Probiyotik mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmaların çoğu bakteriler üzerine yapılmıştır ancak yakın geçmişte, maya da bir probiyotik olarak potansiyelini göstermiştir (Saber ve ark., 2017a,b). Maya, bakterilerden yaklaşık on kat daha büyük, normal olarak antibiyotiklere dirençli olduğu için bakterilere kıyasla birkaç avantaj sağlar (Rai ve ark., 2018).

Probiyotik özelliklere sahip olan maya türleri *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces boulardii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida krusei*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentase* ve *Pichia kudriavzevii* olarak rapor edilmiştir (Kumura ve ark., 2004; Saber ve ark., 2017a,b). *S. boulardii*, birçok probiyotik özelliğe sahip olan ve geniş kapsamlı olarak çalışılmış bir maya türüdür (Kelesidis ve Pothoulakis, 2012). Ayrıca, *S. boulardii*, bağırsak hastalığına karşı ekonomik ve etkili bir probiyotik maya olarak kullanılır ve insanlarda olduğu kadar hayvanlarda da farklı türlerde ishallerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kelesidis ve Pothoulakis, 2012; Romanin ve ark., 2015; Szajewska ve Kołodziej, 2015).

Birçok araştırmacı, fermente gıdalardan probiyotik özelliklere sahip maya suşlarını araştırarak sağlığı artırıcı ek özellikleri olan potansiyel maya izolatları elde etmiştir (Aloglu ve ark., 2016; Fadda ve ark., 2017; Romanin ve ark., 2015). Çeşitli fermente gıdalardan izole edilen probiyotik etkili mayaların kolesterolü özümseme kabiliyeti de tespit edilmiştir (Aloglu ve ark., 2016). *K. marxianus* CIDCA 8154, probiyotik mayasının anti-enflamatuar etkiye ve oksidatif stresi azaltma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Romanin ve ark., 2015). Geleneksel pirinç birasından izole edilen *S. cerevisiae* ARDMC1 suşunun farelerde hipokolesterolemik aktivitenin yanı sıra probiyotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Saikia ve ark., 2017). Yakın geçmişte yapılan araştırmalar, probiyotik mayalardan salgılanan metabolitlerin de antikanser etkisi olduğunu göstermiştir (Saber ve ark., 2017a,b). *P. kudriavzevii* AS-12 tarafından salgılanan probiyotik metabolitler antikanser aktivitesi açısından incelenmiş ve maya

metabolitlerinin kolon kanseri hücrelerinde (HT-29 ve Caco-2) antikanser ve antioksidant etkisi gösterdiği bulunmuştur (Saber ve ark., 2017a). Benzer şekilde, süt ürünlerinden izole edilen probiyotik özelliklere sahip *K. marxianus* AS41 tarafından üretilen metabolitlerin antikanser etkisi olduğu belirlenmiştir (Sabre ve ark., 2017b). Ananastan izole edilen *Meyerozyma caribbica* ile fermente edilmiş ananas suyu, *S. cerevisiae* var. *boulardii* ile karşılaştırıldığında ürünün gelişmiş probiyotik ve fonksiyonel özelliklere sahip olmasını sağlamıştır (Amorim ve ark., 2018). Başka bir çalışmada, probiyotik bir suş olan *Pichia Kudriavzevii* OG32 kullanılarak fermente edilen tahıl diyetiyle beslenen farelerde antioksidan etkiler sergilenmiştir (Ogunremi ve ark., 2015a).

Mayalar, şekerler, etanol, CO₂ ve diğer metabolitleri metabolize ettikleri birçok endüstriyel proseste (şarap, bira, ekmek, damıtma, elma şarabı, sake, kakao veya kefir) yer alan faydalı mikroorganizmalardır (Pretorius 2000), böylece fermente gıda ve içeceklerin kimyasal bileşimine, duyu kalitesine ve tipik özelliklerine katkıda bulunurlar (Perez Coello ve ark., 1999; Romano ve ark., 2015). Geleneksel fermantasyonun birçok maya içeren karmaşık bir mikrobiyolojik işlem olduğu bilinmektedir (Fernandez-Gonzalez ve ark., 2001; Moroni ve ark., 2011; Fernandez ve ark., 2016; Ubeda ve ark., 2016).

Geçmişte bazı yazarlar, insan kaynağını bir probiyotik seçmek için temel bir gereklilik olarak kabul ettiği için ve geleneksel probiyotik tanımlarındaki bazı kısıtlamalar nedeniyle sadece bakterilere uygulamıştır. Doğal sağlıklı gastrointestinal mikrobiyota, aslında sadece <0-1 oranında bir maya içeriğine sahiptir ve *C. albicans* en önemli türdür (Czerucka ve ark., 2007). İnsan, yiyecek veya diğer güvenli bileşikler ile ilgili tanımın düzeltilmesi ve bakterilerde antibiyotik direncinin yayılması, probiyotik mayalara artan ilginin önde gelen faktörlerinden ikisidir. Mayalar antibiyotiğe dirençlidirler, ancak kodlayan genler kromozomlar üzerinde olduklarından direnç yaymaları çok uzun yıllar alır (Czerucka ve ark., 2007). *S. boulardii* hala ticari kabul gören tek probiyotik maya olarak kalsa da, muhtemel adaylar olarak umut vaat eden mayalar listesi sürekli güncellenmektedir. Probiyotik mayalar; *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* gibi farklı türler (Diosma ve ark., 2014; Song ve ark., 2014; Gil Rodriguez ve ark., 2015; Pienaar ve ark., 2015), *Cryptococcus* spp. (Aloğlu ve ark., 2015), *Candida famata* (Al-Seraih ve ark., 2015), *C. tropicalis* (Ogunremi ve ark., 2015b), *Debaryomyces hansenii* (Ochangco ve ark., 2016), *Issatchenkia orientalis* (Ogunremi

ve ark., 2015) , *Kluyveromyces lactis* (Binetti ve ark., 2013), *Kluyveromyces marxianus* (Binetti ve ark., 2013; Diosma ve ark., 2014; Smith ve ark., 2015), *Metschnikowia gruessii* (Smith ve ark., 2015), *Pichia jadinii* (Buerth ve ark., 2016), *Pichia kluyveri* (Ogunremi ve ark., 2015), *Pichia kudriavzevii* (Ogunremi ve ark., 2015), *Pichia pastoris* (Correa Franca ve ark., 2015), *Pichia guilliermondii* (Bonatsou ve ark., 2015), *Wickerhamomyces anomalus* (Bonatsou ve ark., 2015) bunlardan bazılarıdır. Probiyotik seçimi, farklı adımlar içeren karmaşık bir süreçtir (Bevilacqua ve ark., 2014). Gıda muhafazasında doğal bileşenlere olan talebin artması nedeniyle yeni probiyotik mikroorganizmaların izole edilmesi için çalışmalar yapılmıştır (Vera-Pingitore ve ark., 2016). Probiyotik özellikler her suş için özeldir ve bu nedenle yeni probiyotik adaylarını değerlendirmek için çalışmalar yapılmalıdır. Bu adımlar, probiyotik maya seçmek için de kullanılmalıdır.

1.1. Probiyotik Seçim Kriterleri

1.1.1. Hidrofobiklik

Mukus, probiyotikler için ilk hedefi temsil eder ve esasen hidrofobiktir. Bu nedenle hidrofobiklik üzerindeki test, mukus ile etkileşime girme yeteneğini test etmek için faydalıdır. Hidrofobiklik, hidrokarbonları (ksilen, toluen, vb.) yakalama kabiliyeti ile belirlenir (Bautista-Gallego ve ark., 2013; Binetti ve ark., 2013; Perricone ve ark., 2014; Al-Seraih ve ark., 2015; Ogunremi ve ark., 2015).

Probiyotiklerin özelliklerinden biri, konakçı hücrelerin yüzeyine yapışma yeteneğidir. Hücre yüzeyi hidrofobikliği, bağırsakta probiyotiklerin çoğalmasında çok önemli bir adım olan kolonizasyon kabiliyetini belirler (Orłowski ve Bielecka, 2006). Hidrokarbonlara mikrobiyal yapışma, probiyotiklerin hücre yüzeyi hidrofobikliğini ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmanın hidrofobikliği, yüzey yükü, aynı türün suşları arasındaki farktan ve hücrelerin fizyolojik durumu arasındaki farklılıktan kaynaklanabilir. (Nwanyanwu ve ark., 2012). Hücre yüzeyi hidrofobisitesindeki büyük farklılıklar, bir türün suşları arasında hücre yüzeyi proteinlerinin ekspresyon seviyesindeki varyasyonun yanı sıra yüzey proteinlerinin ekspresyonunu etkileyebilecek çevresel koşullara bağlı olabilir (Kaushik ve ark., 2009).

Yüksek hücre yüzeyi hidrofobikliği, mikroorganizmaların konakçı hücrelerden hidrokarbona bağlanmasına ve sulu fazdan organik faza geçmesine izin verir

(Kaczorek ve ark., 2008). Boris et al. (1998) hidrofobikliği %40'ın üzerinde olan suşların hidrofobik olduğunu düşünmektedir. Gomez-Zavaglia ve ark. (2002) hidrofobikliğin çözücülerin ve maya hücresi yüzeylerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olduğundan bahsetmiştir. İn vivo çalışmalarda hidrofobiklik ile sindirim sistemini kolonize etme yeteneği arasındaki korelasyon geniş çapta tartışılmış olmasına rağmen (Martins ve ark., 2009) mayalar genellikle gastrointestinal sistemde (GIT) mikrobiyota ile rekabet nedeniyle dışkıda elimine edildiğinden bu zorunlu bir özellik değildir (França ve ark., 2015). Bu nedenle, probiyotik etkisinin doza bağımlı olduğu akıld tutularak, konakçı yolunda uygun konsantrasyonları sağlamak için probiyotikler düzenli olarak tüketilmelidir (FAO/WHO 2002).

Hidrofobiklik, mikrobiyal ve konakçı hücreler arasındaki spesifik olmayan bir etkileşim olarak tanımlanır. Bu etkileşime hücre yüzeyi proteinleri ve lipoteikoik asitler aracılık eder (Todorov ve ark., 2008). Hidrofobiklik, probiyotik mikroorganizmaların profilaktik ve terapötik faydalar sağlayabilecekleri GIT epitel hücrelerine yapışmasında çok önemlidir (Fadda ve ark., 2017). Hidrofobiklik, bu çalışmada gösterildiği gibi cinse ve türe özgüdür (Fadda ve ark., 2017; Suvarna ve ark., 2018).

Hücre yüzeyinin hidrofobikliği, bazı mikrobiyal suşların sindirim sisteminden diğerlerine göre neden daha yavaş elimine edildiğini açıklamak için sıklıkla önerilmiştir (Martins ve ark., 2009). Bu çalışmada, hidrofobik/hidrofilik hücre yüzey özelliklerini ve bunların asit baz özelliklerini değerlendirmek için üç farklı çözücü kullanılmıştır. Bu çözücüler, polar olmayan bir çözücü olan ksilen, monopolar ve asidik bir çözücü olan kloroform ve bazik çözücü olan etil asetatır. Ksilen elektrostatik etkileşimler olmadığı için hücre yüzeyi hidrofobikliğini yansıtır. Diğer iki çözücü, kloroform ve etil asetat, mikroorganizmanın sırasıyla elektron verici (bazik) ve elektron alıcı (asidik) özelliklerinin bir ölçüsü olarak kabul edilir (Zarate ve ark., 2000).

1.1.2. Otoagregasyon

Otagregasyon, aynı türe ait mikroorganizmaların birbirlerine tutunması ile oluşturdukları hücre kolonileridir. Mayaların otoagregasyon yeteneği mukusa yapışma ve biyofilm oluşturma kabiliyeti ile ilgilidir. Probiyotik bir mayanın otoagregasyonu en az % 30 -% 60 olmalıdır (Bautista-Gallego ve ark., 2013; Binetti ve ark., 2013; Gil-Rodríguez ve ark., 2015; Ogunremi ve ark., 2015). Probiyotik bakteriler

otoagregasyon yeteneklerini arttırdıkça, epitel hücreleri ve mukozal yüzeyler ile ilişkileri de artar (Collado ve ark., 2008). Bu özellikler probiyotikler için çok önemlidir. Böylece probiyotikler, patojenlerin bağırsak epiteline yapışmasını önleyebilir (Vidhyasagar ve Jeevaratnam, 2013). Ayrıca insan bağırsağında bulunan probiyotiklerin otoagregasyon yeteneği arttıkça gastrointestinal sistemdeki bakteri dengesi de artar (Tulumoglu ve ark., 2013). Otoagregasyon, hücre yüzeyinin fiziko-kimyasal özellikleri, ortamdaki Ca^{+2} iyonlarının veya mannoz varlığı, inoküle edilen kültürün inkübasyon süresi veya uygulanan yöntemlerin farklı olması gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Powel ve ark., 2003).

1.1.3. Koagregasyon

Koagregasyon, farklı türe ait iki mikroorganizmanın birbirine tutunmasıdır. Koagregasyon yeteneği, patojenik bakterilerin insan bağırsağında kolonize olmasını önler (Abushelaibi ve ark., 2017). Probiyotikler ve patojenler arasındaki koagregasyon, patojenlerin probiyotik suşlar tarafından üretilen bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddelere çok yakın olmalarına neden olur. Böylece patojenler engellenebilir (Todorov ve ark., 2008). Koagregasyon yeteneği, probiyotiklerin önemli bir özelliğidir (Campana ve ark., 2017). Probiyotik mikroorganizmaların probiyotik özellikleri, bağırsak patojenlerinin varlığında koagregasyon ile artar ve savunma bariyeri oluşur (Nami ve ark., 2019). Böylece probiyotikler, patojenlerin insan bağırsağında kolonize olmasına izin vermez (Vidhyasagar ve Jeevaratnam, 2013). Tareb ve ark., (2013) hücre yüzeyinde bulunan proteinli bileşenler, karbonhidrat ile lektin arasındaki etkileşimler nedeniyle izolatlarının patojenlerle koagregasyon yeteneğinin oluştuğunu bildirmiştir. Mayaların hücre yüzeyleri glukanolar ve mannanlar gibi karbohidratlarla kitinden oluşur. Bu bileşenler mayaların koagregasyon ve koadhezyon olaylarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Millsap ve ark., 1998).

1.1.4. Gastrointestinal sistemde hayatta kalma

Probiyotik özellik taşıyan bir mikroorganizma düşük pH ve % 0,3 safra tuzu içeren ortamlarda hayatta kalmalıdır (Binetti ve ark., 2013; Diosma ve ark., 2014; Perricone ve ark., 2014; Al-Seraih ve ark., 2015; Bonatsou ve ark., 2015; Gil-Rodríguez ve ark., 2015; Ochangco ve ark., 2016; Petruzzi ve ark., 2016). Probiyotik suşlar mide ve ince bağırsaktan başarıyla geçebilmelidir. Bunun için asidik ortamları, safra salgılarını, pankreas suyunu ve bağırsak suyunu tolere etmesi gerekir. Mide suyunun normal pH'ı 2.0-3.0 civarındadır, ancak gıda alımından sonra mide içeriğinin pH'ı yaklaşık 3.0'ın

üzerine çıkar (Singh ve ark., 2012). Bakterilerin probiyotik sayılabilmesi için ısıya dayanıklı olması gerekir (Shi ve ark., 2020). Çift katmanlı membran yapıları onları ısıya dayanıklı kılar (Baccouri ve ark., 2019). Midedeki antimikrobiyal faktörler arasında mide suyu ve pepsin bulunurken, bağırsakta pankreatin ve safra bulunur. Todorov ve ark. (2008) probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal kanalda yaşaması ve çoğalması için düşük pH ve safra tuzlarına toleransın önemli olduğunu belirtmişlerdir.

1.1.5. Antibiyotik direnci

Mayalar için negatif bir özellik değildir, çünkü onu kodlayan genler kromozomlar üzerindedir (Perricone ve ark., 2014). Yaygın olarak kullanılan antibiyotikler, streptomisin, tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, penisilin ve ampicilindir. Probiyotik mikroorganizmaların çoğu bakteri olup birçoğu bu antibiyotiklere karşı dirençli olabilmekte veya tolere edebilmektedir. Mayalar ise bu antibiyotiklere karşı doğal direnç gösterir ve antibiyotik tedavisi gören hastalar için kullanılabilir (Syal ve Vohra, 2013). Ökaryot probiyotik mayalarda antibiyotik direnç genlerini kodlayan plazmid DNA olmadığından, mayalardan bu gibi genleri bakterilere transferi yapılamamaktadır. Antibakteriyel antibiyotiklere mayanın doğal direnci antibiyotik ile tedavi edilen hastalarda kullanımının önemli bir argümanıdır. Genetik materyalin aktarımı bakteri ve maya arasında gerçekleşmez. Bu durum mayayı antibiyotik tedavisi sırasında kullanım için güvenli hale getirir (Czerucka ve ark., 2007)

1.1.6. Antimikrobiyal aktivite

Mayaların antimikrobiyal özellik göstermesi pozitif bir özellik olarak değerlendirilir. (Binetti ve ark., 2013; Perricone ve ark., 2014). Mayalardaki antimikrobiyal aktiviteler, fermente gıdaların raf ömrünü ve güvenliğini artırmak için arzu edilen özelliklerdir (Psani ve Kotzekidou 2006). Probiyotik suşun rekabet avantajına sahip olması ve bağırsağın patojenler tarafından kolonizasyonunu önlemesi de önemlidir (Plessas ve ark., 2012).

Mayaların bakterilere karşı antagonistik aktivitesi, besinler için rekabet, organik asit üretimi, yüksek konsantrasyonlarda etanol üretimi ve hücre dışı proteinler veya hücre zarı fonksiyonunu bozan glikoproteinler olan mikotoksinler olarak bilinen antibakteriyel bileşiklerin salgılanması gibi farklı faktörlere bağlanmıştır (Viljoen, 2006).

1.1.7. Antioksidan aktivite

Fermantasyon sırasında mayalar tarafından üretilen birkaç metabolit, antioksidan aktiviteye sahiptir (Abbas, 2006). Probiyotikler diyetle alınan antioksidanları artırma ve vücuttaki endojen antioksidanları tamamlama potansiyelleri sunan antioksidan özelliklere sahip biyoaktif bileşikler salgılayabilirler (Balasubramanian ve Ragunathan 2012; Mishra ve ark., 2012). Bu çalışmalarda, maya suşlarının, DPPH'yi önemli ölçüde temizleyerek türlere ve suşa bağlı aktivite göstermiştir. Mayadaki antioksidan aktivite, metabolitleri özellikle karotenoidler, organik asitler, glutatyon, bazı proteinler ve β -glukan gibi hücre bileşenlerinde karakterize edilen antioksidan bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Abbas 2006; Balasubramanian ve Ragunathan 2012).

1.1.8. Diğer özellikler

Kolesterol asimilasyonu, enzimatik aktivite, hemolitik aktivite, biyofilm oluşturma gibi özellikler sayılabilir (Al-Seraih ve ark., 2015; Bonatsou ve ark., 2011; Gil-Rodríguez ve ark., 2015; Ogunremi ve ark., 2015; Aloglu ve ark., 2016; Ochangco ve ark., 2016).

Enzimatik aktivite: Gıdada kullanılabilir mayalar tarafından üretilen enzimlerin çoğu, gıdalardaki karmaşık bileşiklerin metabolize edilmesinde rol oynar, böylece fermente gıdalara besin değeri ve organoleptik özellikler kazandırılır (Hellström ve ark., 2012). Esteraz ve lipaz, farklı aromatik bileşiklerin oluşumunun öncüsü olan serbest yağ asidi içeriğini artırarak fermente gıdaların aromatik profilini iyileştirir (Arroyo Lopez ve ark., 2012). Lipaz ve proteaz, gastrointestinal sistemde lipidlerin ve proteinlerin sindiriminin iyileştirilmesine katkıda bulundukları için probiyotik potansiyeli destekleyebilir (Syal ve Vohra, 2013). Amilaz, insan diyetindeki nişasta ve glikojenin parçalanmasını kolaylaştırarak polisakkaritlerin hidrolizinden sorumludur ve böylece sindirim sistemine katkıda bulunur (Motta, 2000).

Biyofilm oluşumu: Bağırsağı kolonize etme potansiyelinin değerlendirilmesi, biyofilm oluşumu yoluyla da değerlendirilebilmektedir. Aslında, biyofilmlerin bağırsaktaki konak ve yerleşik mikroorganizmalar arasındaki yakın ilişkide önemli bir rol oynadığı biyofilm oluşumunun bağırsak kolonizasyonu ve bazı probiyotiklerin bağırsak mukozasına yapışması için temel bir ön koşul olduğu bilinmektedir.

Son on yılda, mayaların potansiyeline ve / veya olası olumsuz veya olumlu etkilerine karşı artan bir ilgi olmuştur. Probiyotik mayaların keşfi veya maya hücrelerinden bazı

faydalı bileşiklerin üretilmesi gibi konular muhtemelen bu artışta önemli bir rol oynamıştır (Arevalo-Villena ve ark., 2017). Bu çalışma ile probiyotik potansiyeli olan maya türleri izole edilerek, literatüre katkı sağlamanın yanısıra dünyada sınırlı sayıda çalışılmış yeni bir fonksiyonel probiyotik ürün kazandırılması hedeflenmiştir.

1.2. Fonksiyonel Gıdalar ve Mayalar

Besin değerinin ötesinde ek sağlık yararları sağlayan fonksiyonel gıdalara olan ilgi artmaya devam etmekte ve hem tüketicilerin hem de bilim camiasının ilgisini çekmektedir (Hossain ve ark., 2021a). Probiyotikler çok önemli fonksiyonel bileşenlerdir ve gıda formülasyonları yoluyla yeterli miktarda canlı probiyotik tüketimi, bağırsak mikrobiyotası üzerindeki olumlu fizyolojik etkilerinden dolayı sağlıklı bir bağırsağın korunmasına yardımcı olabilmektedir (Wasilewski ve ark., 2015). Probiyotiklerin hem gıda hem de takviyelerdeki piyasa değerinin 2025 yılına kadar 78,42 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Probiotics Market Outlook, 2018). Uluslararası Süt Ürünleri Federasyonu, sağlık yararlarını elde etmek için tüketim anında yeterli sayıda canlı probiyotik (10^6 - 10^7 log/mL veya g gıda) önermektedir (Frakolaki ve ark., 2020). Sonuç olarak, gıda endüstrilerinde çeşitli inovasyon yöntemleri aracılığıyla önerilen probiyotik canlılığını sürdürmeye yönelik artan bir ilgi vardır. Ancak, bu zordur ve daha fazla bilimsel araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Granato ve ark., 2020). Günümüzde probiyotik alımı için fonksiyonel gıda matrislerine olan talep artmaktadır, ancak mide asidi, safra ve çeşitli sindirim enzimleri gibi zorlu gastrointestinal koşullar nedeniyle gastrointestinal geçiş sırasında probiyotiklerin hayatta kalması zor olabilmektedir. Bu nedenle probiyotiklerin oral uygulama yoluyla verilmesi zordur (Frakolaki ve ark., 2020). Ek olarak, taşıyıcı gıda ürünlerinin işlenmesi ve saklanması sırasında probiyotiklerin hayatta kalmasıyla ilişkili zorluklar vardır (Mani-L'opez ve ark., 2014). Probiyotiklerin sistemik etkilerini gösterebilmeleri için, farklı işleme adımlarında, saklama koşullarında ve gastrointestinal sistemden geçiş sırasında hayatta kalmaları ve geçici olarak da olsa bağırsakta kolonize olmaları gerekir (Monteagudo Mera, ve ark., 2019). Probiyotikler gıdalarda depolandıkları süre içerisinde ortam koşullarından etkilenerek canlılığını kaybedebilirler. Bunun için enkapsülasyon, probiyotiklerin olumsuz ortam koşullarından etkilenmemeleri için uygulanan bir yöntemdir (de Souza Simoes ve ark., 2017). Bunun için çalışmamızda enkapsülasyon yöntemi tercih edilmiştir.

Probiyotikler için bakteri ile karşılaştırıldığında, maya türleri düşük pH'ta (1,5) daha yüksek hayatta kalma kabiliyetine sahiptir ve bu nedenle probiyotik olarak umut vadeden adaylardır (Hsiung ve ark., 2021). Asite (pH 1,5-3,0) ve safraya (%0,3, w/v) tolerans, gastrointestinal sistemde hayatta kalmayı sürdürmek potansiyel probiyotik maya suşlarının belirlenmesinde temel seçim kriterleridir (Zahoor ve ark., 2021). Bakteriyel probiyotiklerle karşılaştırıldığında, mayaların geleneksel fermente gıdalarda probiyotik olma potansiyeli hala yeterince çalışılmamıştır, ancak çok az araştırmacı probiyotik mayaların gıdalardaki potansiyellerini gözden geçirmiştir. Bu konuda daha fazla bilimsel çalışmaya ihtiyaç vardır (Kwofie ve ark., 2020; Menezes ve ark., 2020; Sambrani ve ark., 2021; Staniszewski ve Kordowska Wiater, 2021). Mayaların probiyotik özellikleri spesifiktir ve bu nedenle yeni probiyotik adaylarını değerlendirmek için çalışmalar yapılmalıdır. Çalışmamızda yeni izole edilen probiyotik maya kullanılarak bu alanda literatüre katkı sağlanacaktır. *S. boulardii*, ticarileştirilmiş tek probiyotik mayadır (Roohvand ve ark., 2020) ve probiyotik özellikleri, klinik deneylere dayanan bilimsel kanıtlarla desteklenmektedir (McFarland, 2017). *S. boulardii*'nin probiyotik gıdalar alanındaki artan popülaritesi şaşırtıcı değildir. Çünkü *S. boulardii*, geleneksel probiyotik bakterilere kıyasla bazı gıda matrislerinde üstün teknolojik özellikler sunar. Örneğin, *S. boulardii* canlılığını (6-7 log kob/mL) kahve ve çaydaki probiyotik laktobasillere kıyasla en az birkaç ay daha uzun süre koruyabilmiştir (Chan and Liu, 2022; Wang ve ark., 2022). *S. boulardii*'yi sağlık yararları ve etki mekanizmaları ile birlikte gıdalardaki teknolojik uygulanabilirliğini inceleyen son çalışmalar ön plana çıkmıştır (Staniszewski ve ark., 2021; Ansari ve ark., 2021; Pais ve ark., 2020). *S. boulardii*'ye dayalı sinbiyotik gıdalar geliştiren sınırlı sayıda yeni çalışma arasında bulunanların tümü tamamlayıcı formdadır. Örneğin, yoğurt, dondurma ve çikolata örneklerine, probiyotik maya ve inülinin takviye edilmiştir. Bu kombinasyonun, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çocuklarda *H. pylori*'yi ortadan kaldırdığı tespit edilmiş ve bir probiyotik ve prebiyotikten oluşan tamamlayıcı bir sinbiyotik olduğu kabul edilmiştir (McFarland ve ark., 2018; Gotteland ve ark., 2005; Scott ve ark., 2019). Buna göre, mevcut *S. boulardii* gıdaları, bir sağlık yararının gösterilmesi koşuluyla, bir prebiyotiğin [(örn. fruktooligosakkaritler (FOS), galaktooligosakkaritler, akasya zambkı)] eklenmesi yoluyla tamamlayıcı sinbiyotiklere uyarlanabilir (Swanson ve ark., 2020).

1.3. Çikolata

Türk Gıda Kodeksi Kakao ve çikolata rnleri Tebliği'ne göre (Tebliğ No: 2017/29) ikolata, kakao ürünleri ile şekerlerden elde edilen, en az % 18 kakao yağı ve en az %14 yağsız kakao kuru maddesi içeren toplam kakao kuru maddesi içeriği en az % 35 olan ürünü olarak tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi [TGK], 2017). Çikolata, kakao türevleri (*Theobroma cacao* L.), süt ürünleri, şekerler ve/veya tatlandırıcılar ve katkı maddelerinin karışımından elde edilen homojen ürünlerin genel adıdır. ikolatanın kakao içeriği çikolatanın türüne göre değişir (sütlü çikolata için en az %25 ve bitter çikolata için en az %35). Un, nişasta ve hayvansal yağlar dışındaki diğer bileşenler, farklı çikolata ürünleri oluşturmak için eklenebilir (Jeyarani, ve ark., 2015).

Sükroz, tatlılık sağlamak, kakao aromasını geliştirmek, koruyucu etkiler sağlamak ve hacim arttırıcı bir madde olarak çikolata formülasyonunun %40-50'sine katkıda bulunur (Aidoo ve ark., 2013). Sükroz tüketimindeki küresel artışla ilişkili obezite ve diyabet gibi olumsuz sağlık sorunlarına ilişkin artan farkındalık (Van de Walle ve ark., 2018), araştırmacıları 'sakkarozsuz' çikolata fırsatlarını keşfetmeye yöneltmiştir. ikolatada kullanılan yaygın sükroz ikame maddesi türleri, alternatif tatlandırıcı ve hacim arttırıcı maddelerdir. Stevia ve aspartam gibi yüksek etkili tatlandırıcılar, sükrozdan yüzlerce ile binlerce kat daha yüksek bir tatlılık seviyesi sağlar, ancak hacim oluşturma yetenekleri yoktur. Öte yandan, inülin ve maltodekstrin gibi hacim arttırıcı maddeler, tatlılık üzerinde sınırlı bir etkiyle çikolatanın yapısını, dokusunu ve ağızda bıraktığı hissi iyileştirebilir (Aidoo ve ark., 2013). Sükrozun çok işlevli özelliklerini değiştirmek için yüksek etkili tatlandırıcıların ve hacim arttırıcı maddelerin optimum kombinasyonu, sakkarozsuz çikolata geliştirmek için bir ilgi alanıdır ve önceki çalışmalarda bazı umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Aidoo ve ark., 2015; Farzanmehri ve Abbasi, 2009) ayrıca düşük kalorili ürün elde etmek için uygun fiziksel, reolojik ve dokusal özellikler sağlayabildiği gösterilmiştir (Aidoo ve ark., 2013; Meyer ve ark., 2011; Nebesny ve ark., 2007).

Dünya ikolata ticareti, her yıl artan kakao çekirdeği talebiyle (2011-2012'de 4,1 milyon tondan 2019–2020'de 4,7 milyon tona; ICCO, 2021) 130,6 milyar ABD Doları değerinde olan ve gün geçtikçe de (Grand View Research, 2020) büyüyen bir pazardır. ikolatanın dünyadaki popülaritesi, ağdaş tüketicinin sağlıkla ilgili yüksek farkındalığıyla birleştiğinde hızla artmakta ve farklı çikolata türlerinin probiyotiklerle zenginleştirilmesi fikri yüksek pazar talebi haline gelmektedir (Min ve ark., 2019).

Çikolatanın popülaritesi çoğunlukla yüksek duyusal kabul edilebilirliği ve olumlu duygular ile ilişkili olmasından kaynaklanmaktadır. Çikolata, geniş bir tüketici yelpazesini tatmin eder; ancak çikolatanın probiyotikleri taşımak için gıda matrisi olarak kullanılması kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır (Min ve ark., 2019). Bu nedenlerle bu çalışmada çikolata tercih edilmiştir.

Yeni probiyotik çikolata ürünlerine ilişkin yayınların çoğu kapsülleme tekniklerine odaklanmaktadır (Kemsawasd ve ark., 2016; Mirkovic ve ark., 2018; Nambiar ve ark., 2018). Hem serbest hem de kapsüllenmiş probiyotiklerin taşıyıcı olarak çikolata ve çikolata bazlı ürünlere dahil edilebilmesi, probiyotik içeren popüler başlıca fermente süt ürünlerine çikolatanın mükemmel bir alternatif olabileceğini göstermiştir (Ranadheera ve ark., 2018). Kapsüle edilmiş probiyotiklerin çikolata matrisinde canlılıklarını sürdürmeleri açısından çok etkili görünmektedir (Silva ve ark., 2017).

1.4. İnülin

İnülin, 3 ile 60 arasında değişen derecelerde polimerizasyona sahip, ortalama 10 fruktoz birimi, β – 2, 1 bağlantıları ile birleştirilmiş ve bir glikoz birimi ile biten fruktoz polimeridir (Aidoo ve ark., 2013). İnülinin zincir uzunluğu ve yapısı çözünürlüğünü, tatlılığını ve viskozitesini etkiler. İnülin, doku sağlar ve kalorileri düşüktür (nihai üründe 1–1,5 kcal/g). İnülin, yalnızca jelleşme özelliklerinden dolayı değil, aynı zamanda diyet lifi olarak besleyici ve sağlıkla ilgili yararları nedeniyle birçok fonksiyonel fayda sağlar (Roberfroid, 2005). İnülinin çikolatada teknolojik kullanımı, şeker ikamesi ve doku değiştirici özelliklerine dayanmaktadır (Meyer ve ark., 2011). Bir şeker ikamesi olarak inülin, genellikle düşük kalorili çikolatalardaki ağız hissi ve doku gibi sükrozun fonksiyonel özelliklerini taklit etme yeteneğine sahiptir. İnülin aynı zamanda kolona bozulmadan ulaşarak bağırsaktaki faydalı mikroorganizmalar için prebiyotik işlev görmek ve konakçıya sağlık yararı sağlamaktadır (Ahmed ve Rashid, 2019; Sanders ve ark., 2019; Wilson ve Whelan, 2017).

1.5. Stevia

Stevia, *Stevia rebaudiana* bitkisinden ekstrakte edilen yüksek etkili bir tatlandırıcıdır. Sıfır kalori ile sükrozun 200-300 katı tatlılığa sahiptir. Bununla birlikte, stevia hacim oluşturma kabiliyetinden yoksundur (Aidoo ve ark., 2013), bu nedenle sükrozun

fonksiyonel rolünün yerini alması için bir hacim arttırıcı madde ile birleştirilmesi gerekir. Stevia'nın ADI'si (Günlük alınmasına izin verilen miktar) 4 mg/kg vücut ağırlığı/gündür (Perrier ve ark., 2018). Bu değerlendirmeler göz önüne alındığında çikolata üretiminde daha sağlıklı bir ürün elde etmek amacıyla şeker yerine inulin ve stevia kullanılmıştır.

1.6. Enkapsülasyon

Kapsülleme, probiyotiklerin işleme, depolama ve ayrıca gastrointestinal sisteminde dayanıklılığını artıran en basit ve etkili tekniklerden biridir (Afzaal ve ark., 2019). Kapsülleyici matrislerin seçimi ve uygun bir kapsülleme tekniğinin belirlenmesi, hedeflenen probiyotiklerin başarılı bir şekilde uygulanması için esastır. Çikolata üretimindeki ana bileşenlerden biri olan kakao tozu, aljinat veya fruktooligosakkarit (FOS) ile birlikte iyi bir kapsülleyici karışım oluşturabilmektedir. Bu karışım probiyotikleri kapsüllemek için uygun protein, polisakkarit ve lipid bileşimi içerir (Oracz ve ark., 2020; Sorrenti ve ark., 2020). Ayrıca çikolata fonksiyonel bir gıda ürünü olarak kabul edilir ve antioksidan özellik gösteren polifenoller başta olmak üzere flavonoller (-)-epikateşin (EC), (+)-kateşin ve bunların dimerleri prosiyanidinler B1 içerir (Socci ve ark., 2017; Davinelli ve ark., 2018; Martín ve Ramos, 2016). Bu nedenle, çikolata ürünlerinde kapsüllenmiş probiyotiklerin kullanılması tüketiciler için ek besinsel faydalar sağlayabilir. Ayrıca, dondurarak kurutma, probiyotik kapsülleme için en iyi kurutma yöntemi olarak kabul edilebilir (Ch'avez ve Ledebøer, 2007). Bu tekniğin maliyeti, nihai kapsüllenmiş probiyotiklerin en iyi kalitesiyle karşılanabilir (Pech Canul ve ark., 2020). Bu nedenle, bu çalışma dondurularak kurutma yöntemi kullanılarak kapsüllenmiş *S. boulardii*'nin depolama ve in vitro gastrointestinal geçiş sırasında çikolatada canlılığının değerlendirilmesine odaklanacaktır. Ayrıca çikolatada sakkarozsuz çikolata geliştirmek amaçlanmıştır. Ek olarak, gastrointestinal geçiş sırasında yağ asitleri üretimi de değerlendirilecektir. Fonksiyonel gıda pazarını çeşitlendirmeyi amaçlayan bu çalışma, potansiyel fonksiyonel özelliklere sahip çikolata geliştirmeyi ve karakterize etmeyi amaçlamaktadır. Bunun için sağlık açısından faydaları daha önce araştırmalarla kanıtlanmış ve kefirde yeni izole edilen probiyotik özellikleri belirlenmiş *S. boulardii* kullanılmıştır.



2. MATERİYAL VE METOT

2.1. Materyal

Analize alınan 19 ev yapımı doğal çökelek peyniri, karın kaymağı peyniri, tereyağ, kefir, yoğurt, tel peyniri, mantar turşusu, salatalık turşusu, lahana turşusu, fasulye turşusu, taflan turşusu, yabandağı alıcı sirkesi, Trabzon hurması sirkesi, ekşidağ elması sirkesi, kırmızı pancar lahana havuç biber sirkesi, elma sirkesi, üzüm sirkesi, çiçek balı sirkesi ve dağ kızılcığı sirkesi örneklerinden farklı koloni özelliği gösteren 85 suş izole edilmiştir. Tüm örnekler Sakarya ilinden temin edilmiştir. Ev ortamında geleneksel yöntemler ile yapılan, katkısız örnekler tercih edilmiştir. *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *B.cereus*, *C. sakazakii* ATCC 29544, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923, *S. Typhimurium* ATCC 140828 patojenleri Gıda Mühnedisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Çikolata yapımında kakao tozu, kakao yağı, inülin, stevia (Merck, Almanya) ve lesitin (Sigma aldrich, Almanya) kullanılmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. Örneklerden mayaların izolasyonu

Yapılan literatür taramalarından alınan sonuçlar doğrultusunda probiyotik mayaların izolasyonu için Oxytetracyclin-Glucose-Yeast Extract Agar Base (OGYEA) ortamı tercih edilmiştir. pH'sı laktik asit ile 2-3'e düşürülen 90 ml Sabourand %2 dextrose broth (SDB) ortamına, örneklerden 10 g aktararak 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 3 gün 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. 3. günün sonunda SDB ortamında zenginleştirmesi yapılan örneklerin 1'er ml'si, içerisinde steril 9'ar ml fizyolojik tuzlu su bulunan tüplere steril pipetler yardımı ile alınarak 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 'lik seyreltmeler hazırlanmıştır. Yapılan her seyreltmeden 1 ml alınarak dökme plaka yöntemi ile içerisinde OGYE agara ekimler yapılarak ve 27 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda en iyi gelişim gösteren maya kolonilerinden saf kültürler elde etmek için OGYE Agar'a çizgi ekimleri yapılarak 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen saf kültürler, SDB

ortamında geliştirilerek ve uzun süre saklanabilmesi için %20'lik steril gliserol içeren ependorf tüplerine (800 µL aktif izolat + 200 µL gliserol) aktararak ve -60 °C'de muhafaza edilmiştir (García-Hernández ve ark., 2012). Çeşitli ürünlerden izole edilerek saflaştırılan maya suşlarının hücre şekli ve mikroskopik görüntüsü incelenmiştir. Ek A'da mayaların mikroskop görüntüleri verilmiştir. Elde edilen mayaların probiyotik özelliklerini belirlemek için ise aşağıdaki testler uygulanmıştır.

2.2.2. 37 °C sıcaklığa ve pH 2.0'a mayaların toleransının belirlenmesi

İzolatlar Ramos ve ark. (2011) yöntemine göre pH 2.0 ve 37 °C'ye tolerans testlerine tabi tutulmuştur. İleri çalışmalar için dirençli izolatları seçmek amacıyla. 24 saat 30 °C'de SDB besiyerinde yetiştirilen maya hücreleri santrifüj edilerek (4 °C'de 5 dakika 5000 rpm) ve SDB besiyerinde yeniden süspanse edilmiştir. 1 N HCl kullanılarak pH 2.0'a ayarlanmış ve 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. pH 2.0 ve 37 °C'de büyüme gösteren izolatlar, seçilmiştir.

2.2.3. Mayaların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi

Hemolitik aktivite, 37 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra % 5 defibrin koyun kanı içeren kanlı agar plakalarına maya suşlarının inokülasyonu ile belirlenmiştir. Koloniler çevresinde berrak bir hidroliz bölgesinin gelişmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Yeşil renkli zon oluşturanlar (α -hemoliz) veya herhangi bir etki oluşturmeyenler (γ hemoliz) hemolitik olmayan koloni olarak kabul edilmiştir. Koloni etrafındaki zon bölgelerini gösteren suşlar (β hemoliz) hemolitik olarak sınıflandırılmış ve probiyotik kullanımı için seçilmemiştir (Pieniz ve ark., 2014).

2.2.4. Mayaların gastrointestinal koşullarda hayatta kalma kapasitesinin belirlenmesi

2.2.4.1. Mayaların mide sıvısı ortamında hayatta kalma kapasitesinin belirlenmesi

Mayaların mide sıvısı ortamında hayatta kalma yetenekleri belirlenmiştir (Bonatsou ve ark., 2018). pH 2.0'da (pH, 1 M HCl ile ayarlandı) bir tampon çözeltide, [(NaCl (2.05 g / L), KH₂PO₄ (0.60 g / L), CaCl₂ (0.11 g / L) ve KCl (0.37 g / L)] içeren sentetik mide suyu hazırlanmıştır. Ortamın sterilizasyonundan sonra gastrik çözeltiyi elde etmek için pepsin (0.0133 g / L) ve lizozim (0.01 g / L) eklenmiştir. Maya kültürlerinin PDA'de (25 °C'de 24 saat) büyümesi sağlanıp, TSB yeast sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra santrifüjlenmiştir (5000 g, 10 dk, 4 °C) ve çökeltiler iki kez steril% 0.9 (ağırlık

/ hacim) NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır ve steril % 0.9 (ağırlık / hacim) NaCl'de tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Daha sonra, hücreler gastrik çözeltide tekrar süspansiyon haline getirilerek, OD (Optik dansite) değeri 0.5 ($\lambda = 600 \text{ nm}$)'ye eşitlenmiş ve peristaltik hareketleri simüle etmek için 200 rpm'de orbital çalkalayıcıda 2.5 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Örneklerin mide sıvısı ortamında hayatta kalma yüzdeleri sayım yapılarak hesaplanmıştır.

2.2.4.2. Mayaların pankreatik sıvı ortamında hayatta kalma kapasitesinin belirlenmesi

Mayaların pankreatik sıvı ortamında hayatta kalma yetenekleri belirlenmiştir (Bonatsou ve ark., 2018). pH 8.0'da (1 M HCl ile ayarlanmış), safra tuzları (3.0 g / L), pankreatin (0.1 g / L), Na_2HPO_4 (26.9 g / L) ve NaCl (8.5) ile formüle edilmiş bir tampon çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bonatsou ve ark., 2015.) Bir önceki gastrik sindirim adımından toplanan hücreler santrifüjlenerek, iki kez steril %0,9'luk NaCl çözeltisinde yıkanmış ve simüle pankreas sıvısı solüsyonunda süspanse edilmiştir. Süspansiyonun çalkalanmasından sonra (200 rpm, 37 °C'de 3.5 saat), çökelti %0.9'luk NaCl çözeltisinde yıkanmıştır. PDA kültür ortamı üzerinde 25 °C'de 2 gün inkübe edilerek her sindirim simülasyonunun başında ve sonunda hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Örneklerin pankreatik sıvı ortamında hayatta kalma yüzdeleri hesaplanmıştır.

2.2.5. Mayaların biyofilm oluşturma özelliklerinin belirlenmesi

Biyofilm oluşturma yeteneği, Kopit ve ark. (2014) tarafından açıklanan yöntemde küçük değişiklikler yapılarak değerlendirilmiştir. Suşlar Brain Heart Infusion (BHI) broth içinde 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre süspansiyonu (200 μL) ve BHI broth (1800 μL) olarak hazırlanmıştır. Tek başına 2000 μL BHI negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Suşların 37 °C'de 24 saat büyütülmesinden sonra, 2000 μL fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmış ve kuruması için 30 dakika 55 °C'de ters çevrilerek kurutulmuştur. 2000 μL %1 kristal viyole ile boyanmıştır. Daha sonra kuyucuklar iki kez PBS ile yıkanarak 30 dk 55 °C'de tekrar kurutulmuştur. 2000 μL aseton ve etanol solüsyonu (20:80, hacim/hacim) eklenmiştir ve 1,5 dakika beklendikten sonrada OD belirlenmiştir. Cut-off OD (OD_c), negatif kontrolün ortalama OD'sinin üzerinde 3 standart sapma olarak tanımlanmıştır. Biyofilm oluşturma yeteneği Pieniz ve ark. (2015) yöntemine göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar $\text{OD} \leq \text{OD}_c$ biyofilm üreticisi olmayan (-), $\text{OD}_c < \text{OD} \leq 2 \text{OD}_c$ zayıf biyofilm üreticisi

(+), $2 \text{ ODc} < \text{OD} \leq 4 \text{ ODc}$ orta düzeyde biyofilm üreticisi (++) ve $\text{OD} \geq 4 \text{ ODc}$ güçlü biyofilm üreticisi (+++) olacak şekilde değerlendirilmiştir.

2.2.6. Mayaların enzimatik aktivitelerinin belirlenmesi

Mayaların enzimatik aktivitesi kalitatif testler kullanılarak yapılmıştır. Suşlar başlangıçta OGYE agar ortamında geliştirilmiş ve daha sonra her test ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar nitel olarak zon oluşumu veya büyüme olmayan (-), zon veya koloni çapı $< 3 \text{ mm}$ (+), zon veya koloni çapı $> 3 \text{ mm}$ (++) olacak şekilde değerlendirilmiştir.

2.2.6.1. Mayaların katalaz aktivitesi

Tüm maya izolatları OGYEA ortamında büyütüldükten sonra, üzerlerine %3,0 'lük H_2O_2 damlatılmış ve kabarcık oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Perricone ve ark., 2014).

2.2.6.2. Mayaların proteaz aktivitesi

Proteaz aktivitesi için 10 g skim milk, 1 g glikoz, 5 g pepton, 2,5 g yeast extract, 15 g agar ile 1 litre besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan agar üzerine ekilen maya izolatlarının 30°C 'de 48 saat inkübasyon sonunda oluşturdıkları kolonilerinin etrafında berrak zon oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Atlas, 2006).

2.2.6.3. Mayaların esteraz aktivitesi

Esterleri hidroliz etme yeteneklerini belirlemek için 10 g tween 80 (polyoxyethylen-sorbitanmonooleate), 5 g NaCl, 01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 g pepton, 20 g agar hazırlanarak pH 6 olacak şekilde 1 litre besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan agar üzerine ekilen maya izolatlarının 30°C 'de 48 saat inkübasyon sonunda oluşturdıkları kolonilerin etrafında berrak zon oluşumu olanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Omemu ve ark., 2007).

2.2.6.4. Mayaların amilaz aktivitesi

5 g nişasta, 5 g pepton, 5 g yeast ekstrakt, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g NaCl, 20 g agar ve 1000 ml distile su ile besiyeri hazırlanmış ve 121°C 'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri, izolatların amilaz aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra (5 gün boyunca 30°C), besiyerleri iyot çözeltisi ile sulandırılmış ve koloninin etrafında kahverengi bir rengin ortaya çıkması pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Gram iyodür boyası için 7 g iyot, 3 g KI ve 100 ml distile su kullanılmıştır. Potasyum iyodür ile iyot kristali havanda

iyice ezilip toz haline getirilmiş, yavaşca distile su ilave edilmiştir ve filtre kağıdından süzülerek kahverengi şişeye konularak amilaz enzim taramasında kullanılmıştır (Yalçın ve Çorbacı, 2013).

2.2.6.5. β -Glukozidaz aktivite

Arbutin 5 g, yeast ekstrakt 10 g, demir klorür 200 mg, agar 15 g olacak şekilde hazırlana karışım 1 litre distile suda tamamen çözününceye kadar karıştırılmış ve 121 °C’de 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri, izolatların β -glukosidaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmıştır (Strauss ve ark., 2001).

Saf maya izolatları β -glukosidaz aktivite ortamına inoküle edilmiş ve 2 gün 27 °C ’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda büyüme varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Perricone et al., 2014). Substrat olarak arbutin kullanılmıştır.

2.2.7. Mayaların hidrokarbonlara tutunma aktivitelerinin belirlenmesi

Maya izolatlarının hidrokarbonlara tutunması Zárate ve ark. (2000)’nın yöntemine göre belirlenmiştir. İzolatlar, TSB yeast sıvı besiyerlerinde 37 °C’de 48 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler, 9000 rpm’de 15 dakika santrüfuj edilmiş ve elde edilen pelletler, % 0,9’luk NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır ve 0,1 M KNO₃ (pH 6,2) tamponu içinde tekrar çözülerek ve spektrofotometrede OD’si 600 nm’de 0,6±0,02’ye ayarlanmıştır (OD₁). Maya süspansiyonundan 2 mL alınarak, 0,5 mL p-ksilen (polar olmayan nötral çözücü), kloroform (monopolar asidik çözücü), etil asetat (monopolar bazik çözücü) hidrokarbonlarının üzerine konularak, oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakikalık ön inkübasyondan sonra ayrılan iki faz 2 dakika vorteks ile karıştırılarak tekrar oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra sulu fazın OD’si spektrofotometrede 600 nm’de ölçülmüştür (OD₂). Maya izolatlarının hidrokarbonlara mikrobiyal tutunma aktivitesi, aşağıdaki eşitlik (1) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hidrofobisite} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100 \quad (1)$$

OD₁=Maya kültürlerinin optikal dansitesini gösterirken, OD₂= karışık kültürün 4 saat sonundaki optikal dansitesini göstermektedir.

Bu yöntem hidrokarbonların eklenmesiyle çözücü katmanının ve sulu katmanın ayrılmasına ve ardından hücrelerin sulu katmanda veya solvent katmanında

yapışmasına dayanır. Bu, suşların insan bağırsağındaki bağırsak epiteline tutunma kabiliyeti ile ilgilidir.

2.2.8. Mayaların % otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Mayaların % otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi Collado ve ark. (2008) metoduna göre yapılmıştır. Maya izolatları SDB sıvı besi ortamında 37 °C’de 48 saat inkübe edilerek aktiveleştirildikten sonra 9000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen maya pelleti iki defa fosfat tamponu (PBS; %0,02 KCl, %0,144 K₂HPO₄, %0,8 NaCl, %0,024 KH₂PO₄, pH:7,0) ile yıkandıktan sonra aynı tampon içinde tekrar çözündürülmüştür. Elde edilen çözeltinin optikal yoğunluğu spektrootometrede 600 nm’de 0,6±0,02’ye ayarlanmıştır. Çözelti oda sıcaklığında 2, 4 ve 24 saat bekletildikten sonra çözeltinin üst kısım fazından 0,1 mL alınarak, OD’si spektrofotometrede 600 nm’de okunarak ve aşağıdaki formül (2) kullanılarak maya izolatlarının otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{Otoagregasyon} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100 \quad (2)$$

OD₁: İlk optikal dansite, OD₂: 2, 4 ve 24 saat sonraki optikal dansiteyi göstermektedir.

2.2.9. Mayaların % koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Maya izolatlarının *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşları ile koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi Rinkinen ve ark. (2003) yöntemine göre yapılmıştır. İzolatlar, SDB sıvı besi ortamlarında 37 °C’de 48 saat inkübe edilerek aktiveleştirilmiştir. Aktif kültürler, 9000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek, elde edilen maya pelletleri iki defa fosfat tamponu (PBS, pH 7,0) ile yıkandıktan sonra, aynı tampon içinde tekrar çözündürülmüştür. Her bir örneğin OD’si spektrootometrede 600 nm’de 0,6±0,02’ye ayarlanmıştır. Eşit miktarlardaki maya kültürü (2 ml) ile test bakteri örnekleri (2 ml) aynı tüp içinde 10-15 saniye vortex ile karıştırılarak, oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası kültür karışımlarının üst kısmından 0,1 mL alınarak, OD değerleri 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kültürlerin koagregasyon yüzdeleri aşağıdaki formüle (3) göre hesaplanmıştır.

$$\%Koagragasyon = \frac{ODA + ODB - 2ODC}{ODA + ODB} \times 100 \quad (3)$$

OD_A: Maya kültürlerinin optikal dansiteyi, OD_B: Test bakterilerin optikal dansitesini, OD_C: Karışık kültürün 24 saat sonundaki optikal dansitesini göstermektedir.

2.2.10. Mayaların antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi

Maya suşlarının antagonist aktivitesi, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *B.cereus*, *C. sakazakii* ATCC 29544, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923, *S. Typhimurium* ATCC 140828 kültürleri kullanılarak kuyu difüzyon testi (Nejati ve Oelschlaeger, 2016) ile tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteyi test etmek için, izole edilmiş probiyotik maya suşları TSB yeast sıvı besiyerinde 25 °C'de 48 saat geliştirilmiştir. Gelişen maya kültürleri, 4 °C'de 20 dakika boyunca 9000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar, hücre artıklarını çıkarmak için 0.22 mm'lik bir filtreden (Millipore, Fransa) süzülmüştür. NaOH solüsyonu (1.0 N) hazırlanmış ve maya süpernatantının pH'sı 7'ye ayarlanmıştır. Antibakteriyel aktivitenin sekonder metabolitlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını analiz etmek için peptitleri denatüre etmek amacıyla proteinaz K (100µg ml⁻¹) ilave edilmiş ve 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Süpernatant, yukarıda belirtilen patojenlere karşı antagonistik aktivite açısından test edilmiştir. Patojenler Muller Hinton agar (Becton, Dickinson & Co., ABD) içinde yayılmıştır. Agar içine 3 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Filtre ile sterilize edilmiş süpernatantın 30 µl'lik alikotları ayrı ayrı oyuklara dağıtılmıştır. Plakalar 2 saat 4 °C'de ve ardından 12 saat 37 °C'de inkübe edilmiş ve inhibisyon bölgelerinin çapları ölçülmüştür.

2.2.11. Mayaların antibiyotiğe dirençlerinin belirlenmesi

Antibiyotik toleransı testi için seçilen maya suşları TSB yeast'de 25 °C'de 24 saat aktive edilmiştir. Önceden hazırlanmış OGYE agar içeren petrilere üzerine aktif kültürlerden yoğunlukları 2 McFarland (6 x 10⁸ kob/ml) bulanıklığına eşdeğer olacak şekilde ayarlanarak petrilere 100 µL ilave edilerek yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), kloramfenikol (30 µg), amoxicillin (20 µg), ampicillin (10 µg), trimethoprim (5 µg) ve tetrasiklin (30 µg) (Oxoid) antibiyotik diskleri kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Petrilere 25 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk etrafında oluşan zonlar milimetrik olarak ölçülmüştür. Maya izolatlarının

antibiyotiklere karşı gösterdiği dirençlilik özelliklerine ait sonuçlar değerlendirilirken Dirençli (R), Orta Duyarlı (I) ve Duyarlı (S) olmak üzere gruplandırılarak verilmiştir (Syal ve Vohra 2013). Elde edilen sonuçlar Clinical and Laboratory Standards Institute kriterlerine göre değerlendirilmiştir (CLSI, 2015)(Tablo 2.1.)

Tablo 2.1. Antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi.

Antibiyotik Adı	İnhibisyon Zon Çapı (mm)		
	R (Dirençli)	I (Orta Duyarlı)	S (Duyarlı)
Eritromisin (15 µg)	≤13	14-17	≥18
Gentamisin (10 µg)	≤12	13-14	≥15
Kloramfenikol (30 µg)	≤13	14-17	≥18
Amoxicillin (20 µg)	≤11	12-18	≥18
Ampisillin (10 µg)	≤13	14-16	≥17
Trimethoprim (5 µg)	≤10	11-15	≥16
Tetrasiklin (30 µg)	≤14	15-18	≥19

2.2.12. Mayaların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

2.2.12.1. Bozulmamış hücrelerin ve hücre içi serbest ekstraktlarının antioksidan aktivite potansiyeli

Bozulmamış hücreler ve hücre içi serbest ekstraktlarının olacak şekilde mayaların antioksidan aktiviteleri iki şekilde ölçülmüştür. Bozulmamış hücrelerin antioksidan aktivitelerini ölçmek için TSB yeast’de 25 °C’de 24 saat inkübe edilen mayalar önce santrifüjlenmiştir (5000g, 10 dakika, 4 °C). Elde edilen peletler daha sonra iki kez PBS tamponunda (pH 7.4, OD600nm 0.400±0.05) yıkanmış ve yeniden süspanse edilmiştir. Hücre içi serbest ekstraktlarının antioksidan aktivitesini ölçmek için bozulmamış hücre süspansiyonu ultrasonik olarak parçalanmıştır (37 kHz’de 30 dakika). Hücreler daha sonra santrifüjleme (5000g, 10 dakika, 4 °C) ile ayrılmış ve elde edilen süpernatantlar hücre içi serbest ekstrakt olarak değerlendirilmiştir (Cizeikiene ve Jagelaviciute 2021)

Mayaların antioksidan aktivitesi DPPH yönetimine göre belirlenmiştir (Son ve ark., 2018). Kısaca bozulmamış hücreler ve hücre içi serbest ekstraktlar (2 ml), 2 ml taze hazırlanmış DPPH (metil alkolde 0.2 mM) ile karıştırılarak 30 dakika karanlıkta tutulmuş ve santrifüjlenmiştir (5000g, 10 dakika). Elde edilen süpernatanın absorbansı

517 nm'de ölçülmüştür. Kontrol olarak numune yerine mayasız hazırlanan örnekler kullanılmıştır. DPPH radikal süpürme yeteneği aşağıdaki formüle (4) göre belirlenmiştir.

$$\% \text{ DPPH} = 1 - \frac{\text{OD}(\text{Örnek})}{\text{OD}(\text{Kontrol})} \times 100 \quad (4)$$

2.2.13. Mayaların MALDITOF MS ile tanımlanması

Mayaların tanımlanması, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda hizmet alımı ile yapılmıştır. Mayaların tanımlanmasında MALDITOF Bruker Microflex serisi (Bruker Daltonics, Inc., Bremen, Germany) kullanılmıştır. Bu amaçla doğrudan koloni yöntemi kullanılmıştır. YGC Agarda geliştirilen maya izolatlarından tek koloni alınarak 96'lı plakadaki hedef noktaya spiral şeklinde sürülmüştür. Yüzde 70'lik formik asit ile hazırlanan 10 mL stok çözeltiden 1 µL damlatılarak ve oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Sonra örneğin üzerine 1 µL matriks (α -siyano-4-hidroksisinnamik asit %50 asetonile ve %1,5 trifloroasetik asit içinde) damlatılarak ve tekrar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Hazırlanan spotlar analiz için cihaza yüklenmiştir. Hazırlanan örneklerle, MicroFlex LT kütle spektrofotometresi (Bruker Daltonics, Inc., Bremen, Almanya) uygulanarak sonuçlar otomatik olarak üretici tarafından ayarlanmış olan MALDI Biotyper 3.0 software (yazılımı) ile analiz edilmiştir. Skor tanımlaması ($< 1,7$) küçük ise analiz tekrarlanmıştır (Cheng ve ark., 2013).

2.2.14. İzole edilen mayaların 18S-28S rRNA ile tanımlanması

Kültürde üretilen maya izolatlarının DNA izolasyonu EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak biorobot EZ1 DNA izolasyon cihazı (Qiagen, Almanya) ile yapılmıştır. Elde edilen DNA, ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir (Leaw ve ark., 2007). İlgili primerlerle elde edilen PCR ürünleri ITS 1- 5.8S rRNA genini ve ITS 2- 18S ve 28S rRNA genlerinin parsiyel bölgelerini kapsamaktadır. Amplikonların dizi analizi Bigdye Terminator V3.1 cycle sekanslama kiti kullanılarak ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında yapılmıştır. Elde edilen diziler "National Center for Biotechnology Information Database'de (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) yer alan BLAST (Basic Local Alignment Tool) sunucusu kullanılarak veri bankasında kayıtlı diğer izolatlarla karşılaştırılmıştır.

2.2.15. Dondurarak kurutma ile probiyotiklerin kapsüllemesi ve kapsülleme verimliliği

Kapsülleyici malzemeler, kapsülleyicilerin en iyi kombinasyonlarını belirlemek için yapılan literatür çalışmalarına dayalı olarak kakao tozu: Na aljinat (Sigma aldrich, Almanya): FOS (Sigma aldrich, Almanya) (10:1:1) kapsülleme formülasyonu oranlarında hazırlanmıştır (Hossain ve ark., 2021b,c).

Probiyotik maya seçici bir Tryptic Soy Broth (Merck, Almanya)-yeast ortamında 27 °C'de 3 gün aerobik olarak inkübe edilmiştir. Daha sonra soğutulmalı bir santrifüjde 5000 x g'de, 4 °C'de 15 dakika santrifüjleme yoluyla toplanmıştır. Probiyotikler, %0.85 fizyolojik tuzlu su solüsyonu ile iki kez yıkanıp ve Hossain ve ark. (2021b,c) yöntemiyle kapsüllenmiştir.

Hazırlanan probiyotik suş, dondurularak kurutma tekniği kullanılarak kapsüllenmiştir. Kapsülleme formülasyon bileşenleri, Milli Q su içerisinde çözündürülerek, ardından bir homojenleştirici (IKA T25 dijital Ultraturrax, Almanya) kullanılarak 15 dakika 10000 rpm'de homojen hale getirilmiş ve karışım daha sonra tam hidrasyon için 2 saat oda sıcaklığında tutulmuştur. Formülasyon karışımı 75 °C'de 30 dakika su banyosunda pastörize edilerek ve 42 °C'ye soğutulmuştur (Gebara ve ark., 2013).

Elde edilen hücre peletleri (yaklaşık 12 log kob/g) formülasyon içinde süspanse edilmiş ve 5 dakika 4000 rpm'de homojen hale getirilmiştir. Homojenat daha sonra, kapsülleyici biyopolimerler ve probiyotikler arasındaki etkileşime izin vermek için oda sıcaklığında 1 saat bırakılmıştır (de Araújo Etchepare ve ark., 2020). Nihai homojenleştirilmiş karışım, 50 ml'lik steril falkon tüplerine (her biri 35 mL) dağıtılarak ve gece boyunca -20 °C'de dondurulmuştur. Dondurulmuş numuneler, bir dondurarak kurutucu (Labconco Freezone 6) kullanılarak -50 °C'de dondurularak kurutulmuştur. Dondurularak kurutulmuş kapsüllü probiyotikler kullanılabildiği kadar 4 °C'de saklanmıştır. Yüzde kapsülleme verimliliği (% KV), aşağıdaki denklem (5) kullanılarak hesaplanmıştır (de Araújo Etchepare ve ark., 2020).

$$\%KV = \frac{A}{A0} \times 100 \quad (5)$$

Burada A, kapsüllemeyi takiben canlı kültürlerin sayısı (log kob/g) ve A0, kapsüllemeyi önceki canlı kültürlerin sayısıdır (log kob/g).

2.3. Probiyotik Çikolata Özellikleri

2.3.1. Çikolatanın hazırlanması

Çikolata %39,76 kakao kütlesi, %41,85 kakao yağı, %14,80 inülin, %1,60 steviosid ve %0,15 soya lesitini karıştırıldıktan sonra temperleme işlemi uygulanarak hazırlanmıştır (Lim ve ark., 2021; Hinneh ve ark., 2019). Kapsüllenmiş probiyotik, önerilen en iyi sıcaklıkta (45 °C) %1 (w/w) konsantrasyonda (Gadhiya ve ark., 2018; Kemsawasd ve ark., 2016) katılaşmaya yakın çikolataya eklenmiştir. Nihai ürünlerde en az 10^7 log kob/g canlı probiyotik sayısı olmalıdır (Dong ve ark., 2013). Kapsüllü probiyotiklerle zenginleştirilmiş çikolata (probiyotik çikolata) ve kontrol (kapsülsüz probiyotikli çikolata) 25 °C ve 4 °C'de aseptik koşullarda 120 gün süreyle saklanmıştır (Hossain ve ark., 2022).

2.3.2. Nem tayini

Nem içeriği analizi, 120 günlük depolamadan önce ve sonra gerçekleştirilmiştir. Çikolatanın nem içeriği, Association of official analytical chemists (AOAC) (2000) 931.04 yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Her numuneden 2,0 g hassas bir şekilde tartılıp, ardından 100 °C'de 24 saat boyunca bir konveksiyon fırınında kurutulmuştur. Ağırlık kaybı hesaplanarak ve nem içeriği yüzdesi olarak rapor edilmiştir

2.3.3. Sertlik

Numuneler 120 günlük depolamadan önce ve sonra Brookfield CT3 cihazında sertlik analizi yapılmıştır. Çikolatanın sertliği, Biswas ve ark. (2017) yöntemine göre yapılmıştır. Sertlik, her bir çikolata numunesi için beş farklı lokasyonda ölçülerek ve ortalama sertlik ve standart sapma hesaplanmıştır.

2.3.4. Çiçek oluşumu

Numuneler 120 günlük depolama boyunca 2 haftada bir çiçek oluşumu görsel olarak incelenmiştir. Çikolata yüzeyindeki çiçeklenme oluşumu, Kinta ve Hartel (2010) tarafından modifikasyonlarla açıklanan yöntemler izlenerek bir stereomikroskop (Leica EZ4 E, Leica Microsystem Ltd., Wetzlar, Almanya) kullanılarak kaydedilmiştir. Her numune için üç mikroskobik görüntü alınmıştır.

2.3.5. pH ve Su Aktivitesi (a_w) ölçümü

Çikolatalardaki pH değişimleri pH metre (HI 9125, Hanna Instruments, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Su aktivitesi (a_w), su aktivitesi ölçer (Aqualab marka

Series 3TE) kullanılarak belirlenmiştir. Bu iki parametrenin analizleri, probiyotiklerin canlılığını ve performanslarını doğrudan etkileyebileceğinden, 30 gün aralıklarla 120 günlük tüm saklama süresi boyunca gerçekleştirilmiştir (Kobus Cisowska ve ark., 2019).

2.3.6. Çikolata ile karıştırılmadan önce ve sonra kapsüllenmiş probiyotiklerin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi

Dondurularak kurutulmuş kapsüllenmiş *S. boulardii* ve kapsüllenmemiş probiyotik çikolataların mikro yapısını incelemek için bir taramalı elektron mikroskobu (SEM, Phenom Pro, Thermo Fisher Scientific, Hollanda) kullanılmıştır. Dondurularak kurutulmuş toz partikülleri, her iki tarafı yapışkan karbon bant kullanılarak bir alüminyum çubuk üzerine monte edilerek ve fazla toz partikülleri, bir kuru hava jeti kullanılarak çıkarılmıştır. Numune daha sonra bir püskürtme kaplayıcı kullanılarak platinle (60 saniye boyunca 18 mA'da) kaplanmıştır. SEM görüntüleri, çikolata ile karıştırılmadan önce ve sonra kapsüllenmiş probiyotik mayaların yüzey mikro yapısını görselleştirmek için farklı büyütmelerle 10 kV hızlandırma voltajında alınmıştır (Masum ve ark., 2019). Proje kapsamında mikroyapı analizleri taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy, SEM) yöntemi kullanılmak üzere hizmet alımı ile Sakarya Üniversitesi Araştırma-Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

2.3.7. Probiyotiğin çikolatalarda canlılığı

Probiyotik canlılığı, 30 günlük aralıklarla 120 günlük tüm depolama süresi boyunca değerlendirilmiştir. Numuneler (25 g) 225 ml steril %0.1 peptonlu su ile karıştırılarak ve seri olarak seyreltilerek, Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck, Almanya) ortamında aerobik olarak 27 °C'de 3 gün inkübe edilmiştir. Sonuçlar log kob/g olarak bildirilmiştir (Hossain ve ark., 2021b,c).

2.3.8. Probiyotik çikolatanın in vitro gastrointestinal sindirimi sırasında probiyotiklerin hayatta kalmasının test edilmesi

Probiyotik çikolatanın ve kontrolün (kapsüllenmemiş probiyotikler) gastrointestinal sindirimi sırasındaki probiyotik sayıları, 120 günlük depolamada in vitro gastrointestinal sindirim modeli Minekus ve ark. (2014)'nın uyguladığı yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir. Model, ağızda, midede ve ince bağırsakta ardışık olarak simüle edilen üç adımlı sindirimi içermektedir. Probiyotiklerin sayımları için sindirimin her aşamasında örnekler toplanmıştır. Her muamele için üç numune

alınmıştır. In vitro çalışma, kapsüllenmemiş probiyotikler, kapsüllenmiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş çikolata örneklerini içermiştir.

Ağızda çiğneme: Çikolata numuneleri (2,5 g) 1,75 ml simüle tükürük sıvısı, 0,25 mL 1500 U ml⁻¹ tükürük α amilaz solüsyonu (Sigma aldrich, Almanya), 12,5 μ L 0,3 M CaCl₂ ve 487,5 μ L Milli-Q su ve oda sıcaklığında 2 dakika vortekslenmiştir.

Midede Sindirimi: Ağızda çiğnenmiş örnekler 3,75 ml simüle mide sıvısı, 0,8 ml pepsin (3200–4500 U mg⁻¹) (Sigma aldrich, Almanya), 2,5 μ L 0,3 M CaCl₂ (Merck, Almanya) ve 0,375 ml Milli Q su ile karıştırılmıştır. 1 M HCl kullanılarak pH 3.0'a ayarlanmıştır ve çalkalayıcı inkübatörde anaerobik olarak 2 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir.

Bağırsakta sindirimi: Mideyle sindirilen numuneler 5,5 ml simüle bağırsak sıvısı, 2,5 ml pankreatin (800 U ml⁻¹) (Sigma aldrich, Almanya), 1,25 ml taze safra (160 mM) (Sigma aldrich, Almanya), 20 μ L 0,3M CaCl₂ ve 0.655 ml Milli Q su ile karıştırılmıştır. NaOH (1 M) kullanılarak pH 7'ye ayarlanarak numuneler çalkalayıcı bir inkübatörde 37 °C'de 2 saat süreyle sindirime tabi tutulmuştur.

Probiyotik çikolatanın in vitro gastrointestinal sindirimi sonrasında probiyotiklerin hayatta kalmasını test etmek için ve 25 °C'de depolanan çikolatalar 1. ve 120. gün depolama sonucu in vitro sindirimden geçirilmiş ve kapsüllü ve kapsülsüz probiyotik çikolatalarda maya sayısı tespit edilmiştir.

2.3.9. GC FID kullanarak yağ asitlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi

2.3.9.1. Örnek hazırlama

Numuneler (100-150 μ L), seramik boncuklar (KT03961 1, Bertin Technologies, Fransa) içeren 2 mL'lik vidalı kapaklı bir test tüpüne aktarılmıştır. Numuneler 1 mL %10 izobutanol ile 6000 $\times$ g'de 30 sn arayla üç kez homojenize edilmiştir (IKA ULTRA TURRAX, Sigma-Aldrich, NSW, Avustralya). Numuneler daha sonra 21000 $\times$ g'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve tüm süpernatant (675 μ L) yeni bir test tüpüne aktarılmış ve Furuhashi ve ark. (2018) yöntemi izlenerek metilasyona tabi tutulmuştur. Süpernatant, 20 μ L 3 metilpentanoik asit alikotu ile karıştırılarak, ardından 125 μ L NaOH (20 mM) ve 400 μ L kloroform ilave edilmiştir. Bu numune karışımı daha sonra vortekslenerek 21000 $\times$ g'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Üst fazdan 400 μ L yeni bir test tüpüne aktarılmış ve tüplere 80 μ L isobutanol ve 100 μ L piridin eklenmiştir.

Tüplerin son hacmi Milli-Q su kullanılarak 650 µL'ye ayarlanmıştır. Köpürmeyi en aza indirmek için bir kaynama çipi eklenmiştir. 650 µL'lik numune tüpü üzerine 50 µL'lik bir izobutil kloroformat alikotu dikkatlice ilave edildikten sonra gazların salınması için 1 dakika süreyle kapağı açılmıştır. Vortekslendikten sonra tüpe 150 µL hekzan eklenerek ve 21000 x g de 2 dk santrifüj edilmiştir. Üst heksan izobutanol fazı, GC analizi için otomatik numune alıcıya aktarılmıştır.

2.3.9.2. GC-FID kullanılarak hazırlanan örneklerde yağ asidi analizleri

Yağ asitlerinin tanımlanması ve miktarı, bir Agilent 7890B GC-FID ve Agilent 7693 otomatik numune alma cihazında gerçekleştirilmiştir. Kapiler 15 m × 0,53 mm × 0,5 µm film kalınlıklı kolon (Sigma Aldrich, NSW, Avustralya), 155 °C'de 1,0 ml/dk kolon gaz akışı ile kullanılmıştır. Bölünmüş (50:1) enjeksiyon modu kullanılarak ve fırın sıcaklıkları 100 °C, 10 dk'da 220 °C'ye yükseltilmiştir. Taşıyıcı olarak helyum gazı kullanılmış ve çalışma süresi 12 dakika olarak belirlenmiştir (Furuhashi ve ark., 2018).

25 °C'de 1. ve 120. gün depolama sonucu kapsüllü ve kapsülsüz probiyotik çikolatalarda GC-FID ile yağ asitleri tanımlanmış ve miktarı belirlenmiştir. Hizmet alımı ile gerçekleştirilmiş olan analiz gaz kromatografi cihazı (GC) kullanılarak Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

2.3.10. İstatistiksel analiz

Tüm analizler iki tekerrür ve en az iki paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen değerlerin ortalama değerleri ve standart sapmaları hesaplanarak talolarda sunulmuştur. MINITAB istatistik programı ile istatistiksel olarak farklılıkların belirlenmesi amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Student's t testi kullanılmıştır ($p \leq 0,05$).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Örneklerden Mayaların İzolasyonu

Analize alınan 19 ev yapımı doğal çökelek peyniri, karın kaymağı peyniri, tereyağ, kefir, yoğurt, tel peyniri, mantar turşusu, salatalık turşusu, lahana turşusu, fasulye turşusu, taflan turşusu, yabandağı alıcı sirkesi, Trabzon hurması sirkesi, ekşidağ elması sirkesi, kırmızı pancar lahana havuç biber sirkesi, elma sirkesi, üzüm sirkesi, çiçek balı sirkesi ve dağ kıızılcığı sirkesi örneklerinden farklı koloni özellikleri gösteren 85 suş izole edilmiştir. Elde edilen mayaların daha sonra probiyotik özellikleri araştırılmıştır. İzolasyon işlemlerine tabi tutulan kaynaklar, izolatların numaralandırmaları ve koloni morfolojileri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Mayaların izolasyonunda kullanılan kaynaklar, izolatların numaralandırmaları ve koloni morfolojileri.

Materyal	İzolatlar	Koloni morfolojisi
Çökelek peyniri	1	beyaz, büyük, yuvarlak
	2	beyaz, orta, tırtıklı
	3	beyaz, orta, yuvarlak
	4	beyaz, büyük, yuvarlak
	5	beyaz, küçük, tırtıklı
Karın kaymağı peyniri	6	beyaz, büyük, yuvarlak
	7	beyaz, büyük, tırtıklı
	8	beyaz, küçük, yuvarlak
	9	beyaz, küçük, yuvarlak, pürüzlü
	10	beyaz, büyük, tırtıklı
Tereyağ	11	beyaz, büyük, yuvarlak, pürüzlü
	12	beyaz, orta, tırtıklı, pürüzlü
	13	beyaz, orta, yuvarlak
Kefir	14	sarı, büyük, yuvarlak, pürüzlü
	15	beyaz, orta, tırtıklı, pürüzlü
	16	beyaz, küçük, yuvarlak
Yoğurt	17	sarı, orta, yuvarlak, ortası siyah
	18	beyaz, büyük, yuvarlak, pürüzlü
	19	beyaz, büyük, yuvarlak, pürüzlü
Tel peynir	20	beyaz, büyük, yuvarlak
	21	beyaz, büyük, tırtıklı
	22	sarı, küçük, yuvarlak

Tablo 3.1. (Devamı) Mayaların izolasyonunda kullanılan kaynaklar, isimleri ve numaralandırılmaları ve koloni morfolojileri

Materyal	İzolatlar	Koloni morfolojisi
Mantar turşusu	23	beyaz, küçük, pürüzlü
	24	beyaz, büyük, tırtıklı
	25	beyaz, büyük, tırtıklı
	26	beyaz, büyük, tırtıklı
	27	beyaz, küçük, tırtıklı
	28	beyaz, büyük, tırtıklı
	29	beyaz, büyük, tırtıklı
	30	beyaz, büyük, yuvarlak, parlak
Salatalık turşusu	31	beyaz, büyük, elips, parlak
	32	beyaz, küçük, yuvarlak, parlak
	33	beyaz, orta, yuvarlak, parlak
	34	pembe, orta, yuvarlak, parlak
	35	beyaz, orta, yuvarlak
Lahana turşusu	44	beyaz, büyük, yuvarlak
	45	beyaz, orta, yuvarlak, pürüzlü
	46	beyaz, büyük, yuvarlak
	47	beyaz, büyük, tırtıklı
	48	beyaz, orta, yuvarlak
	49	beyaz, büyük, elips, pürüzlü
	50	beyaz, büyük, yuvarlak, kuru
	51	beyaz, orta, yuvarlak, parlak
	52	beyaz, orta, yuvarlak, parlak
	53	beyaz, orta, tırtıklı, kuru
Fasulye turşusu	54	beyaz, orta, yuvarlak, kuru
	55	beyaz, orta, yuvarlak
	56	beyaz, orta, yuvarlak
	57	beyaz, büyük, tırtıklı
	58	beyaz, büyük, yuvarlak
Taflan turşusu	59	beyaz, küçük, yuvarlak, parlak
	60	beyaz, büyük, yuvarlak, parlak
	61	beyaz, orta, yuvarlak, parlak
Yaban dağ alıcı sirkesi	62	beyaz, büyük, yuvarlak
	63	beyaz, büyük, tırtıklı
Trabzon hurması sirkesi	64	beyaz, küçük, yuvarlak
	65	beyaz, küçük, yuvarlak, pürüzlü
	66	beyaz, büyük, tırtıklı
Ekşidağ elması sirkesi	67	beyaz, büyük, yuvarlak, pürüzlü
	68	beyaz, orta, tırtıklı, pürüzlü
	69	beyaz, orta, yuvarlak
Kırmızı pancar lahana havuç biber sirkesi	70	sarı, büyük, yuvarlak, pürüzlü

Tablo 3.1. (Devamı) Mayaların izolasyonunda kullanılan kaynaklar, isimleri ve numaralandırılmaları ve koloni morfolojileri

Materyal	İzolatlar	Koloni morfolojisi
Elma sirkesi	71	beyaz, orta, tırtıklı, pürüzlü
	72	beyaz, küçük, yuvarlak
	73	beyaz, orta, tırtıklı
	74	beyaz, büyük, yuvarlak
Üzüm sirkesi	75	beyaz, küçük, tırtıklı
	76	beyaz, büyük, yuvarlak
	77	beyaz, orta, tırtıklı
Çiçek balı sirkesi	78	beyaz, küçük, tırtıklı
	79	beyaz, orta, tırtıklı
	80	beyaz, orta, yuvarlak
	81	beyaz, küçük, yuvarlak
Dağ kıızılcığı sirkesi	82	pembe, orta, yuvarlak
	83	beyaz, büyük, yuvarlak
	84	beyaz, küçük, yuvarlak
Kefir 2	85	beyaz, orta, yuvarlak

3.2. Mayaların Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatlardan hiçbirisi β -hemolitik aktivite göstermemiştir. Mayaların hepsi γ hemolitik aktivite göstermiştir. Suşların hemolitik aktivite göstermemesi kullanımlarının güvenli olduğunu düşündürmektedir.

3.3. Mayaların Gastrointestinal Koşullarda Hayatta Kalma Kapasitesinin Belirlenmesi

Mayaların in vitro gastrointestinal koşullarda hayatta kalma yüzdeleri sonucu mayaların simüle mide ve bağırsak suyunda iyi bir hayatta kalma özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Pankreatin ve safra tuzu ilavesiyle simüle edilen bağırsak koşullarında hayatta kalma yüzdeleri Tablo 3.2’de verilmiştir. Bu çalışmada değerlendirilen suşlar, mide ve bağırsak geçişi sırasında simüle edilmiş koşullara maruz kaldıktan sonra gastrointestinal koşullarda hayatta kalma potansiyeli göstermiştir. Elde ettiğimiz mayaların mide koşullarına pankreas sıvısına oranla daha dayanıklı oldukları sonucuna varılmıştır.

Probiyotik suşlarının mide ve ince bağırsaktan geçmesi gereklidir. Midedeki pH 2.5 ile 3.5 arasında değişir. Mayalar geniş bir pH aralığında hayatta kalabilir ve çok az maya türü, 1.5 pH gibi oldukça asidik ortamlarda bile hayatta kalabilmiştir (Czerucka et al., 2007). Bonatsou ve ark. (2018), 49 maya suşundan 42’sinin, simüle edilmiş mide

ve pankreatik sindirim sırasında %50 ve üzerinde hayatta kalma oranına sahip olduğunu belirlemiştir. Yaptığımız çalışmada benzer şekilde 85 mayadan 54 maya izolatu %50 ve üzerinde mide sıvısında hayatta kalmıştır. İn vitro mide ve pankreas sindirimlerine tolerans, potansiyel probiyotik adaylar için önemlidir.

Rajkowska ve Styczynska (2010) tarafından beş farklı *S. boulardii* suşunun gastrointestinal koşullara yüksek oranda adapte olduğu ancak inkübasyon süresinin artmasının adaptasyon yüzdesinde azalma ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Kontrol suşu olarak kullanılan iki *S. boulardii* suşunun gastrointestinal koşullarda canlılığını devam ettirebildiği belirtilmiştir. Gut ve ark., (2019) yaptıkları çalışmada kontrol olarak kullanılan *S. boulardii* suşlarının gastrointestinal koşullarda en az etkilenen suşlar olduğunu bildirmiştir. Genel olarak, bulgularımız *S. boulardii* suşlarının mide ve pankreatik koşullar altında yüksek canlılık düzeylerini gösteren literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur.

Tablo 3. 2. Maya izolatlarının mide sıvısında ve pankreatik sindirimde hayatta kalma yüzdeleri.

İzolat	Mide	Pankreas	İzolat	Mide	Pankreas
1	50,8±0,1	28,1±0,2	44	81,1±0,1	04,5±0,0
2	47,2±0,0	21,6±0,1	45	47,9±0,1	16,2±0,0
3	00,0±0,0	00,0±0,0	46	78,1±0,1	10,7±0,1
4	80,0±0,2	13,2±0,0	47	77,4±0,0	03,1±0,0
5	80,1±0,1	16,2±0,0	48	84,3±0,0	19,5±0,2
6	79,0±0,0	19,1±0,1	49	79,8±0,0	21,5±0,2
7	65,2±0,1	29,2±0,0	50	86,1±0,2	10,8±0,1
8	57,4±0,1	32,2±0,0	51	89,5±0,1	18,2±0,0
9	77,8±0,0	16,1±0,1	52	50,8±0,1	28,1±0,2
10	84,5±0,1	15,2±0,0	53	47,2±0,0	21,6±0,1
11	64,0±0,1	32,1±0,2	54	42,8±5,2	15,6±0,0
12	39,0±0,0	30,7±0,1	55	68,5±0,1	23,4±0,0
13	84,8±0,1	17,8±0,1	56	59,5±0,0	48,5±0,1
14	79,4±0,0	14,8±0,2	57	73,2±0,2	46,7±0,2
15	36,0±0,1	33,9±0,0	58	25,7±0,3	26,6±0,1
16	49,9±0,1	34,1±0,0	59	40,3±0,1	20,2±0,0
17	38,1±0,0	31,4±0,0	60	37,5±0,1	43,8±0,0

Tablo 3.2. (Devamı) Maya izolatlarının mide sıvısında ve pankreatik sindirimde hayatta kalma yüzdeleri.

İzolat	Mide	Pankreas	İzolat	Mide	Pankreas
18	53,9±0,1	22,6±0,2	61	22,3±0,0	21,5±0,0
19	48,6±0,0	25,3±0,6	62	77,8±0,0	44,3±0,0
20	50,6±0,4	26,0±0,1	63	52,7±0,2	19,1±0,3
21	72,8±0,1	18,8±0,4	64	54,0±0,1	39,0±0,1
22	65,4±0,4	26,4±0,1	65	50,9±0,3	39,1±0,1
23	59,4±0,0	22,6±0,1	66	78,2±0,2	23,1±0,5
24	64,1±9,3	27,5±0,1	67	71,1±0,3	21,3±0,1
25	62,8±5,2	25,6±0,0	68	69,5±0,0	21,4±0,1
26	58,5±0,1	43,4±0,0	69	49,5±0,1	18,9±0,0
35	64,0±0,1	29,0±0,1	78	69,8±0,0	11,5±0,2
36	60,9±0,3	29,1±0,1	79	76,1±0,2	20,8±0,1
37	68,2±0,2	13,1±0,5	80	79,5±0,1	28,2±0,0
38	81,1±0,3	11,3±0,1	81	60,8±0,1	18,1±0,2
39	79,5±0,0	11,4±0,1	82	37,2±0,0	31,6±0,1
40	59,5±0,1	08,9±0,0	83	40,8±0,1	18,1±0,2
41	98,2±0,1	06,0±0,1	84	27,2±0,0	31,6±0,1
42	53,4±0,1	14,8±0,0	85	90,0±0,2	43,2±0,0
43	87,5±4,8	08,2±0,0			

3.4. Mayaların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların hiçbirisi güçlü biyofilm üreticisi olarak tanımlanmadı, İzolatların %10,58'i orta, %34,11'i zayıf biyofilm üreticisi olarak tanımlanırken, %55,29'unun biyofilm oluşturma özelliğinin olmadığı tespit edildi (Tablo 3.3). Biyofilm oluşumu hücre yapışma potansiyelini gösterir. Mayaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin az olmasının nedeni ekzopolisakkarit oluşturma kapasitelerinin az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bağırsağı kolonize etme potansiyelinin değerlendirilmesi, biyofilm oluşumu yoluyla da değerlendirilebilmektedir. Aslında, biyofilmlerin bağırsaktaki konak ve yerleşik mikroorganizmalar arasındaki yakın ilişkide önemli bir rol oynadığı ve biyofilm oluşumunun bağırsak kolonizasyonu ve bazı probiyotiklerin bağırsak mukozasına yapışması için temel bir ön koşul olduğu

bilinmektedir. Probiyotik özelliği gösteren mayaların koagregasyonları ve biyofilm oluşturmalarının önemli yararlar sağlayabileceği bazı çalışmalar ile açıklanmıştır. Okamoto ve ark (2013), yaptıkları bir çalışmada *S. cerevisiae* BY4741 suşunun biyofilm oluşturma yeteneğini araştırmışlardır. Maya hücre duvarında bulunan negatif yüklü mannan bileşiğinin koagregasyonundan sorumlu olduğunu açıklamışlardır. Biyofilm oluşumu ile Caco-2 hücrelerine yapışma arasında bir korelasyon vardır ve yüksek yapışma, bu suşların bağışıklık sistemi modülasyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir (Fhoula ve ark., 2018).

3.5. Mayaların Enzimatik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Gıdada kullanılabilir mayalar tarafından üretilen enzimlerin çoğu, gıdalardaki karmaşık bileşiklerin metabolize edilmesinde rol oynar, böylece fermente gıdalara besin değeri ve organoleptik özellikler kazandırılır (Hellström ve ark., 2012). Esteraz ve lipaz, farklı aromatik bileşiklerin oluşumunun öncüsü olan serbest yağ asidi içeriğini artırarak fermente gıdaların aromatik profilini iyileştirir (Arroyo Lopez ve ark., 2012). Lipaz ve proteaz, gastrointestinal sistemde lipitlerin ve proteinlerin sindiriminin iyileştirilmesine katkıda bulundukları için probiyotik potansiyeli destekleyebilir (Syal ve Vohra, 2013). Amilaz, insan diyetindeki nişasta ve glikojenin parçalanmasını kolaylaştırarak polisakkaritlerin hidrolizinden sorumludur ve böylece sindirim sistemine katkıda bulunur (Motta, 2000). Mayalar tarafından proteolitik enzimlerin üretimi, toksinleri parçaladığı bildirildiğinden, konak için faydalar sağlayabilir (Palma ve ark., 2015). Bu nedenle, proteolitik enzimlerin üretimi, konakçıyı *Salmonella*, *Vibrio*, *Clostridium*, *E. coli* ve *Bacillus* türleri gibi enteropatojenik bakterilerin ürettiği toksinlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı koruyabilir (Gut ve ark., 2018). Lipolitik enzim enzimatik aktivite serbest yağ asitlerinin azalması, etanol, gliserol, yüksek alkoller, esterler ve diğer uçucu bileşikler gibi çeşitli aromatik bileşiklerin oluşumunun öncüsü olarak kabul edilir. Bir diğer önemli enzim ise sekonder metabolitlerin üretimi ve fenolik bileşikleri ve özellikle lezzet üzerinde önemli bir etkiye sahip olan β -glukozidazdır. (Bevilacqua ve ark., 2013). Bu nedenlerle probiyotik mayaların enzimatik aktivitelerinin yüksek olması istenen bir özelliktir. Ogunremi ve ark., (2015b) yaptıkları çalışmada izole ettikleri mayalardan *Pichia kluyveri*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia kudriavzevii* ve *Candida tropicalis* mayalarını yüksek proteaz, lipaz ve fitaz aktivitesine sahip olduklarını tespit etmiştir.

3.5.1. Mayaların katalaz aktivitesi

Tüm izolatlarda katalaz enzim üretimi tespit edilmiştir. Tüm mayalar katalaz pozitif olarak belirlenmiştir.

3.5.2. Mayaların proteaz aktivitesi

İzolatların hepsinde proteaz aktivitesi görülmüştür. İzolatlardan %83,52'sinin orta, %16,47'sinin güçlü proteaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Proteaz aktivitesine ait sonuçlar Tablo 3.3'te verilmiştir.

3.5.3. Mayaların esteraz aktivitesi

İzolatların %2,35'sinde esteraz aktivitesi görülmeyip, %95,29'unda orta düzeyde, %2,35'inde güçlü esteraz aktivitesi esteraz aktivitesi tespit edilmiştir. Esteraz aktivitesine ait sonuçlar Tablo 3.3'te verilmiştir.

3.5.4. Mayaların amilaz aktivitesi

İzolatlardan %95,29'unda orta düzeyde amilaz aktivitesi tespit edilirken %2,35'inde güçlü amilaz aktivitesi %2,35'inde ise amilaz aktivitesi tespit edilmemiştir. Amilaz aktivitesine ait sonuçlar Tablo 3.3'te verilmiştir.

3.5.5. Mayaların β -glikozidaz aktivitesi

İzolatların yarısından fazlası güçlü β -glikozidaz aktivitesi görülmüştür. İzolatlardan %50,58'inde güçlü β -glikozidaz aktivitesi görülürken, %49,41'inde aktivite görülmemiştir. β -glikozidaz aktivitesine ait sonuçlar Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3. 3. İzolatların biyofilm oluşturma ve enzim aktivite sonuçları.

İzolat	Biyofilm ¹	Proteaz ²	Esteraz ²	Amilaz ²	β -glikozidaz ²
1	0,066 -	15 ++	1 +	3 +	0 -
2	1,088 ++	1 +	1 +	1 +	0 -
3	0,697 +	1 +	1 +	1 +	0 -
4	0,891 ++	1 +	1 +	1 +	7 ++
5	0,767 ++	1 +	1 +	1 +	0 -
6	0,225 -	3 +	1 +	1 +	0 -
7	0,368 +	2 +	1 +	1 +	10 ++
8	0,184 -	1 +	2 +	1 +	0 -
9	0,707 +	1 +	1 +	2 +	12 ++
10	0,460 +	4 ++	1 +	1 +	15 ++
11	0,154 -	1 +	1 +	1 +	9 ++
12	0,249 -	1 +	1 +	1 +	0 -
13	0,156 -	2 +	1 +	2 +	14 ++

Tablo 3.3. (Devamı) İzolatların biyofilm oluşturma ve enzim aktivite sonuçları.

İzolat	Biyofilm ¹	Proteaz ²	Esteraz ²	Amilaz ²	β-glikozidaz ²
14	0,444 +	1 +	1 +	1 +	15 ++
15	0,260 -	2 +	5 ++	1 +	0 -
16	0,090 -	1 +	3 +	1 +	12 ++
17	0,376 +	2 +	1 +	1 +	17 ++
18	0,566 +	4 ++	3 +	2 +	0 -
19	0,261 -	5 ++	1 +	1 +	0 -
20	0,349 -	2 +	1 +	1 +	0 -
21	0,520 +	2 +	1 +	5 ++	9 ++
22	0,084 -	1 +	1 +	1 +	12 ++
23	0,282 -	5 ++	1 +	1 +	0 -
24	0,181 -	1 +	1 +	1 +	8 ++
25	0,150 -	5 ++	1 +	1 +	0 -
26	0,555 +	2 +	1 +	1 +	0 -
27	0,083 -	1 +	1 +	3 +	0 -
28	0,289 -	2 +	1 +	1 +	0 -
29	0,268 -	1 +	1 +	1 +	0 -
30	0,811 ++	1 +	1 +	1 +	0 -
31	0,600 +	1 +	1 +	1 +	11 ++
32	0,608 +	1 +	1 +	1 +	0 -
33	0,975 ++	5 ++	2 +	3 +	17 ++
34	0,274 -	1 +	1 +	1 +	12 ++
35	0,472 +	4 ++	1 +	1 +	12 ++
36	0,124 -	2 +	1 +	1 +	10 ++
37	0,301 -	2 +	1 +	1 +	0 -
38	0,248 -	1 +	1 +	1 +	0 -
39	0,343 -	1 +	1 +	1 +	0 -
40	0,398 +	1 +	1 +	1 +	0 -
41	0,364 +	3 +	1 +	3 +	0 -
42	0,186 -	3 +	1 +	1 +	0 -
43	0,465 +	1 +	1 +	1 +	0 -
44	0,390 +	2 +	1 +	1 +	16 ++
45	0,218 -	1 +	1 +	1 +	12 ++
46	0,351 -	1 +	1 +	1 +	11 ++
47	0,177 -	2 +	2 +	1 +	0 -
48	0,156 -	2 +	1 +	1 +	0 -
49	0,232 -	3 +	2 +	1 +	0 -
50	0,467 +	1 +	1 +	1 +	14 ++
51	0,788 ++	1 +	0 -	0 -	10 ++
52	0,396 +	2 +	0 -	2 +	0 -
53	0,307 -	2 +	1 +	3 +	0 -
54	0,747 ++	4 ++	1 +	2 +	0 -
55	0,205 -	1 +	1 +	1 +	0 -

Tablo 3.3. (Devamı) İzolatların biyofilm oluşturma ve enzim aktivite sonuçları.

İzolat	Biyofilm ¹	Proteaz ²	Esteraz ²	Amilaz ²	β -glikozidaz ²
56	0,378 +	1 +	1 +	1 +	0 -
57	0,284 -	2 +	1 +	1 +	0 -
58	0,607 +	1 +	1 +	1 +	15 ++
59	0,442 +	2 +	5 ++	2 +	0 -
60	0,254 -	2 +	3 +	1 +	16 ++
61	0,149 -	2 +	1 +	1 +	15 ++
62	0,256 -	3 +	3 +	4 ++	10 ++
63	0,544 +	4 ++	1 +	1 +	12 ++
64	0,164 -	2 +	1 +	1 +	12 ++
65	0,082 -	2 +	1 +	1 +	9 ++
66	0,476 +	1 +	1 +	1 +	10 ++
67	0,666 +	4 ++	1 +	3 +	9 ++
68	0,161 -	1 +	1 +	1 +	8 ++
69	0,249 -	4 ++	1 +	1 +	0 -
70	0,152 +	2 +	1 +	1 +	0 -
71	0,184 -	1 +	1 +	1 +	0 -
72	0,182 -	2 +	1 +	1 +	7 ++
73	0,281 -	1 +	1 +	1 +	8 ++
74	0,115 -	1 +	1 +	1 +	6 ++
75	0,455 +	2 +	1 +	1 +	12 ++
76	0,183 -	1 +	1 +	1 +	13 ++
77	0,189 -	5 ++	2 +	0 -	14 ++
78	0,168 -	1 +	1 +	2 +	0 -
79	0,911 ++	4 ++	1 +	2 +	10 ++
80	0,162 +	2 +	1 +	2 +	14 ++
81	0,508 +	2 +	1 +	1 +	14 ++
82	0,875 ++	1 +	1 +	1 +	0 -
83	0,174 -	1 +	1 +	3 +	0 -
84	0,572 +	2 +	1 +	1 +	13 ++
85	0,024 -	3 +	1 +	1 +	18 ++

¹Biyofilm üreticisi olmayan (-), zayıf biyofilm üreticisi (+), orta düzeyde biyofilm üreticisi (++) ve güçlü biyofilm üreticisi (+++).

²Zon oluşumu veya büyüme olmayan (-), Zon veya koloni çapı <3 mm orta (+), Zon veya koloni çapı >3 mm güçlü (++).

3.6. Mayaların % Hidrokarbonlara Yapışma Değerleri

Elde edilen mayaların hidrokarbonlara yapışma değerleri Tablo 3.4'te verilmiştir. Hidrokarbonlara yapışma yeteneğinin cinse ve türe özgü olduğu sonucuna varılmıştır.

Ayrıca hidrofobisiteninin hidrokarbonlara göre değiştiği belirlenmiştir. Mayaların %16,47'si ksilene karşı, %20,00'ı kloroforma karşı, %35,29'u etil asetata karşı %30 dan fazla hidrokarbonlara yapışma göstermiştir.

Bonatsou ve ark. (2018), Kalamata'da siyah zeytinlerin doğal fermantasyonunda yer alan mayaların %75 ve üzerinde hidrofobik aktiviteye sahip olduğunu belirlemiştir. İtalyan ekstra sızma zeytinyağından elde edilen maya izolatları en yüksek %55.50 hidrofobikliği göstermiştir (Zullo ve Ciafardini, 2019). Ananas kabuğu ve pulpasından elde edilen maya izolatlarının hidrofobik aktiviteleri incelenmiş ve en yüksek hidrofobiklik değeri %99.66 olarak belirlenmiştir (Amorim ve ark., 2018). Nijerya tahıl bazlı geleneksel fermente gıda ürünlerinden izole edilen mayaların hidrofobiklik oranları bizimkine benzer %33-42 arasında belirlenmiştir (Ogunremi ve ark., 2015b).

Hidrokarbonlara tutunma kapasitesi, hücre yüzeyi hidrofobikliği ile ilişkilidir ve bağırsak epitel dokusuna tutunma kapasitesini belirler. Hidrofobiklik, epitele yapışma için tek başına yeterli değildir ancak agregasyon özelliği ile birlikte değerlendirilmelidir. Hidrofobiklik yeteneği, probiyotiklerin epitel hücrelerine tutunmasını gösterir. Hidrofobiklik arttıkça sağlık yararı da artar (Nami et al., 2019). Bağırsak yüzeyine yapışan probiyotikler sayesinde patojenler bağırsak yüzeyine kolonize olamaz (Shi et al., 2020). Bağırsak yüzeyine yapışan probiyotikler besinleri alır. Ayrıca ürettikleri organik asitler ve antimikrobiyel bileşikler patojenlerin büyümesini engeller (Juturu ve Wu 2018).

Lara-Hidalgo ve ark., (2019) dört farklı mayanın hidrofobisitelerini karşılaştırmışlar ve en yüksek hidrofobisite yüzdelerini kloroform ve n-hekzadekan'da belirlemişlerdir ve bizim çalışmamızda olduğu gibi *S. boulardii* için en düşük hidrofobisite yüzdesinin ksilen de olduğunu belirlemişlerdir. Kaushik ve ark., (2009) hidrofobisite yüzdelerindeki farklılıkların, bir türün suşları arasındaki hücre yüzey proteinlerinin ekspresyon seviyesinin yanı sıra çevresel koşullarla da ilişkili olabileceğini ifade etmişlerdir.

Tablo 3. 4. Mayaların hidrokarbonlara tutunma özelliklerinin belirlenmesi.

İzolat	Ksilen	Kloroform	Etil asetat
1	35,7±0,0	28,0±0,0	33,2±0,1
2	14,0±0,4	46,2±0,3	50,7±0,2
3	13,5±0,4	44,7±0,1	52,6±0,1
4	31,7±0,8	56,1±0,4	45,3±1,3

Tablo 3.4. (Devamı) Mayaların hidrokarbonlara tutunma özelliklerinin belirlenmesi.

İzolat	Ksilen	Kloroform	Etil asetat
5	39,6±0,1	47,3±0,0	43,3±0,2
6	27,4±5,5	33,1±1,0	54,6±1,3
7	20,9±0,4	32,6±0,4	49,2±0,1
8	23,5±1,3	32,0±0,4	65,1±0,1
9	19,2±0,0	06,0±0,0	00,0±0,0
10	32,7±0,6	21,2±0,9	41,9±0,2
11	26,7±4,7	07,3±0,4	65,9±1,2
12	20,2±0,0	05,6±0,0	00,0±0,0
13	36,0±0,4	25,0±0,3	45,5±0,2
14	69,1±0,2	24,1±0,4	71,8±0,1
15	34,0±0,0	38,5±0,0	49,4±0,0
16	71,8±0,3	24,9±1,1	70,2±0,4
17	15,5±0,0	12,2±0,0	00,3±0,0
18	25,8±0,6	28,1±0,3	46,3±1,0
19	17,2±1,0	26,6±1,2	40,7±0,3
20	24,6±0,7	16,1±2,6	17,2±0,6
21	22,9±0,1	23,7±0,6	25,2±0,2
22	00,3±0,0	00,0±0,0	15,6±0,0
23	22,0±0,1	21,0±4,6	28,9±0,4
24	02,8±0,0	00,0±0,0	27,1±0,0
25	22,6±0,0	29,1±2,5	29,3±0,0
26	20,5±0,0	34,3±0,1	34,0±0,2
27	15,6±0,1	47,5±0,2	32,8±0,2
28	83,2±0,1	83,6±0,3	69,2±0,9
29	25,9±0,5	26,8±0,9	32,1±0,6
30	27,5±0,6	25,5±0,6	30,0±1,0
31	00,0±0,0	08,8±0,7	22,6±0,7
32	04,7±0,3	04,1±0,8	04,3±0,6
33	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0
34	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0
35	00,0±0,0	07,9±0,2	05,5±0,1
36	02,4±1,1	00,0±0,0	00,0±0,0
37	18,7±0,1	06,5±1,2	29,0±1,0
38	09,5±0,1	05,7±1,1	01,8±0,1
39	11,7±0,7	10,4±1,0	20,0±3,7
40	00,0±0,0	00,0±0,0	06,4±0,9
41	27,6±0,0	11,7±0,1	20,2±0,1
42	36,6±0,4	13,6±0,7	13,5±0,5
43	27,2±0,0	06,2±3,8	20,1±2,4
44	07,9±1,3	02,2±1,0	18,5±1,6
45	09,3±0,0	03,2±0,1	20,3±0,2
46	23,9±3,9	27,3±0,2	24,2±3,9
47	16,1±0,0	02,6±0,0	50,5±0,0

Tablo 3.4. (Devamı) Mayaların hidrokarbonlara tutunma özelliklerinin belirlenmesi.

İzolat	Ksilen	Kloroform	Etil asetat
48	04,7±0,0	00,0±0,0	26,4±0,0
49	29,1±0,0	04,3±0,1	13,2±0,2
50	17,6±0,0	07,1±0,0	15,0±0,1
51	00,6±0,1	00,0±0,0	06,7±0,0
52	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0
53	03,7±0,0	00,0±0,0	12,7±0,0
54	12,8±0,0	00,0±0,0	17,1±0,0
55	32,6±0,0	39,1±2,5	39,3±0,0
56	30,5±0,0	44,3±0,1	32,0±0,2
57	25,6±0,1	37,5±0,2	32,8±0,2
58	73,2±0,1	73,6±0,3	79,2±0,9
59	35,9±0,5	36,8±0,9	34,1±0,6
60	17,5±0,6	15,5±0,6	20,0±1,0
61	00,0±0,0	18,8±0,7	12,6±0,7
62	14,7±0,3	14,1±0,8	14,3±0,6
63	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0
64	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0
65	00,0±0,0	17,9±0,2	15,5±0,1
66	12,4±1,1	00,0±0,0	00,0±0,0
67	28,7±0,1	16,5±1,2	39,0±1,0
68	19,5±0,1	15,7±1,1	11,8±0,1
69	21,7±0,7	20,4±1,0	20,0±3,7
70	00,0±0,0	00,0±0,0	16,4±0,9
71	17,6±0,0	21,7±0,1	20,2±0,1
72	26,6±0,4	23,6±0,7	23,5±0,5
73	17,2±0,0	16,2±3,8	20,1±2,4
74	17,9±1,3	12,2±1,0	28,5±1,6
75	19,3±0,0	13,2±0,1	20,3±0,2
76	13,9±3,9	17,3±0,2	24,2±3,9
77	26,1±0,0	12,6±0,0	40,5±0,0
78	14,7±0,0	00,0±0,0	26,4±0,0
79	19,1±0,0	14,3±0,1	13,2±0,2
80	27,6±0,0	17,1±0,0	15,0±0,1
81	00,6±0,1	00,0±0,0	16,7±0,0
82	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0
83	13,7±0,0	00,0±0,0	22,7±0,0
84	27,6±0,0	13,2±0,1	20,3±0,2
85	36,6±0,4	37,3±0,2	34,2±3,9

Syal ve Vohra (2013) geleneksel fermente gıdalardan izole ettikleri maya izolatlarının hücre yüzeyi hidrofobitesini, örneğin *Saccharomyces cerevisiae* suşlarını sırasıyla %32,53, %35,81 ve %41,37, *Candida tropicalis* suşlarını sırasıyla %67,91 ve %68,12 oranlarında hidrofobosite göstererek hidrofobik olduğunu tespit etmişlerdir.

Binetti ve ark. (2013), mayaların hidrofobosite özelliklerinin %45,3 ile %85,3 arasında değişim gösterdiğini ve *S.cerevisiae*'nin en yüksek hidrofobik özelliğe sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda 85 numaralı suşta %36,0 olarak bulunmuştur.

3.7. Mayaların % Otoagregasyon Değerleri

Elde edilen otoagregasyon değerleri Tablo 3.5'de verilmiştir. Çalışmamızda tüm suşlar için inkübasyon süresinin uzamasıyla otoagregasyon yüzdelerinin arttığı belirlenmiştir. Tüm mayalarda % otoagregasyon değerlerini incelendiğinde 2 saat sonunda ortalama %18,72, 4 saat sonunda %35,31 ve 24 saat sonunda %86,57 olarak istatistiksel olarak artış olduğu tespit edilmiştir ($P>0,05$). Probiyotik bir mayanın otoagregasyonu en az % 30-60 olmalıdır (Bautista-Gallego ve ark., 2013; Binetti ve ark., 2013; Gil-Rodríguez ve ark., 2015). 24 saatin sonunda tüm izolatlarda % otoagregasyon değeri %60'ın üzerinde tespit edilmiştir. Tablo 3.5'de görüldüğü gibi izolatlarda en yüksek otoagregasyon yüzdesi 24. saatte görülmüş ve 24 saatin sonunda %100'e yaklaşmıştır. Probiyotik mikroorganizmalar için bu durum istenmektedir.

Ogunremi ve ark. (2015b), tüm izolatlarda inkübasyon süresi arttıkça otoagregasyon oranının arttığını gözlemlemiştir. Bu sonuçlar, bizim sonuçlarımıza benzerdir. Ananas kabuğu ve pulpasından elde edilen maya izolatlarında otomatik toplanma aktiviteleri incelendiğinde, tüm örneklerin 2 saatlik inkübasyon sonrası otomatik toplanma kapasitesi %16'nın altında, 24 saatlik inkübasyon sonrası ise %96'ya yükseldiği belirlenmiştir (Amorim ve ark., 2018). Bonatsou ve ark. (2018), Kalamata'da siyah zeytinlerin doğal fermentasyonunda yer alan mayaların otoagregasyon yeteneklerinin %72-91 arasında olduğunu belirlemiştir.

Bizim çalışmamızda olduğu gibi, Gil-Rodríguez ve ark., (2015) maya kültürlerinin 2 saatlik inkübasyon için yüksek düzeyde değişkenlik gösterdiğini ve 4 saatlik inkübasyon sonunda yüksek agregasyon yüzdelerine ulaştığı bildirilmiştir. Oliveira ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada *S. boulardii*'yi kontrol suş olarak kullanmışlardır ve bizim 85 numaralı izolatımıza benzer olarak 2 saatlik inkübasyon için %25,5 otoagregasyon kapasitesine ulaştığını, 4 ve 24 saatlik inkübasyondan sonra %34,75 ve 77,05 otoagregasyon kapasitesine ulaştığını belirtmişlerdir. Otoagregasyon, hücre yüzeyinin fiziko-kimyasal özellikleri, ortamdaki Ca^{+2} iyonlarının veya mannoz varlığı, inoküle edilen kültürün inkübasyon süresi veya uygulanan yöntemlerin farklı olması gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Powel ve ark., 2003).

Tablo 3. 5. Maya suşlarının % otoagregasyon sonuçları.

İzolat	2 saat	4 saat	24 saat
1	19,9±0,2	41,8±0,1	79,6±2,2
2	17,3±0,0	42,2±0,0	90,0±0,0
3	14,0±0,0	33,6±0,2	82,2±0,0
4	16,9±0,0	32,1±0,1	77,7±0,0
5	10,8±0,1	30,9±0,0	86,1±0,0
6	15,2±0,0	34,1±0,0	79,5±0,0
7	12,6±0,0	37,9±0,0	82,5±0,0
8	19,5±0,0	56,9±0,0	88,2±0,0
9	10,1±0,1	30,1±0,0	88,6±0,0
10	09,1±0,0	27,4±0,2	87,4±0,0
11	31,2±0,1	70,1±0,0	94,1±0,0
12	11,7±0,0	32,0±0,1	75,1±1,2
13	28,5± 0,2	62,1±0,0	93,7±0,0
14	43,1±0,2	71,9±0,1	91,5±0,0
15	09,1±0,2	13,8±0,0	64,5±0,8
16	26,2±0,2	56,6±0,0	88,6±0,0
17	18,1±0,3	35,7±0,0	75,9±0,0
18	09,1±0,0	28,5±0,0	85,7±0,0
19	10,8±0,0	33,8±0,0	82,4±0,1
20	07,7±0,0	29,4±0,0	88,9±0,0
21	09,3±0,1	29,6±0,0	91,6±0,0
22	05,2±0,0	21,9±0,1	73,8±0,0
23	08,1±0,0	31,6±0,0	88,0±0,0
24	12,1±0,3	15,8±0,2	76,1±0,1
25	12,6±0,0	35,5±0,0	87,3±0,0
26	24,9±0,0	00,0± 0,0	86,5±0,0
27	23,4±0,0	56,8±0,1	88,5±0,0
28	17,1±0,2	33,7±0,3	94,8±0,2
29	17,0±0,0	33,8±0,1	99,3±0,0
30	14,6±0,1	33,9±0,2	99,4±0,0
31	18,3±0,2	35,5±0,1	100,0±0,0
32	15,8±0,0	34,7±0,1	89,3±0,0
33	00,3±0,5	00,0±0,0	100,0±0,0
34	00,0 ±0,0	00,0±0,0	100,0±0,0
35	06,2±1,4	17,7±1,3	100,0±0,0
36	00,0 ±0,0	00,0±0,0	100,0±0,0
37	11,9±0,2	25,6±0,2	91,8±0,0
38	21,6±0,0	41,2±0,3	96,6±0,0
39	24,3±2,0	40,7±0,1	88,7±0,0
40	24,3±0,0	34,1±0,1	92,3±0,2
41	18,1±0,1	36,0±0,0	92,0±0,0
42	24,1±5,8	46,5±3,9	100,0±0,0
43	22,8±0,8	45,8±0,1	97,7±0,0
44	12,3±0,4	30,9±0,1	95,6±0,0
45	18,4±0,4	42,3±0,2	97,3±0,0
46	16,1±0,1	38,4±0,0	86,9±0,0

Tablo 3.5. (Devamı) Maya suşlarının % otoagregasyon sonuçları.

İzolat	2 saat	4 saat	24 saat
47	12,2±0,0	32,3±0,0	93,3±0,0
48	02,0±0,5	10,0±0,4	100,0±0,0
49	04,2±0,2	14,1±0,4	97,4±0,1
50	14,4±0,0	31,8±0,4	96,3±0,0
51	00,0±0,0	00,0±0,0	100,0±0,0
52	02,0±1,1	32,7±0,2	100,0±0,0
53	22,8±0,2	54,1± 0,0	98,3±0,0
54	27,3±0,0	32,2±0,0	80,0±0,0
55	24,0±0,0	32,6±0,2	92,2±0,0
56	26,9±0,0	36,1±0,1	75,7±0,0
57	20,8±0,1	30,9±0,0	84,1±0,0
58	25,2±0,0	39,1±0,0	75,5±0,0
59	22,6±0,0	33,9±0,0	84,5±0,0
60	29,5±0,0	46,9±0,0	86,2±0,0
61	20,1±0,1	40,1±0,0	82,6±0,0
62	19,1±0,0	37,4±0,2	70,4±0,0
63	41,2±0,1	60,1±0,0	84,1±0,0
64	21,7±0,0	42,0±0,1	65,1±1,2
65	38,5± 0,2	52,1±0,0	83,7±0,0
66	53,1±0,2	61,9±0,1	81,5±0,0
67	19,1±0,2	23,8±0,0	74,5±0,8
68	36,2±0,2	58,6±0,0	78,6±0,0
69	28,1±0,3	45,7±0,0	65,9±0,0
70	19,1±0,0	38,5±0,0	75,7±0,0
71	20,8±0,0	43,8±0,0	72,4±0,1
72	17,7±0,0	39,4±0,0	78,9±0,0
73	19,3±0,1	19,6±0,0	81,6±0,0
74	15,2±0,0	31,9±0,1	78,8±0,0
75	18,1±0,0	41,6±0,0	78,0±0,0
76	22,1±0,3	25,8±0,2	66,1±0,1
77	22,6±0,0	33,5±0,0	77,3±0,0
78	14,9±0,0	24,0± 0,0	76,5±0,0
79	33,4±0,0	46,8±0,1	78,5±0,0
80	27,1±0,2	43,7±0,3	84,8±0,2
81	27,0±0,0	43,8±0,1	89,3±0,0
82	24,6±0,1	34,9±0,2	82,4±0,0
83	28,3±0,2	38,5±0,1	100,0±0,0
84	25,8±0,0	37,7±0,1	93,3±0,0
85	25,3±0,5	47,0±0,0	100,0±0,0

3.8. Mayaların % Koagregasyon Değerleri

Maya suşlarının koagregasyon yetenekleri *E.coli* ATCC 25922 ile %95,7, *S. Typhimurium* ATCC 14028 ile %91,9, *S. aureus* ATCC 25923 ile %95,1 ve *L.*

monocytogenes ATCC 7644 ile %88,7 oranlarında olacak şekilde en yüksek bulunmuştur (Tablo 3.6).

Bu araştırmada koagregasyon yeteneğinin inkübasyon süresine ve suşuna bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu test çalışmasında, test edilen tüm suşlar, *E.coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 ile koagregasyon kabiliyeti göstermiştir. Nijerya'daki geleneksel tahıl bazlı fermente gıda ürünlerinden izole edilen maya suşlarının birlikte toplanma aktiviteleri %57-71 arasında bulunmuştur (Ogunremi ve ark., 2015b). Köy yoğurtlarından izole edilen 4 adet *C. humicola*, 2 adet *S. cerevisiae* ve 9 adet *S. kefir* maya suşlarının *E. coli* ATCC 25922 ile koagregasyonlarını araştırmış ve elde edilen sonuçlar sırası ile; (%46,1-51,87), (%21,26-80,46) ve (%36,82-60,06) arasında bizim sonuçlara benzer bulunmuştur (Uysal, 2016).

Tablo 3. 6. Maya suşlarının % koagregasyon sonuçları.

İzolat	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644
1	81,9±0,1	50,0±0,1	87,0±0,2	57,8±0,0
2	89,9±0,0	66,6±0,0	88,1±0,0	71,9±0,0
3	89,4±0,0	63,8±0,1	86,5±0,0	71,1±0,0
4	88,7±0,0	69,1±0,0	87,8±0,0	72,7±0,0
5	82,6±0,3	60,8±0,0	85,6±0,0	69,7±0,0
6	94,3±0,0	71,9±0,0	90,5±0,0	85,0±0,1
7	84,4±0,0	79,0±0,1	87,3±0,0	74,4±0,0
8	90,6±0,0	72,5±0,1	90,5±0,0	77,4±0,0
9	85,9±0,0	72,2±0,0	89,4±0,0	75,8±0,0
10	85,1±0,0	73,6±0,0	89,2±0,0	74,0±0,0
11	87,1±0,0	74,3±0,0	91,5±0,0	84,5±0,0
12	74,7±0,1	53,8±0,0	78,8±0,0	66,2±0,0
13	87,4±0,0	74,3±0,0	94,0±0,0	87,4±0,0
14	91,3±0,2	74,6±0,2	93,5±0,0	83,9±0,0
15	56,1±0,0	56,5±0,0	80,5±0,1	59,6±0,1
16	89,8±0,0	72,6±0,0	93,8±0,0	85,3±0,0
17	72,7±0,2	61,3±0,0	87,0±0,1	69,8±0,0
18	87,0±0,0	75,0±0,0	95,1±0,0	78,7±0,0
19	88,7±0,0	71,4±0,0	88,4±0,1	79,3±0,1
20	87,4±0,0	73,1±0,0	89,3±0,0	73,0±0,1
21	86,1±0,0	66,6±0,0	85,4±0,0	71,7±0,0
22	82,5±0,0	49,5±0,0	80,5±0,0	54,0±0,1
23	94,1±0,0	47,3±0,0	87,7±0,0	72,9±0,0
24	82,7±0,0	00,0±0,0	67,3±0,2	29,9±0,1
25	90,5±0,0	91,9±0,5	00,0±0,0	41,0±0,1
26	93,9±0,0	80,6±0,8	55,0±0,2	62,0±0,0

Tablo 3.6. (Devamı) Maya suşlarının % koagregasyon sonuçları.

İzolat	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644
27	95,7±0,0	89,6±0,0	86,2±0,8	33,0±0,4
28	67,2±0,2	46,3±0,1	78,2±0,0	53,9±0,1
29	75,7±0,0	58,7±0,0	84,0±0,0	69,1±0,0
30	76,2±0,0	58,9±0,0	82,4±0,0	60,1±0,0
31	79,6±0,0	63,1±0,0	85,5±0,0	70,6±0,0
32	73,3±0,0	59,2±0,0	83,6±0,0	66,1±0,0
33	00,0±0,0	21,3±0,0	61,2±0,1	32,0±0,0
34	00,0±0,0	23,7±0,0	75,8±0,0	27,5±0,1
35	00,0±0,0	20,5±0,0	73,5±0,0	27,3±0,1
36	00,0±0,0	19,1±0,0	79,5±0,0	32,2±0,0
37	55,2±0,0	49,1±0,0	77,6±0,0	64,0±0,0
38	58,1±0,0	47,0±0,0	79,2±0,0	59,6±0,0
39	74,6±0,0	58,5±0,0	81,9±0,0	67,9±0,0
40	71,9±0,0	54,3±0,0	81,0±0,0	67,9±0,0
41	68,7±0,0	57,7±0,0	82,2±0,0	70,6±0,0
42	39,2±0,1	35,0±0,0	75,6±0,0	50,9±0,0
43	74,7±0,0	48,6±0,0	79,6±0,0	68,3±0,0
60	77,0±0,0	65,0±0,0	85,1±0,0	88,7±0,0
61	78,7±0,0	61,4±0,0	78,4±0,1	77,3±0,1
62	77,4±0,0	76,1±0,0	79,3±0,0	74,0±0,1
63	76,1±0,0	76,6±0,0	75,4±0,0	74,7±0,0
64	72,5±0,0	59,5±0,0	70,5±0,0	64,0±0,1
65	84,1±0,0	57,3±0,0	77,7±0,0	76,9±0,0
66	72,7±0,0	00,0±0,0	77,3±0,2	79,9±0,1
67	80,5±0,0	81,9±0,5	00,0±0,0	51,0±0,1
68	83,9±0,0	70,6±0,8	65,0±0,2	72,0±0,0
69	85,7±0,0	79,6±0,0	76,2±0,8	43,0±0,4
70	77,2±0,2	56,3±0,1	76,2±0,0	63,9±0,1
71	65,7±0,0	68,7±0,0	74,0±0,0	68,1±0,0
72	66,2±0,0	68,9±0,0	72,4±0,0	64,1±0,0
73	69,6±0,0	73,1±0,0	75,5±0,0	74,6±0,0
74	63,3±0,0	69,2±0,0	73,6±0,0	64,1±0,0
75	00,0±0,0	31,3±0,0	71,2±0,1	42,0±0,0
76	00,0±0,0	33,7±0,0	74,8±0,0	37,5±0,1
77	00,0±0,0	30,5±0,0	71,5±0,0	37,3±0,1
78	00,0±0,0	29,1±0,0	77,5±0,0	42,2±0,0
79	65,2±0,0	59,1±0,0	74,6±0,0	54,0±0,0
80	68,1±0,0	57,0±0,0	75,2±0,0	58,6±0,0
81	64,7±0,0	58,6±0,0	74,6±0,0	78,3±0,0
82	62,1±0,0	72,0±0,0	77,1±0,0	79,7±0,0
83	78,0±0,0	69,3±0,0	70,0±0,0	78,5±0,0
84	78,8±0,0	66,1±0,0	80,0±0,0	72,4±0,0
85	86,6±0,0	69,9±0,0	80,7±0,0	76,8±0,0

3.9. Mayaların Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

Mayaların antimikrobiyal özellikleri Tablo 3.7’de verilmiştir. Elde ettiğimiz mayaların çoğunun *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *B.cereus*, *C. sakazakii* ATCC 29544, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923, *S. Typhimurium* ATCC 140828’e karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz mayaların %97,65’i *E. coli* ATCC 25922’e, %65,88’i *E. coli* O157:H7’ye, %20,00’i *B.cereus*’e, % 81, 18’i *C. sakazakii* ATCC 29544’e, %91,76’sı *L. monocytogenes* ATCC 7644’e, %48,24’ü *S. aureus* ATCC 25923’e ve %75,29’u *S. Typhimurium* ATCC 140828’e karşı antimikrobiyel etki göstermiştir.

Mayalardaki antimikrobiyal aktiviteler, gıdaların raf ömrünü uzatır. Ayrıca probiyotik suşunun rekabet avantajına sahip olması ve bağırsakta patojenlerin kolonizasyonunu engellemesi önemlidir. Silva ve ark. (2011), Portekiz zeytinlerinden izole edilen mayaların *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* ve *S. aureus* patojenlerine karşı antimikrobiyal etkili olduğunu belirlemiştir. Rajkowska ve Kunicka (2012) yaptıkları çalışmada *S. boulardii*’nin bazı patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkisini değerlendirmişlerdir. *S. boulardii*’nin *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *S. aureus* gibi patojenlerin hücre sayısında istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *Campylobacter jejuni* ve *Enterococcus faecalis*’in *S. boulardii* hücre duvarına bağlanmasına rağmen, *L. monocytogenes* ve *P. aeruginosa*’nın hücre duvarına bağlanmadığını belirtmişlerdir. Önceki çalışmalar *S. boulardii* suşlarının *S. aureus*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *C. perfringens*, *Salmonella* spp. ve *Candida albicans* gibi patojenleri inhibe ettiğini göstermektedir (Canani ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda da benzer olarak 85 numaralı izolatın (*S. boulardii*) *E. coli*, *C. sakazakii*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*’a karşı antimikrobiyel aktivite göstermiştir.

S. boulardii maya hücre yüzeylerine kalıcı olarak bağlanarak, göstermiş olduğu proteolitik aktivite ve sterik engellemesi sayesinde *C. difficile* ’nin hücrelere yapışmasını engelleyerek gibi farklı yollar ile antibakteriyel aktivite gösterebilmektedir (Tasteyre ve ark., 2002). Diğer mekanizmalar ise ortamdaki substratların kullanılması, çevrenin değiştirilmesi ve glikoproteinler, proteinler, poliaminler, proteaz serin enzimi, alkalın fosfomono esterleri ve kısa zincirli yağ asitleri gibi çeşitli bileşiklerin salgılanmasıdır (Lukaszewicz, 2012).

Syal ve Vohra (2013) geleneksel fermente gıdalardan izole ettikleri mayaların antimikrobiyal aktivitesini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada *S. cerevisiae* ve *C. tropicalis* suşlarının *Salmonella* sp., *S. aureus* 'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ragavan ve Das (2017) yaptıkları çalışmada çeşitli gıda kaynaklarından izole ettikleri 20 maya izolatından 5'inin *Bacillus* sp., *E. coli* sp. ve *Staphylococcus* sp. bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Fakruddin ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada meyve suyundan izole ettikleri *S. cerevisiae*'nin *S. aureus* ATCC25923 üzerinde 10,3 mm, *E. coli* ATCC25922 üzerinde 11,0 mm zonlar oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Tablo 3. 7. Mayaların patojen bakteriler karşısında antimikrobiyal zon çapları (mm).

İzolat	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> O157H7	<i>B.cereus</i>	<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	<i>L. mono.</i> ATCC 7644	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 140828
1	15,5±1,5	12,7±2,2	00,0±0,0	12,0±0,0	10,5±2,5	00,0±0,0	12,0±1,0
2	16,5±1,5	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0	12,5±2,5	00,0±0,0	13,0±2,0
3	10,0±2,0	00,0±0,0	12,0±2,0	20,0±0,0	14,0±3,0	00,0±0,0	00,0±0,0
4	15,0±1,0	00,0±0,0	11,0±1,0	00,0±0,0	14,5±2,5	00,0±0,0	00,0±0,0
5	13,0±4,0	00,0±0,0	00,0±0,0	03,5±3,5	14,2±4,2	12,0±2,0	15,0±2,0
6	15,0±5,0	00,0±0,0	00,0±0,0	13,7±1,7	17,5±7,5	00,0±0,0	0,0±0,0
7	17,5±3,5	00,0±0,0	00,0±0,0	10,5±0,5	15,0±6,0	00,0±0,0	07,2±5,2
8	20,5±6,5	00,0±0,0	00,0±0,0	11,0±0,0	14,0±0,0	00,0±0,0	10,5±4,5
9	18,5±0,5	00,0±0,0	00,0±0,0	10,5±2,5	13,0±6,0	00,0±0,0	12,5±4,5
10	12,7±1,2	12,0±4,0	00,0±0,0	22,5±0,5	15,5±0,5	10,0±1,0	11,5±1,5
11	13,0±1,0	15,5±4,5	00,0±0,0	10,0±6,0	15,0±3,0	12,0±1,0	00,0±0,0
12	14,0±5,0	13,2±1,2	00,0±0,0	00,0±0,0	15,0±1,0	00,0±0,0	12,5±6,5
13	12,5±0,5	17,2±8,2	00,0±0,0	25,0±0,0	14,5±0,5	00,0±0,0	11,2±0,7
14	12,7±0,2	18,2±1,7	00,0±0,0	00,0±0,0	14,5±0,5	00,0±0,0	14,0±6,0
15	20,5±1,5	12,0±2,0	00,0±0,0	00,0±0,0	13,0±1,0	00,0±0,0	14,5±2,5
16	12,5±0,5	16,7±0,2	00,0±0,0	11,0±5,0	15,5±3,5	11,0±1,0	14,5±1,5
17	14,0±1,0	12,7±3,2	00,0±0,0	11,0±1,0	14,0±6,0	00,0±0,0	11,2±2,7
18	14,0±0,0	14,7±0,7	00,0±0,0	11,0±3,0	15,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0
19	20,7±1,2	00,0±0,0	00,0±0,0	10,0±0,0	15,5±5,5	10,0±0,0	17,0±0,0
20	20,0±6,0	15,7±3,2	00,0±0,0	11,0±0,0	15,0±0,0	11,0±1,0	12,7±0,2
21	15,0±0,0	20,0±6,0	00,0±0,0	17,5±1,5	11,5±3,5	12,0±2,0	15,7±0,7
22	15,5±4,5	15,0±1,0	00,0±0,0	10,0±1,0	14,0±2,0	00,0±0,0	00,0±0,0
23	14,0±6,0	12,5±2,5	00,0±0,0	15,0±2,0	15,5±2,5	00,0±0,0	00,0±0,0
24	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0	15,0±0,0	14,0±0,0	15,0±0,0	00,0±0,0
25	30,2±1,2	00,0±0,0	00,0±0,0	15,5±4,5	13,0±4,0	00,0±0,0	13,0±0,0
26	17,0±0,0	00,0±0,0	17,0±0,0	00,0±0,0	15,5±3,5	00,0±0,0	15,2±2,7
27	15,5±2,5	00,0±0,0	00,0±0,0	14,0±4,0	12,5±0,5	00,0±0,0	00,0±0,0

Tablo 3.7. (Devamı) Mayaların patojen bakteriler karşısında antimikrobiyal zon çapları (mm).

	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>B.cereus</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>L. mono.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>
İzolat	ATCC 25922	O157H7		ATCC 29544	ATCC 7644	ATCC 25923	ATCC 140828
29	13,2±1,2	15,5±0,5	00,0±0,0	15,0±0,0	15,0±3,0	00,0±0,0	17,5±1,5
30	17,0±1,0	00,0±0,0	00,0±0,0	10,0±0,0	17,0±1,0	00,0±0,0	13,5±0,5
31	11,0±7,0	20,0±5,0	00,0±0,0	16,0±0,0	15,0±4,0	12,0±0,0	12,2±0,7
32	13,2±1,2	13,5±0,5	00,0±0,0	00,0±0,0	17,5±0,5	13,0±0,0	14,5±1,5
33	13,7±4,7	00,0±0,0	00,0±0,0	17,5±0,5	18,0±6,0	00,0±0,0	15,0±6,0
34	20,2±0,2	00,0±0,0	00,0±0,0	15,0±1,0	21,5±5,5	00,0±0,0	10,0±3,0
35	15,5±4,5	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0	0,00±0,0	00,0±0,0	17,0±4,0
44	12,5±4,5	00,0±0,0	22,0±2,0	14,7±2,7	16,7±0,2	17,0±0,0	13,0±5,0
45	18,7±0,2	14,5±5,5	00,0±0,0	00,0±0,0	23,0±1,0	00,0±0,0	15,7±0,2
46	10,0±5,0	15,7±0,7	25,0±2,0	14,5±0,5	15,5±1,5	00,0±0,0	00,0±0,0
47	13,7±1,7	14,5±0,5	00,0±0,0	00,0±0,0	15,5±0,5	12,0±0,0	12,5±1,5
48	11,0±1,0	15,0±2,0	00,0±0,0	17,5±2,5	17,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0
49	00,0±0,0	15,2±0,2	00,0±0,0	00,0±0,0	15,0±0,0	10,0±0,0	10,7±0,7
50	10,0±3,0	14,0±6,0	00,0±0,0	20,2±0,7	13,0±4,0	14,0±0,0	14,0±1,0
51	15,0±3,0	15,2±2,2	00,0±0,0	13,5±1,5	17,0±2,0	00,0±0,0	00,0±0,0
52	12,5±7,5	13,5±1,5	00,0±0,0	17,0±1,0	14,5±0,5	00,0±0,0	00,0±0,0
53	14,7±0,7	14,5±4,5	00,0±0,0	15,7±4,7	15,0±1,0	13,0±0,0	13,0±0,0
54	14,0±2,0	23,2±1,7	00,0±0,0	12,0±2,0	10,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0
55	14,7±0,2	12,5±0,5	00,0±0,0	14,0±3,0	00,0±0,0	15,0±0,0	15,5±7,5
56	15,2±4,2	22,7±3,2	00,0±0,0	17,0±2,0	00,0±0,0	13,0±0,0	13,2±5,2
57	14,0±4,0	14,7±0,2	00,0±0,0	15,5±4,5	00,0±0,0	15,0±2,0	15,0±1,0
58	14,5±0,5	00,0±0,0	00,0±0,0	22,0±4,0	15,0±0,0	16,0±0,0	16,5±0,5
59	17,2±2,2	17,0±1,0	00,0±0,0	23,7±2,7	00,0±0,0	20,0±3,0	20,5±4,5
60	15,2±0,7	14,5±3,5	00,0±0,0	25,0±5,0	00,0±0,0	14,0±0,0	14,5±6,5
61	11,2±3,2	00,0±0,0	00,0±0,0	10,2±1,7	00,0±0,0	16,0±0,0	17,0±0,0
62	13,5±1,5	13,7±2,2	00,0±0,0	11,0±0,0	12,5±2,5	00,0±0,0	11,0±1,0
63	14,5±1,5	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0	10,5±2,5	00,0±0,0	12,0±2,0
64	11,0±2,0	00,0±0,0	11,0±2,0	18,0±0,0	13,0±3,0	00,0±0,0	00,0±0,0
65	14,0±1,0	00,0±0,0	10,0±1,0	00,0±0,0	13,5±2,5	00,0±0,0	00,0±0,0
66	12,0±4,0	00,0±0,0	00,0±0,0	13,5±3,5	12,2±4,2	11,0±2,0	14,0±2,0
67	14,0±5,0	00,0±0,0	00,0±0,0	12,7±1,7	157,5±7,5	00,0±0,0	00,0±0,0
68	16,5±3,5	00,0±0,0	00,0±0,0	11,5±0,5	13,0±6,0	00,0±0,0	10,2±5,2
69	21,5±6,5	00,0±0,0	00,0±0,0	12,0±0,0	12,0±0,0	00,0±0,0	11,5±4,5
70	17,5±0,5	00,0±0,0	00,0±0,0	12,5±2,5	12,0±6,0	00,0±0,0	10,5±4,5
71	13,7±1,2	14,0±4,0	00,0±0,0	20,5±0,5	14,5±0,5	10,0±1,0	10,5±1,5
72	12,0±1,0	12,5±4,5	00,0±0,0	11,0±6,0	14,0±3,0	10,0±1,0	00,0±0,0
73	13,0±5,0	14,2±1,2	00,0±0,0	00,0±0,0	13,0±1,0	00,0±0,0	11,5±6,5
74	11,5±0,5	16,2±8,2	00,0±0,0	22,0±0,0	12,5±0,5	00,0±0,0	10,2±0,7
75	11,7±0,2	16,2±1,7	00,0±0,0	00,0±0,0	13,5±0,5	00,0±0,0	13,0±6,0
76	18,5±1,5	11,0±2,0	00,0±0,0	00,0±0,0	14,0±1,0	00,0±0,0	13,5±2,5
77	11,5±0,5	15,7±0,2	00,0±0,0	12,0±5,0	13,5±3,5	08,0±1,0	13,5±1,5
78	13,0±1,0	11,7±3,2	00,0±0,0	12,0±1,0	12,0±6,0	00,0±0,0	10,2±2,7

Tablo 3.7. (Devamı) Mayaların patojen bakteriler karşısında antimikrobiyal zon çapları (mm).

	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>B.cereus</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>L. mono.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>
İzolat	ATCC 25922	O157H7		ATCC 29544	ATCC 7644	ATCC 25923	ATCC 140828
80	18,7±1,2	00,0±0,0	00,0±0,0	11,0±0,0	14,5±5,5	11,0±0,0	16,0±0,0
81	18,0±6,0	14,7±3,2	00,0±0,0	10,0±0,0	13,0±0,0	12,0±1,0	11,7±0,2
82	14,0±0,0	10,0±6,0	00,0±0,0	16,5±1,5	10,5±3,5	11,0±2,0	14,7±0,7
83	14,5±4,5	12,0±1,0	00,0±0,0	10,0±1,0	12,0±2,0	00,0±0,0	00,0±0,0
84	13,0±6,0	10,5±2,5	00,0±0,0	14,0±2,0	14,5±2,5	00,0±0,0	00,0±0,0
85	12,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0	14,0±0,0	14,0±0,0	15,0±0,0	00,0±0,0

Mayaların Antibiyotiğe Dirençlerinin Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre izole edilen tüm maya suşlarının test edilen tüm antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği doğrulanmıştır. Bu özellik sayesinde probiotik mayalar, hastalık sırasında reçete edilen antibiyotiklerden etkilenmeden bağırsak mikrobiyotasını koruyarak ishali önlemede kullanılabilir. Maya suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılık sonuçları Tablo 3.8’de verilmiştir. Tabloda sadece duyarlı olanların değerleri verilmiştir. Bu çalışmada 28, 29 suşlarının tetrasiklin, eritromisin ve kloramfenikole duyarlı olduğu tespit edildi. 48 suşunun tetrasiklin, 65 suşunun ise gentamisin duyarlı bulunmuştur. Geriye kalan 81 izolat amoksisilin 20 µg, ampisilin 10 µg, gentamisin 10 µg, tetrasiklin 30 µg, trimetoprim 5 µg, eritromisin 15 µg ve kloramfenikol 30 µg antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000) tarafından belirlenen kırılma noktalarına göre değerlendirilmiştir.

Ananas kabuğu ve pulpasından elde edilen mayaların antibiyotik direncini belirlemek için streptomisin, tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, penisilin ve ampisilin antibiyotikleri kullanılmış ve tüm mayaların antibiyotiklere karşı dirençli olduğu bulunmuştur (Amorim ve ark., 2018). Perricone ve ark. (2014), ekşi mayadan izole edilen maya izolatlarının eritromisin, gentamisin, streptomisin, kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençli olduğunu bulmuşlardır.

Ragavan ve Das (2017) yaptıkları çalışmada çeşitli gıda kaynaklarından izole ettikleri 20 maya izolatından 5’inin ampicillin (20 µg/ml), gentamycin (10 µg/ml), ketoconazole (10 µg/ml), levofloxacin (10 µg/ml), tetracyclin (30 µg/ml), tigecyclin (20 µg/ml), ve trimethoprim (20 µg/ml)) antibiyotiklerine direnç gösterdiğini belirlemişlerdir.

Fakruddin ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'nin tetracycline (R), trimethoprim-sulphamethoxazole, ampicillin, gentamycin, penicillin, nitrofurantoin, polymixin B ve nalidixic acid antibiyotiklerine dirençli olduğunu tespit etmişlerken, streptomycin, cephalexin, ceftriaxone, chloramphenicol, cefradine ve ceftazidime antibiyotiklerine karşı ise duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir

Elde edilen sonuçlara göre *S. boulardii* suşları test edilen tüm antibakteriyel antibiyotiklere karşı dirençli bulunmuştur (Tablo 3.8). Elde edilen bu sonuçlar bakteriyel enfeksiyonların tedavisi sırasında *S. boulardii*'nin antibakteriyel antibiyotikler tarafından etkilenmeyeceğini göstermiştir.

Tablo 3. 8. Maya suşlarının antibiyotiklere karşı gösterdiği duyarlılık test sonuçları.

İzolat	Gentamisin 10 µg	Tetrasiklin 30 µg	Trimetoprim 5 µg	Eritromisin 15 µg	Kloramfenikol 30 µg
28	R	D (20 mm)	R	D (22 mm)	D (19 mm)
29	R	D (21 mm)	R	D (23 mm)	D (23 mm)
48	R	D (23 mm)	R	R	R
65	D (17 mm)	R	R	R	R

* Dirençli (R), Orta Duyarlı (O) ve Duyarlı (D)

3.10. Mayaların Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Elde edilen maya suşlarının antioksidan aktivite değerleri Şekil 3.1'de ve Tablo 3.9'da verilmiştir. Test edilen tüm maya suşlarında bozulmamış hücrelerin antioksidan aktivitesi hücre içi ekstraktlarından daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.1). 8. izolat ve 9. izolat bozulmamış hücreler (sırasıyla $54,06 \pm 0,1$ ve $52,87 \pm 0,0$); 1. ve 50. izolatların sırasıyla hücre içi ekstraktları ($8,84 \pm 0,1$ ve $8,80 \pm 0,0$) en yüksek DPPH radikal yakalama aktivitesi sergilemiştir (Tablo 3.9). Probiyotik mikroorganizmalar, mide ülserleri, obezite, kardiyovasküler ve kronik hastalıklara karşı antioksidan etkileri sayesinde koruma sağlayabilirler (Dumitrescu ve ark., 2018).

Tablo 3. 9. Mayaların antioksidan aktivitesi (%).

İzolat	Bozulmamış Hücrelerin	Hücre İçi Ekstraktlarının	İzolat	Bozulmamış Hücrelerin	Hücre İçi Ekstraktlarının
1	$1,58 \pm 0,5$	$8,84 \pm 0,1$	44	$16,89 \pm 0,0$	$1,16 \pm 0,0$
2	$13,38 \pm 0,1$	$1,53 \pm 0,0$	45	$20,11 \pm 0,0$	$8,61 \pm 0,0$
3	$14,54 \pm 0,0$	$2,83 \pm 0,0$	46	$16,46 \pm 0,0$	$6,79 \pm 0,0$
4	$4,54 \pm 0,0$	$4,79 \pm 0,0$	47	$16,70 \pm 0,1$	ND
5	$36,35 \pm 0,0$	$4,79 \pm 0,0$	48	$18,90 \pm 0,0$	$6,36 \pm 0,0$

Tablo 3.9. (Devamı) Mayaların antioksidan aktivitesi (%).

İzolot	Bozulmamış Hücrelerin	Hücre İçi Ekstraktlarının	İzolot	Bozulmamış Hücrelerin	Hücre İçi Ekstraktlarının
6	42,33±0,0	5,95±0,0	49	24,24±0,0	6,60±0,1
7	47,84±0,0	1,91±0,0	50	20,87±0,0	8,80±0,0
8	54,06±0,1	ND	51	16,55±0,0	4,04±0,0
9	52,87±0,0	7,92±0,0	52	15,22±0,0	0,67±0,0
10	42,74±0,1	2,37±0,0	53	16,95±0,0	6,45±0,0
11	36,62±0,0	2,33±0,1	54	6,97±0,1	5,12±0,0
12	50,37±0,0	6,32±0,0	55	15,48±0,0	6,85±0,0
13	37,20±0,0	ND	56	16,40±0,0	6,97±0,1
14	37,61±0,0	6,90±0,0	57	13,91±0,3	2,35±0,3
15	39,96±0,0	7,31±0,0	58	17,03±0,0	6,30±0,0
16	36,76±0,0	ND	59	18,40±0,0	3,81±0,3
17	13,72±0,1	6,45±0,0	60	19,25±0,0	6,93±0,0
29	10,98±0,0	3,33±0,0	72	6,33±0,1	ND
30	19,56±0,0	0,88±0,0	73	8,39±0,4	ND
31	19,34±0,0	ND	74	4,54±0,0	6,33±0,1
32	21,38±0,0	ND	75	2,17±0,0	2,88±0,1
33	19,47±0,0	1,18±0,0	76	5,21±0,0	3,86±0,0
34	15,91±0,1	ND	77	5,73±0,0	4,94±0,1
35	15,01±0,0	5,81±0,1	78	5,94±0,1	4,53±0,0
36	12,91±0,0	4,90±0,0	79	0,84±0,0	4,99±0,0
37	18,07±0,0	1,81±1,0	80	0,77±0,0	0,77±0,0
38	18,07±0,0	4,54±0,0	81	4,99±0,0	0,84±0,0
39	16,10±1,0	7,97±0,0	82	4,53±0,0	5,48±0,3
40	19,66±0,4	7,96±0,0	83	4,94±0,1	5,73±0,0
41	9,71±0,7	5,99±0,1	84	3,86±0,0	5,22±0,0
42	11,26±0,0	ND	85	4,90±2,0	2,17±0,0
43	18,71±0,0	ND			

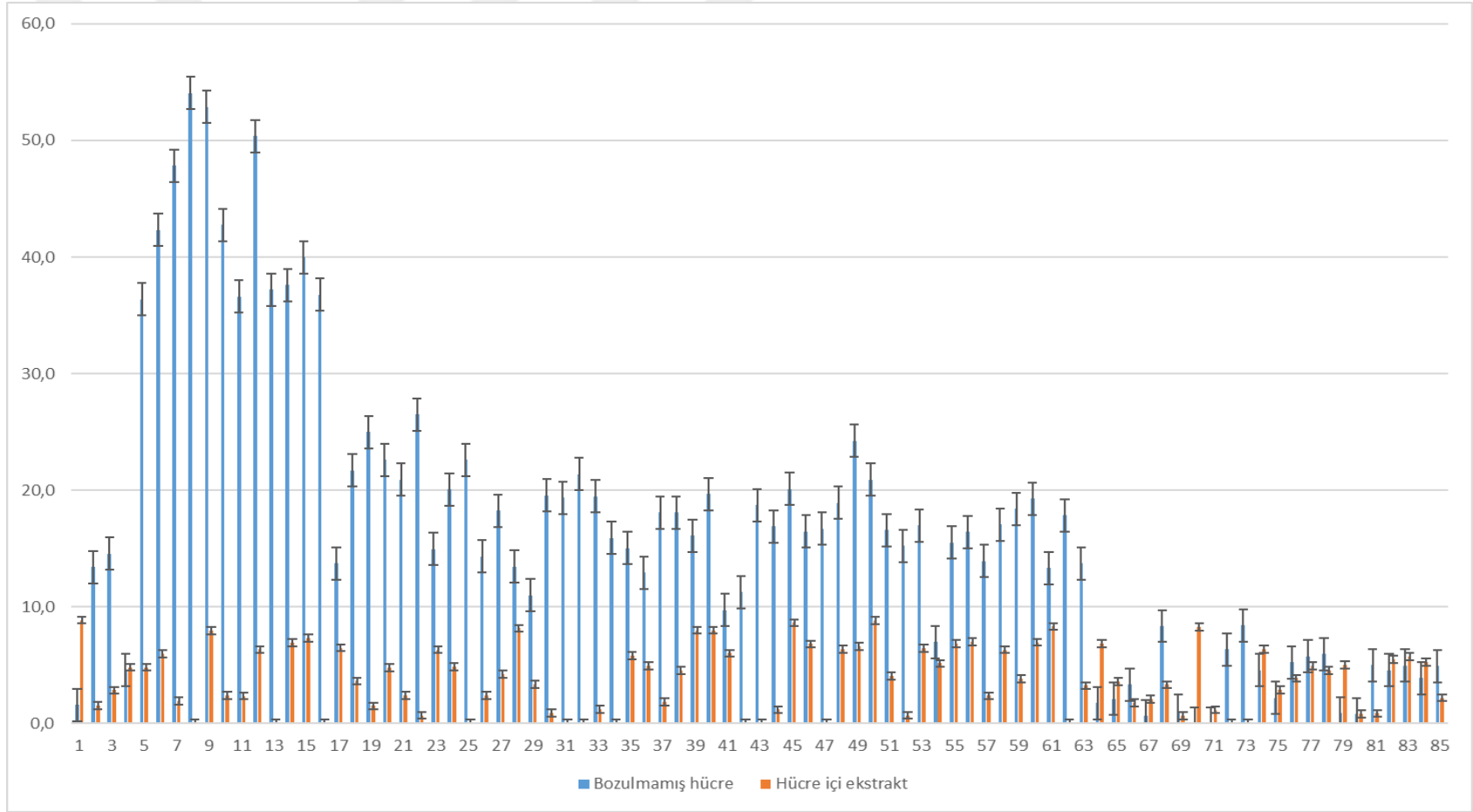
*ND: belirlenemedi.

Son zamanlarda, ürettikleri metabolitlerin çok çeşitli olması nedeniyle mayaların antioksidan aktiviteleri üzerine araştırmalar başlatılmıştır. Örneğin süperoksit dismutaz, katalaz, karotenoidler, resveratrol, ekzopolisakkarit ve lipitler, özellikle (1→3)-D-β-glukan ve serbest radikalleri temizleyen hücre duvarı mannoproteinleri ve konakçıdaki patolojik süreç riskini azaltabilir. Sonuçlar incelendiğinde, sağlam hücrelerin ekstraktan daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu görülmüştür. Bunun nedeni hücresel bileşiklerin yanı sıra hücre duvarlarında bulunan (1/3)-β-D-glukan ve β-glukanların yüksek içeriğine bağlı olabilmektedir. Maya antioksidan aktivitesinin esas olarak hücre duvarında bulunan (1/3)-b-D-glukan ve

diğer b-glukanların yüksek içeriğinden kaynaklandığına inanılmaktadır (Lara ve ark., 2019).

Gil-Rodriguez ve ark. (2015) mayaları antioksidan aktivite yüzdelerine göre beş gruba ayırmışlardır: çok düşük (<%20), düşük (%20-30), iyi (%30-40), çok iyi (%40-50) ve mükemmel (> %50 civarında). Bu gruplandırmaya dayanarak, mevcut çalışmada incelenen mayalardan 28 tane izolat çok düşük aktivite, 8 izolat düşük, 6 izolat iyi, 6 izolat çok iyi aktivite göstermiştir. Daha önce diğer yazarlar tarafından gözlemlendiği gibi suşlar arasındaki antioksidan aktivitesi farklı olabilmektedir. Ogunremi (2015b) yaptıkları çalışmada izole ettikleri mayaların %33,66-44,48 aralığındaki antioksidan aktiviteyi gösterdiğini tespit etmişlerdir.





Şekil 3. 1. Mayaların antioksidan değerleri.

3.11. Mayaların MALDITOF Analizi ile Belirlenmesi

Mayaların MALDITOF ile tanımlanmasından elde edilen sonuçlar Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3. 10. Mayaların MALDITOF ile elde edilen sonuçları.

İzolat	Maya	İzolat	Maya
1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	44	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
2	<i>Candida parapsilosis</i>	45	<i>Candida krusei</i>
3	<i>Candida parapsilosis</i>	46	<i>Candida krusei</i>
4	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	47	<i>Candida valida</i>
5	<i>Candida parapsilosis</i>	48	<i>Candida valida</i>
6	<i>Pichia kudriavzevii</i>	49	<i>Candida krusei</i>
7	<i>Candida krusei</i>	50	<i>Candida krusei</i>
8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
9	<i>Pichia membranifaciens</i>	52	<i>Candida krusei</i>
10	<i>Candida krusei</i>	53	<i>Candida keyfr</i>
11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54	<i>Candida keyfr</i>
12	<i>Candida valida</i>	55	<i>Candida parapsilosis</i>
13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56	<i>Candida parapsilosis</i>
14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57	<i>Candida parapsilosis</i>
15	<i>Candida valida</i>	58	<i>Candida parapsilosis</i>
16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59	<i>Candida parapsilosis</i>
17	<i>Kloeckera apiculata</i>	60	<i>Candida krusei</i>
18	<i>Candida krusei</i>	61	<i>Candida krusei</i>
19	<i>Candida krusei</i>	62	<i>Rhizopus arrhizus complex</i>
20	<i>Candida krusei</i>	63	<i>Geotrichum candidum</i>
21	<i>Candida krusei</i>	64	<i>Candida guilliermondi</i>
22	<i>Kloeckera apiculata</i>	65	<i>Candida guilliermondi</i>
23	<i>Candida krusei</i>	66	<i>Candida guilliermondi</i>
24	<i>Candida valida</i>	67	<i>Candida guilliermondi</i>
25	<i>Candida valida</i>	68	<i>Candida guilliermondi</i>
26	<i>Candida krusei</i>	69	<i>Candida krusei</i>
27	<i>Candida lambica</i>	70	<i>Candida krusei</i>
28	<i>Candida krusei</i>	71	<i>Candida rugosa</i>
29	<i>Candida krusei</i>	72	<i>Candida rugosa</i>
30	<i>Candida tropicalis</i>	73	<i>Candida rugosa</i>
31	<i>Candida tropicalis</i>	74	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
32	<i>Candida tropicalis</i>	75	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
33	<i>Candida krusei</i>	76	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
34	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	77	<i>Candida pulcherrima</i>
35	<i>Candida famata</i>	78	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
36	<i>Candida valida</i>	79	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
37	<i>Candida pelliculosa</i>	80	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
38	<i>Candida pelliculosa</i>	81	<i>Candida lambica</i>

Tablo 3.10. (Devamı) Mayaların MALDITOF ile elde edilen sonuçları.

İzolat	Maya	İzolat	Maya
39	<i>Candida krusei</i>	82	<i>Candida tropicalis</i>
40	<i>Candida krusei</i>	83	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
41	<i>Candida krusei</i>	84	<i>Rhizopus arrhizus complex</i>
42	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
43	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		

Tanımlanan 85 adet mayanın 1 adedi *Torulaspora delbrueckii*, 8 adedi *Candida parapsilosis*, 1 adedi *Metschnikowia pulcherrima*, 1 adedi *Pichia kudriavzevii*, 23 adedi *Candida krusei*, 15 adedi *Saccharomyces cerevisiae*, 1 adedi *Pichia membranifaciens*, 7 adedi *Candida valida*, 2 adedi *Kloeckera apiculata*, 2 adedi *Candida lambica*, 4 adedi *Candida tropicalis*, 1 adedi *Rhodotorula mucilaginosa*, 1 adedi *Candida famata*, 2 adedi *Candida pelliculosa*, 1 adedi *Kluyveromyces marxianus*, 1 adedi *Zygosaccharomyces bisporus*, 2 adedi *Candida keyfr*, 1 adedi *Rhizopus arrhizus complex*, 1 adedi *Geotrichum candidum*, 5 adedi *Candida guilliermondii*, 3 adedi *Candida rugosa*, 1 adedi *Candida pulcherrima*, 1 adedi *Rhizopus arrhizus complex* olarak tespit edilmiştir.

Silva ve ark. (2011) Portekiz salamura zeytinlerinden toplamda potansiyel probiyotik 16 türü başarıyla tanımlamışlardır. Bu türleri *Candida boidinii* (4), *Citeromyces matriensis*, *Pichia membranaefaciens* (14), *Pichia fermentans* (8), *Candida oleophila* (7), *Candida citrea* (3), *Candida sake*, *Candida silvae*, *Candida valida*, *Candida norvegica*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodospiridium capitatum*, *Torulaspora delbrueckii* (2), *Trichosporum pullulans*, *S. cerevisiae* (10) ve *Kloeckera apiculata* olarak tespit etmişlerdir.

Diosma ve ark. (2014), kefir tanelerinden mayaların probiyotik karakterizasyonunu yapmışlar ve toplamda 34 adet maya izolatu elde etmişlerdir. Bu izolatların 15 tanesinin *S. cerevisiae*'ye, 6 tanesinin *S. unisporus* 'a, 4 tanesinin *Issatchenkia occidentalis*'e ve 9 tanesinin *Kluyveromyces marxianus*'a ait olduğunu belirlemişlerdir.

3.12. İzole Edilen Mayaların 18S-28S rRNA ile Tanımlanması

MALDITOF ile tanımlaması yapılan mayalardan probiyotik özellikleri yeterli bulunan 9 tanesine genetik doğrulama için 18S-28S rRNA ile tanımlama testi yapılmıştır ve tanımlama sonucu MALDITOF sonuçları ile aynı bulunmuştur. Bu 9 maya suşunun

18S-28S rRNA ile tanımlama sonucu elde edilen baz dizilimleri Ek B’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; 1 numaralı izolat *Torulaspora delbrueckii*, 2 ve 4 numaralı izolatlar *Candida parapsilosis*, 6 numaralı izolat *Pichia kudriavzevii*, 8 numaralı izolat *Saccharomyces cerevisiae*, 9 numaralı izolat *Pichia membranifaciens*, 30 numaralı izolat *Candida tropicalis*, 44 numaralı izolat *Kluyveromyces marxianus* ve 85 numaralı izolat *S. boulardii* olarak tespit edilmiştir.

2000’li yıllarda türe özgü primerlerle yapılan çalışmalar sayesinde çok sayıda *Saccharomyces* suşu analiz edilerek belirtilen anlaşmazlık açıklığa kavuşturulmuştur. Elde edilen sonuçlar kesin olarak *S. boulardii*’nin tüm suşlarının *S. cerevisiae* türüne ait olduğunu ve *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* olarak isimlendirilmesi gerektiğini göstermiştir (Posteraro ve ark., 2005).

Çalışmanın çikolata üretiminde sağlık açısından faydaları daha önceki araştırmalarda kanıtlanmış ve kefirde yeni izole edilen probiyotik özellikleri belirlenmiş *S. boulardii* kullanılmıştır. *S. boulardii* ticarileştirilmiş tek probiyotik mayadır ve sağlık yararları ve etki mekanizmaları ile birlikte gıdalardaki teknolojik uygulanabilirliği bilimsel kanıtlarla desteklenmiştir. Elde ettiğimiz *S. boulardii*’nin spesifik özellikleri hidrofobiklik, koagregasyon ve otoagregasyon yüzdesi %30’dan yüksektir ve mide ve bağırsakta hayatta kalma oranları %60’tan fazladır. Ayrıca patojenler üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Yapılan çalışmada *Salmonella* ve *E. coli* bakterilerinin gelişimini önlediği tespit edilmiştir.

3.13. Dondurarak kurutma ile probiyotiklerin kapsüllenmesi ve kapsülleme verimliliği

Bu çalışmada *S. boulardii*, kakao tozu: Na-aljinat: fruktooligosakkaritler (10:1:1) oranında karışım ile kapsülendirilmiştir. Kapsülleyici karışım $93,57 \pm 1,02$ kapsülleme verimliliği (KV) göstermiştir ve bu kapsülendirilmiş probiyotikler tüm çalışmada kullanılmıştır.

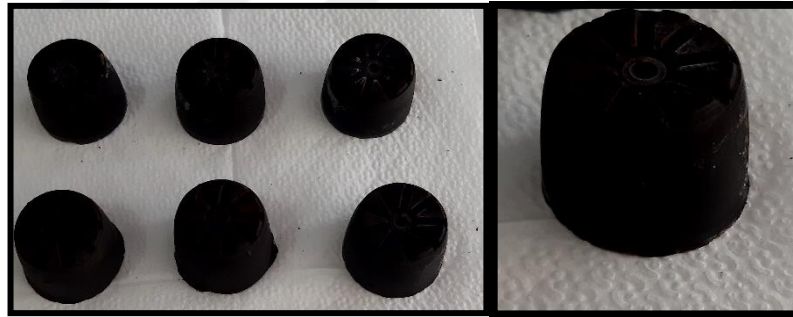
Bu çalışmada, kapsülleyici bir karışım olarak kakao tozu ile birlikte Na-aljinat ve FOS’u ve in vitro gastrointestinal sindirim yoluyla çikolatalara takviye edilmiş kapsülendirilmiş probiyotik’in etkisi incelenmiştir. Yasmin ve ark., (2019), kapsülleyici materyaller olarak peynir altı suyu proteini konsantresi ve pektini kullanarak %85,49 KV bildirdi. Xu ve ark., (2016), %85’ten yüksek KV’nin başarılı olarak kabul edilebileceğini ve kapsülleme verimliliğinin, kapsülleyici malzemelerdeki karbonhidrat biyopolimerleri ve protein içeriğine bağlı olduğunu belirtmiştir. Bu

Çalışmada bildirilen KV nceki bulgulardan daha yüksek bulunmuştur ve probiyotik kültürlere karşı koruyucu bir etki sağlaması açısından tatmin edici olarak değerlendirilmiştir.

3.14. Probiyotik ikolatanın özellikleri

3.14.1. ikolatanın hazırlanması

n denemeler yapılarak bazı modifikasyonlarla birlikte son olarak en iyi verimde olacak şekilde çikolata %39,76 kakao kütlesi, %41,85 kakao yağı, %14,80 inülin, %1,60 steviosid ve %0,15 soya lesitini ve %1,84 kapsüllü maya içerecek şekilde hazırlanmıştır (Lim ve ark., 2021; Hinneh ve ark., 2019). Kapsüllenmiş probiyotik, önerilen en iyi sıcaklıkta (45 C) %1,84 (w/w) konsantrasyonda (Gadhiya ve ark., 2018; Kemsawasd ve ark., 2016) katılaşmaya yakın çikolataya eklenmiştir. Çikolata en ve boyu 3 cm olan kaplarda yapılmıştır. Nihai ürünlerde en az 10^7 log kob/g canlı probiyotik sayısı sağlanmıştır (Dong ve ark., 2013). Kapsüllü probiyotiklerle zenginleştirilmiş çikolata (kapsüllü çikolata) (şekil 3.2.) ve kontrol (kapsülsüz çikolata) (şekil 3.3.) 25 C aseptik koşullarda 120 gün süreyle saklanmıştır (Hossain ve ark., 2022).



şekil 3. 2. Kapsüllü ikolata örnekleri.



şekil 3. 3. Kapsülsüz ikolata rnekleri.

3.14.2. Çikolata örneklerinin mikroskopta incelenmesi

Çikolata örneklerinin kristal morfolojileri incelendiği zaman hacim artırıcı maddelerin (inülin) pürüzlü bir yapıya neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durum viskozite farkından dolayı kaynaklanmış olabilir.

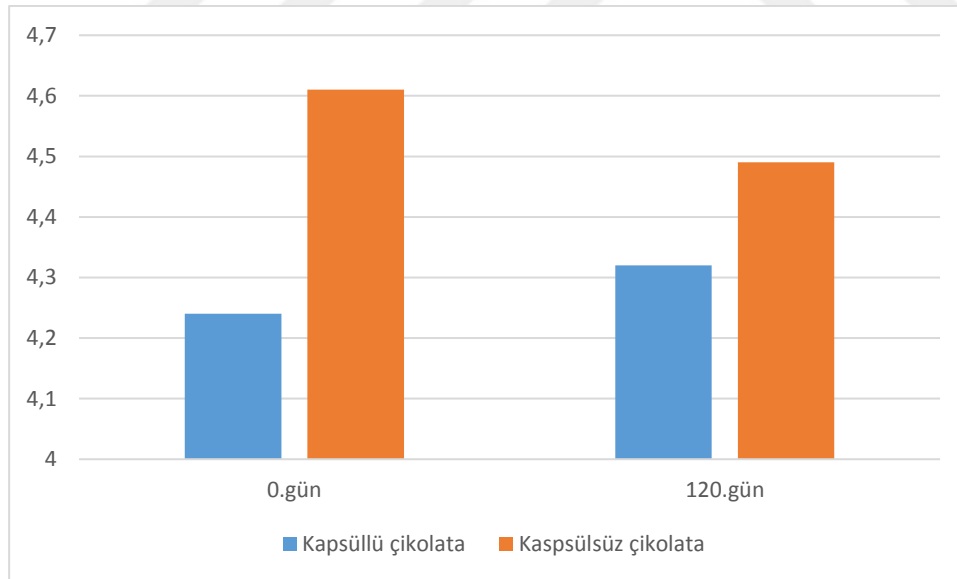
3.14.3. Nem tayini

Tablo 3.11, 120 gün depolanan bitter çikolata numunelerinin nem içeriğini göstermektedir. 25 °C'de 120 gün depolamadan sonra çikolata numunelerinin nem içeriğinde önemli bir değişiklik ($P \geq 0.05$) olmamıştır (Şekil3.4).

Tablo 3. 11. Çikolata örneklerinin 0. ve 120. gün nem içerikleri (%).

Örnek	0.gün	120.gün
Kapsüllü çikolata	4,24±0,02 ^{Ba}	4,32±0,02 ^{Ba}
Kapsülsüz çikolata	4,61±0,48 ^{Aa}	4,49±0,64 ^{Aa}

a, b, c Farklı üst simge harfler, örnekler arasındaki önemli farkı gösterir ($P < 0.05$). A, B ve C Farklı üst simge harfler, satırlar arasında örnekler arasındaki önemli farkı gösterir ($P < 0.05$).



Şekil 3. 4. Çikolata örneklerinin 0. ve 120. gün nem içerikleri (%).

Bitter çikolatada şeker gibi yüksek higroskopik bileşen, kumlu topaklar oluşmasına ve parçacık yüzeylerinde daha yüksek nem içeriğine, sürtünmeye ve viskozitede belirgin artışlara yol açabilir (Afoakwa ve ark., 2007). Sükroz içermeyen bitter çikolatanın reolojisi, sakkaroz ikame maddesinin yoğunluğu, parçacık boyutu ve şekli ile

çikolatanın nem içeriği gibi birleşik etkilerin bir sonucu olabilir. Bitter çikolatanın nem içeriği, çikolatanın mikroskobik yapısını (Rodriguez Furlan ve ark., 2017) ve çiçeklenme oluşumunu (Stortz ve Marangoni, 2011) değiştirerek dokusal ve depolama stabilitesini etkiler. Bitter bileşik çikolatadaki nem içeriği sınırı %0,5 ila %1,5'tir (Afoakwa ve ark., 2007).

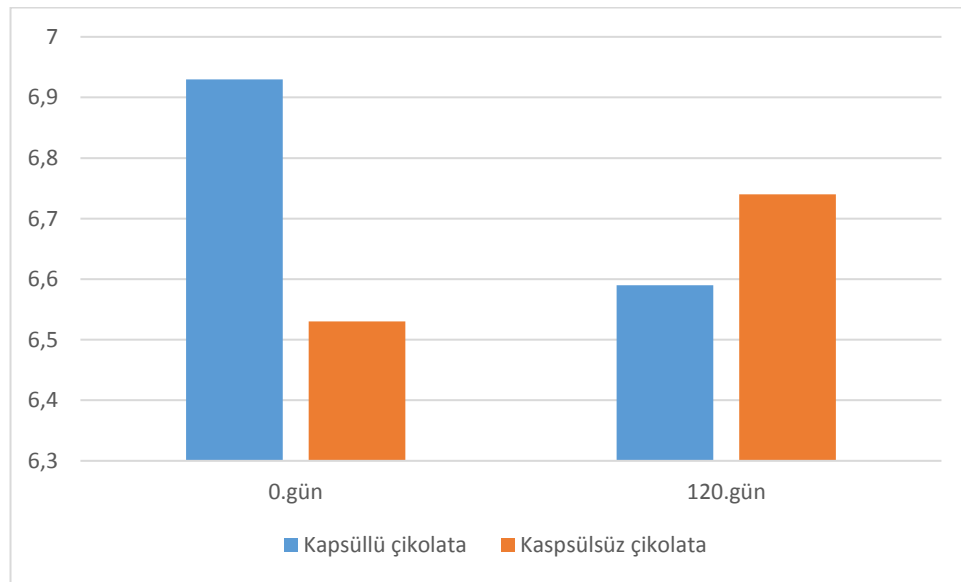
3.14.4. Sertlik

120 gün boyunca 25 °C'de saklanan bitter çikolatanın sertliği Tablo 3.12'de gösterilmektedir. 25 °C'de 120 gün depolamadan sonra çikolata numunelerinin sertliğinde önemli bir değişiklik ($P \geq 0.05$) olmamıştır (Şekil 3.5).

Tablo 3. 12. Çikolata örneklerinin 0. ve 120. gün sertlikleri (N).

Örnek	0.gün	120.gün
Kapsüllü çikolata	6,93±0,07 ^{Aa}	6,59±0,14 ^{Aa}
Kapsülsüz çikolata	6,53±0,05 ^{Ba}	6,74±0,09 ^{Aa}

a, b, c Farklı üst simge harfler, örnekler arasındaki önemli farkı gösterir ($P < 0.05$). A, B ve C Farklı üst simge harfler, satırlar arasında örnekler arasındaki önemli farkı gösterir ($P < 0.05$).



Şekil 3. 5. Çikolata örneklerinin 0. ve 120. gün sertlikleri (N).

Literatüre baktığımızda sükroz içeren çikolataların daha sert yapıya sahip olduğu görülmüştür. Sükroz ikame maddesinin tipinin, çikolatadaki parçacık-parçacık etkileşimlerine atfedilen sertlik üzerinde belirgin bir etkiye sahip olabileceğini

gösteren önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Farzanmehr ve Abbasi, 2009; Hadnadev ve ark., 2011; Shah ve ark., 2010).

Sakkaroz ikame maddesinin türü ve moleküler yapısının, bitter çikolatanın sertliğini etkileyebileceğini göstermektedir. Bunun nedeni, bitter çikolatanın sertliğini artıran daha küçük kristal yapıya bağlı olabilir. Bu sonuç, Aidoo ve ark., (2014)'nın yaptığı daha önceki bir çalışmasıyla desteklenmektedir. Mikroskop altında görüntülenen büyük inülin kristalleri arasındaki sınırlı parçacık etkileşimlerinin çikolatanın sertliğinin azalmasına yol açtığını bulmuşlardır. Sakkaroz içermeyen bitter bileşik çikolatalardaki hacim arttırıcı maddeler nedeniyle higroskopisitenin yumuşatıcı etkilerini göstermektedir. Sonuç olarak inülinin çikolatanın sertliği üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu etkiler parçacık etkileşimlerine, inülinin higroskopikliğine ve çikolatadaki katı yağ içeriğine atfedilir.

3.14.5. Çiçek oluşumu

Çiçeklenme, çikolata yüzeyinde beyaz veya grimsi bir tabaka oluşturarak görünümü etkiler. Bu çalışmada, 25 °C'de depolanan çikolata örneklerinin 120 günlük depolama süresince çiçeklenme oluşumu stereomikroskop kullanılarak gözlemlenmiştir. 25 °C'de saklanan örneklerin hiçbirinde çiçeklenme gözlenmemiştir.

Bu sonuç daha yüksek erime entalpisine sahip tatlandırıcılarla formüle edilen çikolataların yüzeyde çiçeklenme oluşturma olasılığının daha düşük olabileceğini tespit eden daha önceki bir çalışmayla uyumludur (Rodriguez Furlan ve ark., 2017).

3.14.6. pH ve su aktivitesi (a_w) ölçümü

25 °C'de 120 günlük depolama sırasında probiyotik-çikolataların pH ve su aktivitesindeki (a_w) değişiklikler Tablo 3.13'te sunulmuştur. Her grup için probiyotik çikolataların pH'ı depolama süresi boyunca kademeli olarak artmıştır. Bu sonuçlar, çikolata örneklerinde probiyotiklerin varlığında 25 °C'de 120 gün boyunca depolama sırasında pH değerlerinde önemli ($P < 0.05$), (Şekil 3.6.) artış olduğunu göstermiştir (Tablo 3.13). Su aktivitesi değerlerinin de, 120 günlük depolamada düştüğü tespit edilmiştir ($P < 0.05$) (Tablo 3.13), (Şekil 3.7).

Tablo 3.13'te sunulan sonuçlar, 25 °C'de depolama sırasında pH'taki artışın eklenen probiyotiklerden kaynaklanmadığı sonucuna varmıştır. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada probiyotik ile kapsüllenen çikolatada pH'da artış tespit edilmiştir ve bu durumun probiyotiklerden kaynaklanmadığı sonucuna varılmıştır (Hossain ve ark.,

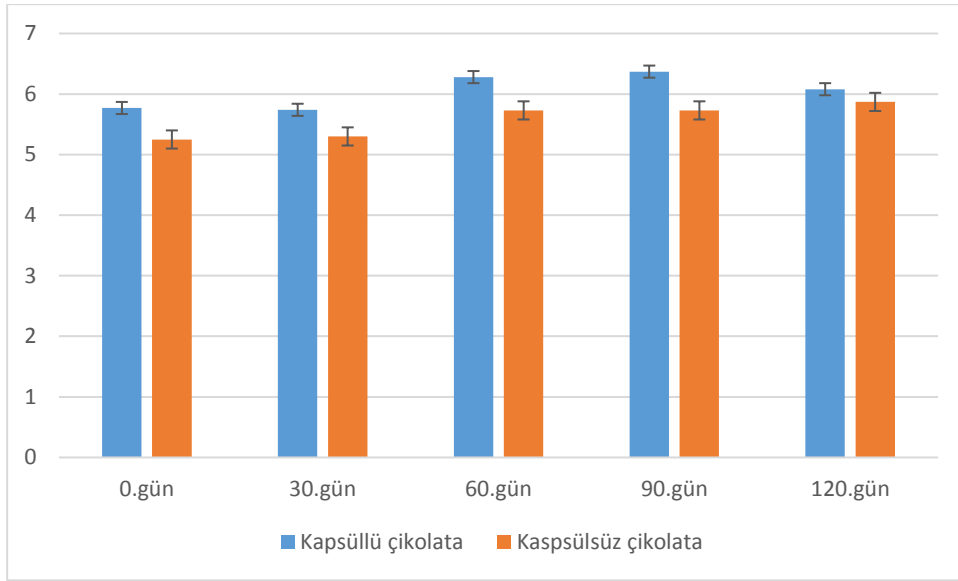
2022). Lipolitik aktivite, oksidasyon gibi faktörler çikolatanın depolanması sırasında böyle bir pH değişikliğinden sorumlu olabilir. Kobus-Cisowska ve ark. (2019), *Bacillus coagulans* bakterisi içeren çikolataların pH'ında benzer artışlar olduğunu bildirmiştir.

Ürün hasarı, dış kısımların çatlaması nedeniyle depolama boyunca su göçü nedeniyle su aktivitesi düşüşü meydana gelebilir (Kobus-Cisowska ve ark., 2019). Ayrıca çikolata örneklerinde kakao kütlesi arttıkça su bağlanmasını kolaylaştırır ve genellikle daha yüksek bir su aktivitesine neden olabilmektedir (Hossain ve ark., 2022). Bitter çikolata yüksek oranda yağ içerdiğinden depolama sırasında pH ve su aktivitesi artışını etkileyen diğer bir neden de yağın oksidasyonu olabilir.

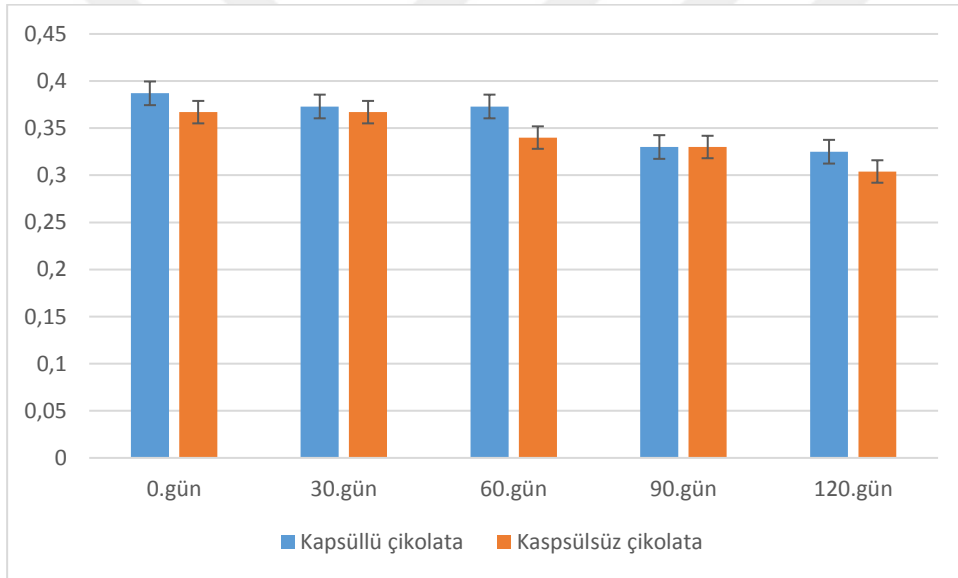
Tablo 3.13. 25 °C'de depolama sırasında probiyotik çikolataların pH ve a_w değerleri.

Örnek	pH				
	0.gün	30.gün	60.gün	90.gün	120.gün
Kapsüllü	5,77±	5,74±	6,28±	6,37±	6,08±
çikolata	0,17 ^{Da}	0,10 ^{Da}	0,00 ^{Ba}	0,02 ^{Aa}	0,13 ^{Ca}
Kapsülsüz	5,25±	5,30±	5,73±	5,73±	5,87±
çikolata	0,07 ^{Cb}	0,00 ^{CBb}	0,20 ^{ABb}	0,15 ^{ABb}	0,06 ^{Ab}
Örnek	a_w				
	0.gün	30.gün	60.gün	90.gün	120.gün
Kapsüllü	0,387±	0,373±	0,373±	0,330±	0,325±
çikolata	0,06 ^{Aa}	0,20 ^{ABa}	0,20 ^{ABa}	0,00 ^{BCa}	0,07 ^{Ca}
Kapsülsüz	0,367±	0,367±	0,340±	0,330±	0,304±
çikolata	0,14 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,00 ^{ABb}	0,00 ^{BCa}	0,03 ^{Cb}

A, B ve C Farklı üst simge harfler, satırlar arasında örnekler arasındaki önemli farkı gösterir ($P < 0.05$). a, b, c Farklı üst simge harfler, sütunlar arasında örnekler arasındaki önemli farkı gösterir ($P < 0.05$).



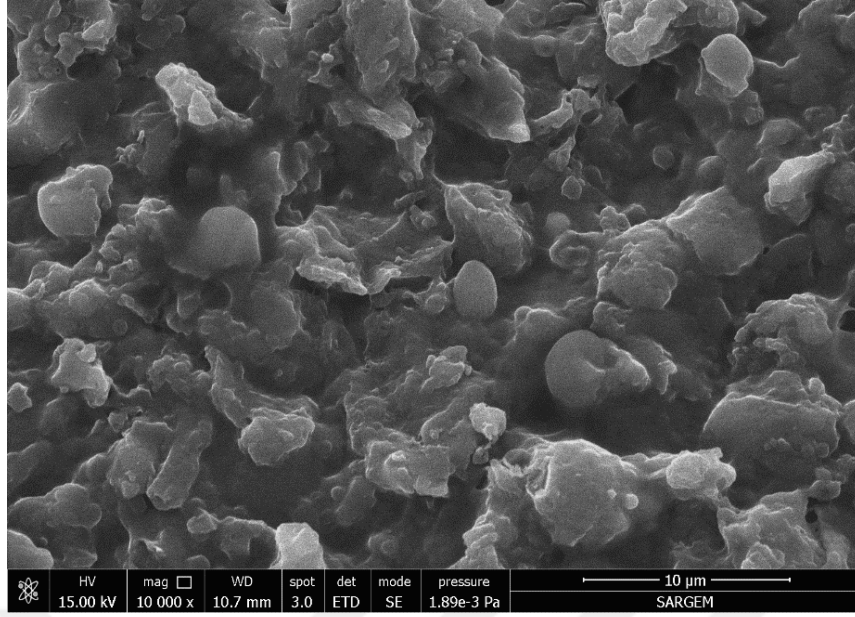
Şekil 3. 6. 25 °C'de depolama sırasında probiyotik çikolataların pH değerleri.



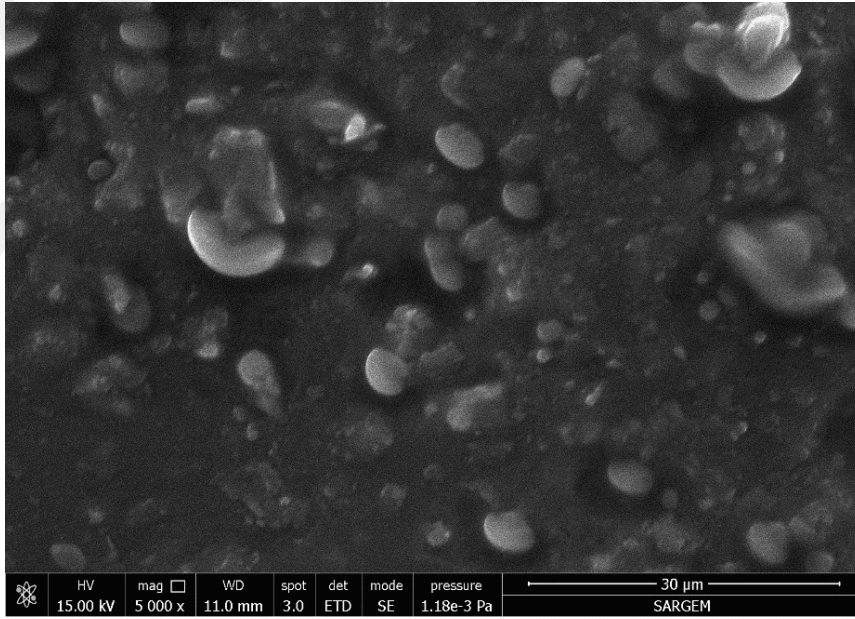
Şekil 3. 7. 25 °C'de depolama sırasında probiyotik çikolataların a_w değerleri.

3.14.7. Çikolata ile karıştırılmadan önce ve sonra kapsüllenmiş probiyotiklerin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi

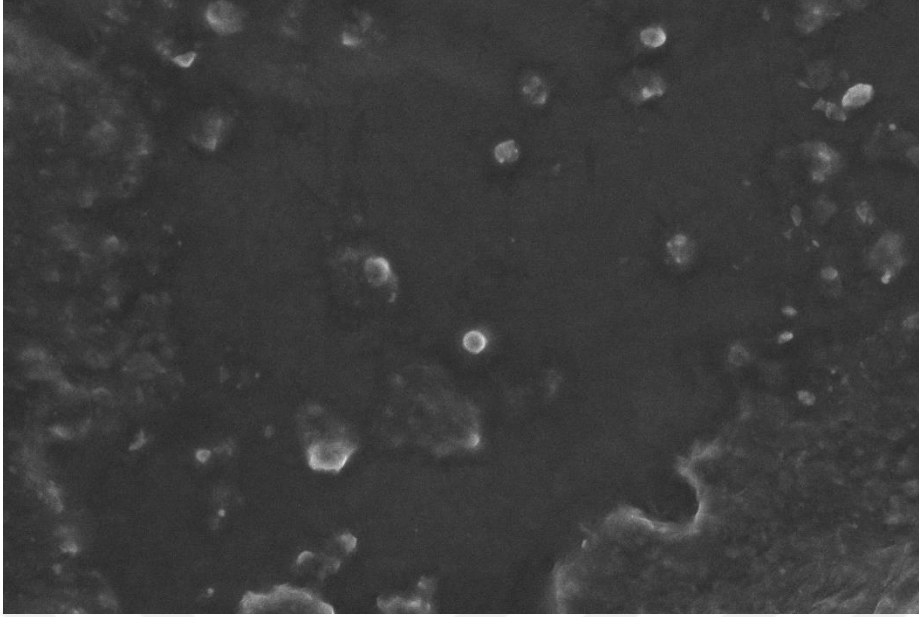
S. boulardii'nin taramalı elektronik görüntüleri, kapsüllenmiş probiyotik hücrelerin (Şekil 3.8), çikolata içinde kapsüllenmiş hücrelerin (Şekil 3.9) görüntüleri ve çikolata örnekleri içinde kapsüllenmemiş hücrelerin (Şekil 3.10) görüntüleri elde edilmiştir. Kapsüllü mayaların çikolata içinde hapsedildiği görülmüştür. Yuvarlak şeklindeki mayalar homojen bir şekilde dağılmış ve kapsüllenmiş probiyotiklerin hücre görünümü tüm örneklerde aynı olmuştur.



Şekil 3. 8. Kapsüllenmiş *S. boulardii*'nin SEM görüntüleri.



Şekil 3. 9. Çikolata örnekleri içinde kapsüllenmiş *S.boulardii*'nin SEM görüntüleri.



Şekil 3. 10. Çikolata örnekleri içinde kapsüllenmemiş *S.boulardii*'nin SEM görüntüleri.

SEM görüntüleri, kapsülleyici karışımla dondurarak kurutma sırasında ve ayrıca kapsüllenmiş çikolatalarda probiyotik bakterilerin normal boyutunun ve şeklinin değişmediğini göstermiştir; bu da önceki bazı sonuçlarla tutarlı olarak değerlendirilmiştir (de Araújo Etchepare ve ark., 2020; Chen ve ark., 2017). Bu SEM görüntüleri, bir kapsülleyici olarak kakao tozunun, fonksiyonel özelliğini güçlendirmek amacıyla probiyotik taşıyıcılar için uygun olabileceği gerçeğini doğrulamaktadır.

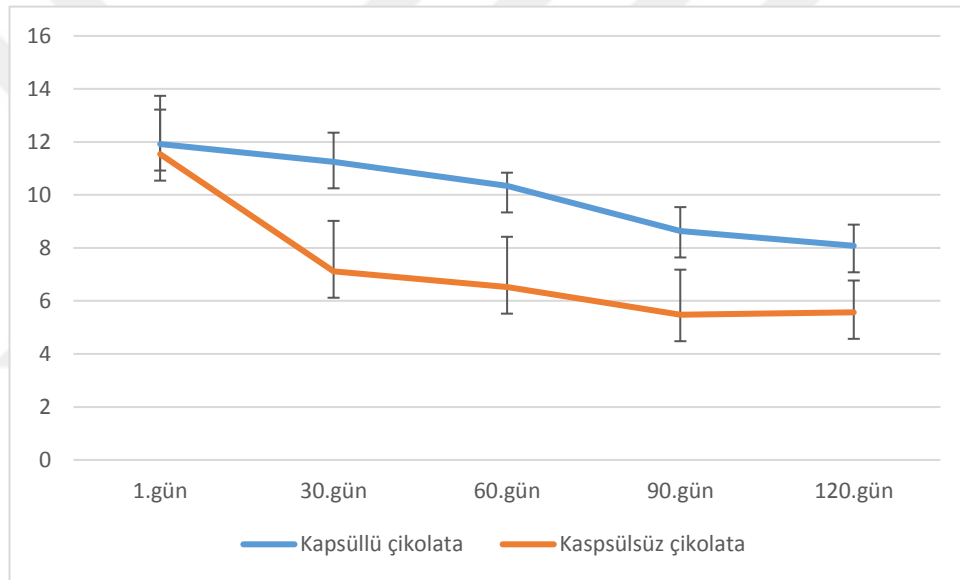
3.14.8. Probiyotiğin çikolatalarda canlılığı

Kapsüllenmiş ve serbest *S. boulardii* ile zenginleştirilmiş çikolatalar 25 °C'de 120 gün boyunca depolanarak, ayda bir olacak şekilde probiyotiğin çikolatalardaki canlılığı değerlendirilmiştir (Tablo 3.14). Sonuçlar incelendiğinde, depolamanın ilk gününde tüm çikolata uygulamalarında başlangıç probiyotik sayılarının benzer (>11 log) olduğu görülmüştür (Şekil 3.11). En önemlisi, kapsüllenmiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş çikolatada, 25 °C'de 120 günün tamamı boyunca probiyotik sayısı 8,08 log kob/g'nin üzerinde kalmıştır. Kapsülsüz çikolatalarda 30. Günde yaklaşık 4 logluk bir azalma olmuştur. Bu durum başlangıçtaki hasarlı hücrelerin kapsüllü olanlara göre kapsülsüz çikolatalarda daha hızlı zarar görerek maya sayısında kısa zamanda azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

Tablo 3. 14. 25 °C'de depolama sırasında probiyotik çikolataların maya sayıları.

Maya sayısı (Log kob/g)					
Örnek	1.gün	30.gün	60.gün	90.gün	120.gün
Kapsüllü	11,92±	11,25±	10,34±	8,64 ±	8,08±
çikolata	1,3 ^{Aa}	1,1 ^{Aa}	0,5 ^{Aa}	0,9 ^{Ba}	0,8 ^{Ba}
Kapsülsüz	11,54±	7,12±	6,52±	5,48±	5,57±
çikolata	2,2 ^{Aa}	1,9 ^{Bb}	1,9 ^{Bb}	1,7 ^{Bb}	1,2 ^{Bb}

A, B ve C Farklı üst simge harfler, satırlar arasında örnekler arasındaki önemli farkı gösterir ($P < 0.05$). a, b, c Farklı üst simge harfler, sütunlar arasında örnekler arasındaki önemli farkı gösterir ($P < 0.05$).



Şekil 3. 11. 25 °C'de depolama sırasında probiyotik çikolataların maya sayıları.

Kapsüllenmiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş çikolatanın, sağlık açısından faydalar sergilemek için önerilen minimum terapötik değeri 10^7 kob/g veya mL olması gerekmektedir (Dong ve ark., 2013). Kapsüllenmemiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş çikolatalarda depolama sırasında probiyotik sayılarında önemli ($P < 0.05$) ve kademeli bir düşüş ortaya çıkmıştır. Kapsüllemelerin koruyucu etkileri çikolatalarda karşılaştırıldığında, kapsüllenmemiş probiyotiklere kıyasla kapsüllenmiş çikolatalarda 120 gün sonunda daha fazla sayıda (2,51 log) probiyotik tespit edilmiştir ve bu da enkapsülanların koruyucu etkileri olduğunu kanıtlamıştır. Pandiyan ve ark., (2012), yaptıkları çalışmada probiyotik *L. acidophilus* ve *S. boulardii* ve prebiyotik fruktooligosakkaritler (FOS) peyniraltı suyu protein konsantresi ile zenginleştirilerek

dondurma üretimi gerçekleştirmişler ve depolama boyunca probiyotiklerin canlılığı ve FOS etkisini incelemişlerdir. FOS'ların probiyotik kültürlerin canlılığı üzerinde önemli ölçüde etkisi olduğu vurgulanmıştır ($P \leq 0,01$). Dondurmanın depolanması boyunca *L. acidophilus* ve *S. boulardii* sayılarında önemli bir azalmanın olduğu belirlenmiştir. *L. acidophilus* ile *S. boulardii*'nin kombine olarak dahil edildiği örneklerdeki canlılık sayılarının tek başına ilave edilen örneklerle kıyasla daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. FOS içeren dondurmanın, insan gastrointestinal sistemindeki *L. acidophilus* ve *S. boulardii*'nin genel gelişimi ve korunması için mükemmel bir ortam oluşturduğu belirtilmiştir.

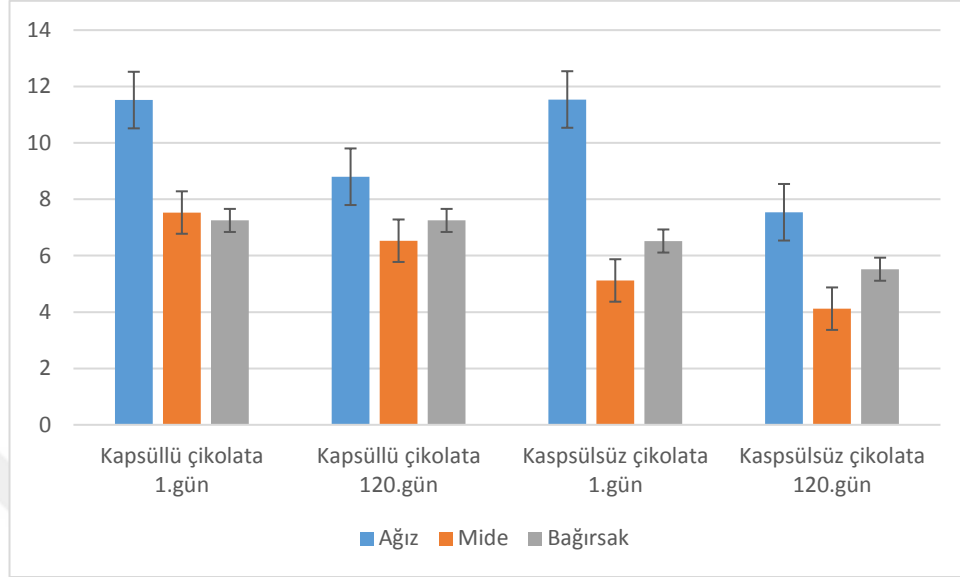
3.14.9. Probiyotik çikolatanın in vitro gastrointestinal sindirimi sırasında probiyotiklerin hayatta kalmasının test edilmesi

Kapsüllenmiş *S. boulardii* ile zenginleştirilmiş çikolataların gastrointestinal sindirimi 25 °C'de depolamanın birinci ve 120. gününde gerçekleştirildi (Tablo 3.15). Probiyotik çikolatadan elde edilen sonuçlar, kapsüllenmemiş *S. boulardii* ile zenginleştirilmiş çikolata ile karşılaştırıldı. 25 °C'de bir günlük saklamanın ardından yapılan in vitro analizde, 2 saatlik mide sindirimine (pH 3) maruz bırakıldığında kapsüllenmemiş probiyotiklerle takviye edilmiş çikolatada $6,42 \pm 0,0$ log'luk önemli ($P < 0,05$) bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.12) Ancak kapsüllenmiş probiyotik içeren çikolata içeren numunede yalnızca $3,99 \pm 0,2$ log azalma olmuştur.

Tablo 3.15. *S. boulardii*'nin 25 °C'de 1 gün ve 120 gün depolamanın ardından in vitro sindirime tabi tutulan çikolatada hayatta kalma oranı.

		Maya sayısı (Log kob/g)		
Örnek		Ağız	Mide	Bağırsak
Kapsüllü çikolata	1.gün	$11,52 \pm 1,3^{Aa}$	$7,53 \pm 1,1^{Ba}$	$7,25 \pm 0,5^{Ba}$
Kapsüllü çikolata	120.gün	$8,80 \pm 1,5^{Ab}$	$6,53 \pm 1,1^{Bab}$	$7,25 \pm 0,5^{ABa}$
Kapsülsüz çikolata	1.gün	$11,54 \pm 1,2^{Aa}$	$5,12 \pm 1,2^{Bb}$	$6,52 \pm 2,1^{Bab}$
Kapsülsüz çikolata	120.gün	$7,54 \pm 0,8^{Ab}$	$4,12 \pm 0,9^{Bb}$	$5,52 \pm 0,7^{Bb}$

A, B ve C Farklı üst simge harfler, satırlar arasında örnekler arasındaki önemli farkı gösterir ($P < 0.05$). a, b, c Farklı üst simge harfler, sütunlar arasında örnekler arasındaki önemli farkı gösterir ($P < 0.05$).



Şekil 3. 12. *S. boulardii*'nin 25 °C'de 1 gün ve 120 gün depolamanın ardından in vitro sindirime tabi tutulan çikolatada hayatta kalma oranı.

Çikolatalarda probiyotiklerin daha düşük log azalması, hem kapsüllemenin hem de çikolatanın taşıyıcı olarak kullanılmasının in vitro sindirim sırasında probiyotikler üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Zorlu gastrik koşullar olan pH 3 ile karşılaştırıldığında bağırsakta probiyotik büyümesi için daha uygun olan pH'nın 7 olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar, kapsüllenmiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş probiyotik çikolatanın, uzun süreli depolama sırasında minimum terapötik limitleri koruyabildiğini açıkça göstermiştir. Ayrıca çikolata bileşenlerinin kompleks karışımının gastrointestinal kanalda probiyotik büyümesi için iyi bir besin kaynağı olduğu sonucuna varılmıştır.

Naimah ve ark., (2018) *S. boulardii*'yi aljinat ve aljinat-kitosan ile mikroenkapsüle ederek gastrointestinal koşullardaki direncini belirledikten sonra dondurmadaki canlılığını belirlemişlerdir. Enkapsüle edilmiş *S. boulardii*'nin canlılığının 21 günlük depolama periyodu boyunca kontrol örneğine göre daha iyi olduğu belirtilmiştir.

Zamora-Vega ve ark., (2013) yaptıkları bir çalışmada probiyotik *S. boulardii*'yi prebiyotik ajan olan inülin ile enkapsüle etmişlerdir. Peynir örnekleri 4°C'de 30 gün boyunca depolanmış ve bu periyot boyunca enkapsüle edilmeyen probiyotik mikroorganizmanın canlılığı enkapsüle forma göre daha az olmuştur. *S. boulardii* ile

inülin simbiyotik ilişkisinin depolama periyodu boyunca probiyotik ürün için gerekli olan canlılık miktarını karşıladığı belirtilmiştir.

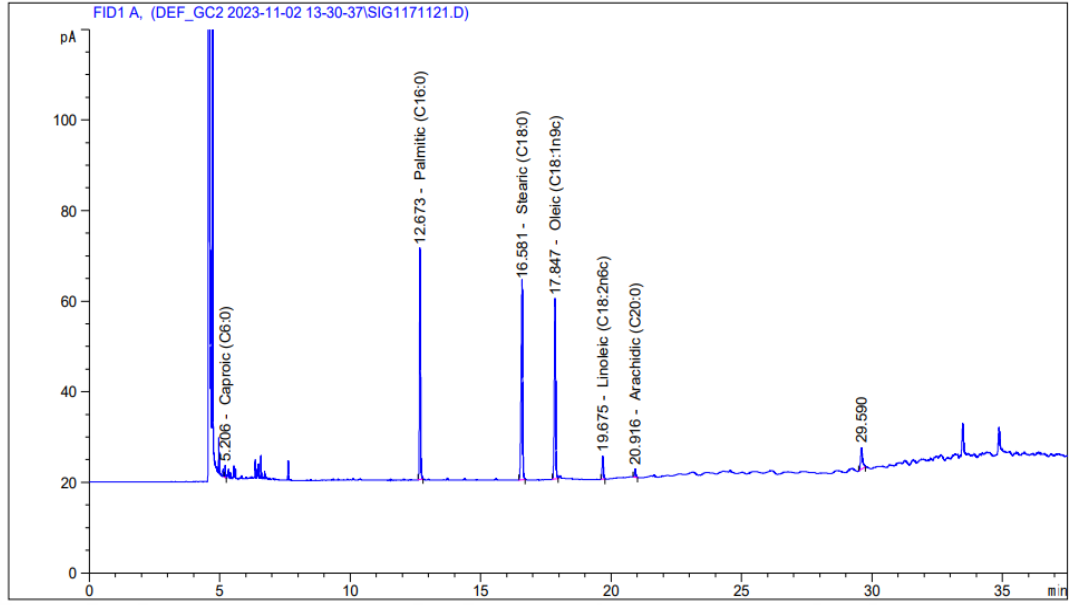
3.14.10. GC FID kullanarak yağ asitlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi

Şekil 3.13, 3.14, 3.15 ve 3.16'daki sonuçlar, çikolata örneklerindeki yağ asitlerini göstermektedir. Tüm örneklerde en fazla stearik asit tespit edilmiştir.

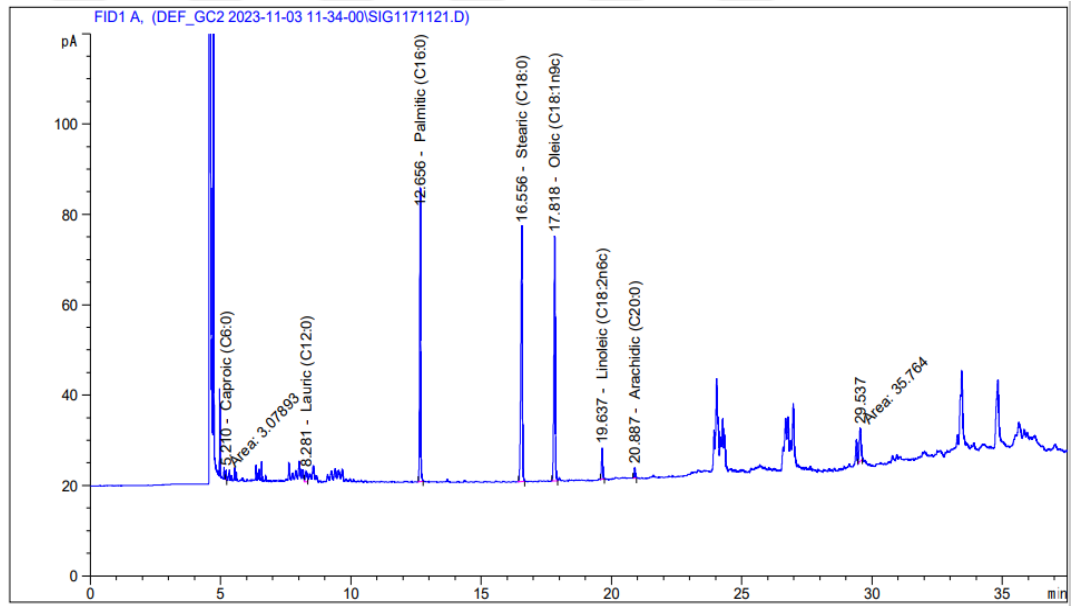
Tablo 3.16. Kapsüllü ve kapsülsüz çikolataların 0. ve 120. gün yağ asidi değerleri (%).

	Kapsüllü çikolata 0. gün	Kapsüllü çikolata 120. gün	Kapsülsüz çikolata 0. gün	Kapsülsüz çikolata 120. gün
Kaproik (C6:0)	0,714±0,058 ^A	0,754±0,077 ^A		
Palmitik (C16:0)	26,235±0,95 ^A	25,437±0,45 ^A	25,185±0,412 ^A	24,385±0,452 ^A
Stearik (C18:0)	34,868±0,65 ^A	33,665±0,52 ^A	33,398±0,312 ^A	32,779±0,325 ^A
Oleik (C18:1n9c)	28,449±0,42 ^A	29,177±0,32 ^A	28,743±0,325 ^A	28,113±0,362 ^A
Linoleik (C18:2n6c)	3,483±0,215 ^A	3,335±0,126 ^A	3,196±0,214 ^A	3,151±0,125 ^A
Araşidonik (C20:0)	1,176±0,216 ^A	0,992±0,134 ^A	1,127±0,124 ^A	1,135±0,147 ^A
cis-15- Tetrakozenoik asit (C24:1n9)	5,075±0,147 ^A	5,272±0,124 ^A	7,237±0,348 ^A	8,492±0,512 ^A
Laurik (C12:0)		1,349±0,158		
Lignoserik (C24:1n9)			1,114±0,146 ^A	0,990±0,124 ^A
Behenik (C22:0)				0,955±0,214

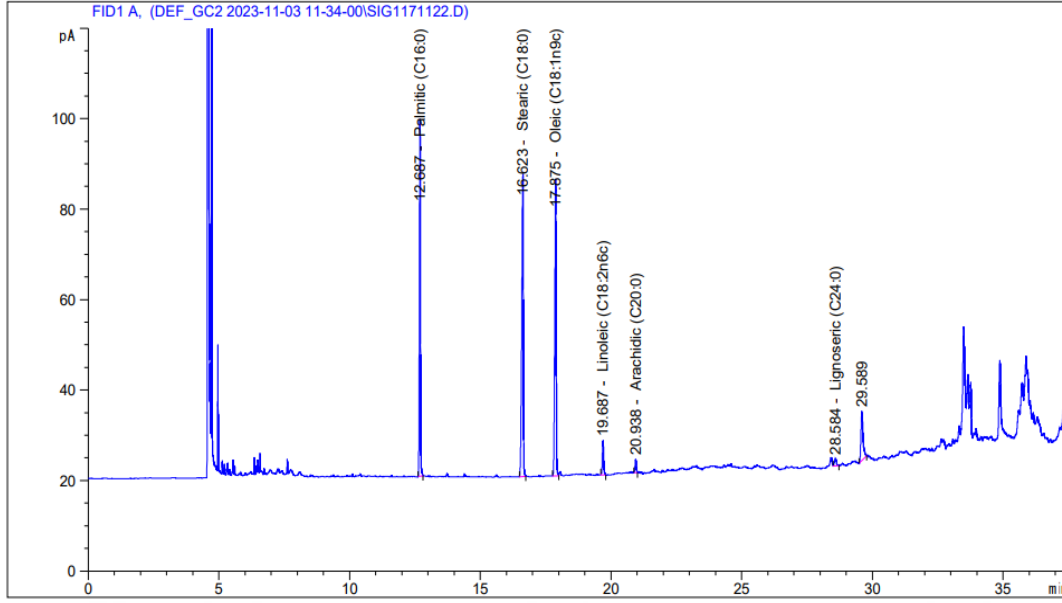
A, B ve C Farklı üst simge harfler, satırlar arasında örnekler arasındaki önemli farkı gösterir (P < 0.05).



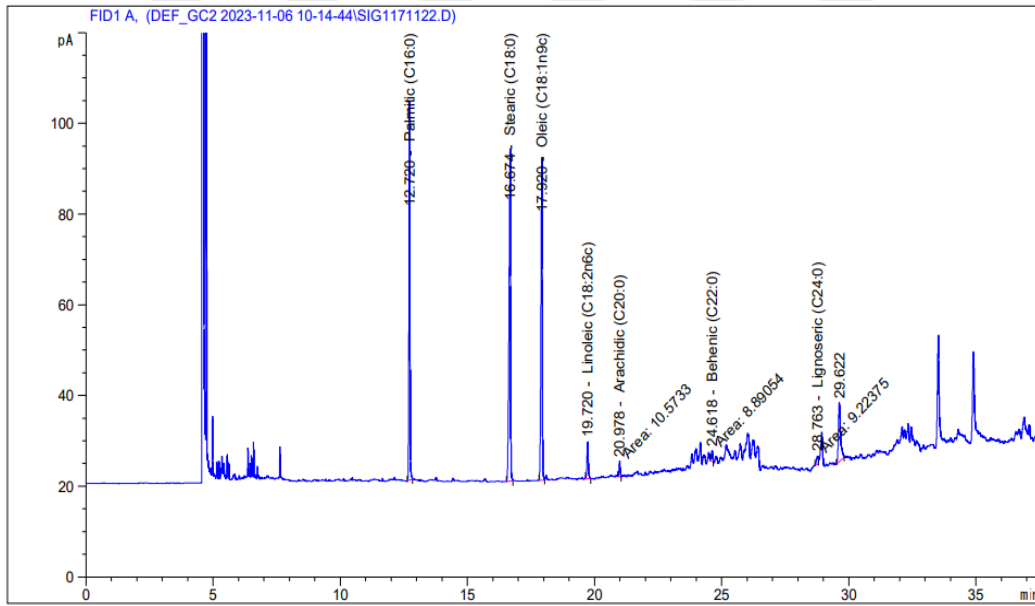
Şekil 3. 13. Kapsüllü çikolata örneklerinin 0. gün yağ asidi değerleri.



Şekil 3. 14. Kapsüllü çikolata örneklerinin 120. gün yağ asidi değerleri.



Şekil 3. 15. Kapsülsüz çikolata örneklerinin 0. gün yağ asidi değerleri.



Şekil 3. 16. Kapsülsüz çikolata örneklerinin 120. gün yağ asidi değerleri.

Sonuçlar incelendiğinde kapsüllü çikolatalarda depolamaya bağlı olarak Kaproik (C6:0), Palmitik (C16:0), Stearik (C18:0), Oleik (C18:1n9c), Linoleik (C18:2n6c), Araşidonik (C20:0), cis-15-Tetrakozenoik asit (C24:1n9) yağ asitlerinde önemli bir değişim görülmemiştir ($P>0,05$) fakat depolamanın 120. günden farklı olarak Laurik (C12:0) yağ asiti %1,349 oranında tespit edilmiştir.

Kapsülsüz çikolatalarda da; Palmitik (C16:0), Stearik (C18:0), Oleik (C18:1n9c), Linoleik (C18:2n6c), Araşidonik (C20:0), Lignoserik (C24:0), cis-15-Tetrakozenoik asit (C24:1n9) yağ asitlerinde önemli bir değişim tespit edilmemiştir ($P>0,05$).

Depolamanın 120. gününde farklı olarak Behenik (C22:0) yağ asitleri %0,955 oranında tespit edilmiştir. Kapsüllü çikolatalarda kapsülsüz çikolatalardan farklı olarak Kaproik asit (C6:0) %0,714 oranında tespit edilmiştir. İncelenen çikolata örneklerinde önemli doymuş yağ asitlerinden olan C16:0 ve C18:0 oranları sırası ile ortalama % 25,3105 ve % 33,6775 olarak belirlenmiştir. Melo ve ark., (2020) yaptıkları çalışmada çalışmamıza benzer olarak tüm çikolata örnekleri için kantitatif olarak C16:0 (>%23,91), C18:0 (>%30,25) ve C18:n1 (>%32,24) yağ asitlerini tespit etmişlerdir. Kakao yağında bulunan yağ asitlerinin % 98'den fazlasını oluşturan 4 temel yağ asidi Palmitik asit (C16:0, % 24,4), stearik asit (C18:0, % 33,6), oleik asit (C18:1, % 37) ve linoleik (C18:2, % 3,4) asitleridir (Shekarchizadeh ve ark. 2009).

Partiküller arası etkileşim ve ağ yapısı da çikolatanın sıkıştırılabilirliği ve kırılma özelliklerini etkilediğinden çikolatanın tekstüründe değişikliğe neden olmaktadır (Do ve ark. 2007). Bu sebeple ürün formülasyonunda kullanılan yağlara ait yağ asidi profili, yağ asitleri konsantrasyonu ve yağ asidi zincirlerinin uzunluğu da partikül etkileşimlerini farklı derecede etkilemekte ve bu durum ürün tekstüründe de farklılıklara yol açmaktadır. Sonuç olarak, çikolata kaplamasının tekstürel özellikleri ürün kalitesini belirleyen önemli indikatörlerden birisidir.

Gıda işleme teknolojisinde kullanılan yağların kalitesi oldukça önem teşkil etmektedir. Çikolata yapımında da yağ, temel ingredient maddelerin (süttozu, vanilya, kakao, kakao yağı, bitkisel yağ vb.) en önemlilerinden birini oluşturmaktadır. Çikolatadaki yağın kalitesi, direkt olarak tüketici sağlığını olumlu ya da olumsuz yönde etkilemektedir.



4. SONUÇ

Bu çalışmada, 19 ev yapımı örnekden izole edilen 85 maya suşunun probiyotik potansiyeli araştırılmıştır. İzolatların probiyotik olabilmesi için, pH değeri 1,5 ile 3,0 olan asidik sıvıya dayanması gerekir. Çalışmamızda elde edilen suşlar; probiyotik mikroorganizmalar için temel özellikler olan hidrokarbonlara yapışma, mide ve bağırsakta hayatta kalma ve antimikrobiyal kabiliyeti otoagregasyon, koagregasyon kabiliyeti, enzimatik aktivite, antioksidan aktivite ve antibiyotik direnç dahil olmak üzere çeşitli kriterleri karşılamıştır. Bu çalışmada maya suşlarının umut verici probiyotik potansiyele sahip olduğu gösterilmiş olup geleneksel olarak üretilen ürünlerde bulunan probiyotiklerin fonksiyonel özellikleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Bu nedenle, geleneksel olarak üretilen ürünlerin probiyotik suş taraması ve starter kültür için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, izole suşların probiyotik özelliklerini araştırmak için daha fazla in vitro çalışmalara ihtiyaç vardır.

Elde edilen maya suşları, mide ve bağırsak geçişi sırasında simüle edilmiş koşullara maruz kaldıktan sonra gastrointestinal koşullarda hayatta kalma potansiyeli göstermiştir. İzolatların %10,58'i orta, %34,11'i zayıf biyofilm üreticisi olarak tanımlanırken, %55,29'unun biyofilm oluşturma özelliğinin olmadığı tespit edilmiştir. Tüm izolatlarda katalaz enzim üretimi tespit edilmiştir. İzolatlardan %83,52'sinin orta, %16,47'sinin güçlü proteaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. İzolatların %2,35'sinde esteraz aktivitesi görülmeyip, %95,29'unda orta düzeyde, %2,35'inde güçlü esteraz aktivitesi esteraz aktivitesi tespit edilmiştir. İzolatlardan %95,29'unda orta düzeyde amilaz aktivitesi tespit edilirken %2,35'inde güçlü amilaz aktivitesi belirlenirken %2,35'inde ise amilaz aktivitesi belirlenmemiştir. İzolatlardan %50,58'inde güçlü β -glukozidaz aktivitesi görülürken, %49,41'inde aktivite görülmemiştir. Hidrokarbonlara yapışma yeteneğinin ise cinse ve türe özgü olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca hidrofobisiteninin hidrokarbonlara göre değiştiği belirlenmiştir. Çalışmamızda tüm suşlar için inkübasyon süresinin uzamasıyla otoagregasyon yüzdelерinin arttığı belirlenmiştir. 24 saatin sonunda tüm izolatlarda

% otoagregasyon değeri %60'ın üzerinde tespit edilmiştir. Maya suşlarının *E.coli* ATCC 25922 suşu ile koagregasyon yetenekleri %0,0- 95,7 arasında bulunmuşken *S. Typhimurium* ATCC 14028 ile % koagregasyon değerleri ise %0,0 - %91,9 arasında tespit edilmiştir. Maya suşlarının; *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 ile % koagregasyon yetenekleri sırasıyla %0,0-95,1 ile %0,0- 88,7 arasında belirlenmiştir. Bu araştırmada koagregasyon yeteneğinin inkübasyon süresine ve suşuna bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Elde ettiğimiz mayaların çoğunun *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *B.cereus*, *C. sakazakii* ATCC 29544, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923, *S. Typhimurium* ATCC 140828'e karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan test edilen tüm antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği doğrulanmıştır. Hücrelerin DPPH süpürme aktivitesi, test edilen tüm maya suşlarında hücrelerin antioksidan aktivitesi hücre içi ekstraktlarından daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

MALDI-TOF ile tanımlaması yapılan mayalardan seçilen 9 suş daha sonra 18S-28S rRNA analizi ile de tanımlanmıştır. En yüksek probiyotik potansiyeli bulunan mayalardan birisi olan *Saccharomyces boulardii* ile %39,76 kakao kütlesi, %41,85 kakao yağı, %14,80 inülin, %1,60 steviosid ve %0,15 soya lesitini içeren şekersiz prebiyotik ve probiyotik özellikli çikolata enkapsülasyon yöntemi ile üretilmiştir. Bu çalışmada *S. boulardii* kakao tozu: Na-aljinat: fruktooligosakkaritler (10:1:1) oranında karışım ile kapsüllenmiştir. Kapsülleyici karışım %93,57 $\pm$ 1,02 kapsülleme verimliliği göstermiştir. Nihai ürünlerde en az 10^7 log kob/g canlı probiyotik sayısı sağlanmıştır. Çikolata örneklerinin kristal morfolojileri incelendiği zaman hacim artırıcı maddelerin (inülin) pürüzlü bir yapıya neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durum viskozite farkından kaynaklanmıştır. 25 °C'de 120 gün depolamadan sonra çikolata numunelerinin sertliğinde ve nem içeriğinde önemli bir değişiklik ($P \geq 0.05$) olmamıştır. 25 °C'de saklanan örneklerin hiçbirinde çiçeklenme gözlenmemiştir. Çikolata örneklerinde probiyotiklerin varlığında 25 °C'de 120 gün boyunca depolama sırasında pH değerlerinde önemli ($P < 0.05$) artış olduğu görülmüştür. Su aktivitesi değerlerinin de, 120 günlük depolamada düştüğü tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Taramalı elektron mikroskopunda kapsüllü mayaların çikolata içinde hapsedildiği görülmüştür. Yuvarlak şeklindeki mayalar homojen bir şekilde dağılmış ve kapsüllenmiş probiyotiklerin hücre görünümü tüm örneklerde aynı olmuştur. SEM görüntüleri, kapsülleyici karışımla dondurarak kurutma sırasında ve ayrıca kapsüllenmiş

çikolatalarda probiyotik bakterilerin normal boyutunun ve şeklinin değişmediğini göstermiştir. Depolamanın ilk gününde tüm çikolata uygulamalarında başlangıç probiyotik sayılarının benzer (>11 log) olduğu görülmüştür. En önemlisi, kapsüllenmiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş çikolatada, 25°C 'de 120 gün boyunca probiyotik sayısı $8,08 \log \text{ kob/g'nin}$ üzerinde kalmıştır. Kapsüllenmemiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş çikolatalarda depolama sırasında probiyotik sayılarında önemli ($P < 0.05$) ve kademeli bir düşüş ortaya çıkmıştır. Kapsüllemelerin koruyucu etkileri çikolatalarda karşılaştırıldığında, kapsüllenmemiş probiyotiklere kıyasla kapsüllenmiş çikolatalarda 120 gün sonunda daha fazla sayıda ($2,51 \log$) probiyotik tespit edilmiştir ve bu da enkapsulanların koruyucu etkileri olduğunu kanıtlamıştır. 25°C 'de bir günlük saklamanın ardından yapılan in vitro analizde, 2 saatlik mide sindirimine ($\text{pH } 3$) maruz bırakıldığında kapsüllenmemiş probiyotiklerle takviye edilmiş çikolatada $6,42 \pm 0,0 \log$ 'luk önemli ($P < 0,05$) bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak kapsüllenmiş probiyotik içeren çikolata numunesinde yalnızca $3,99 \pm 0,2 \log$ azalma olmuştur. Çikolatalarda probiyotiklerin daha düşük log azalması; hem kapsüllemenin hem de çikolatanın taşıyıcı olarak kullanılmasının in vitro sindirim sırasında probiyotikler üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Zorlu gastrik koşullar olan $\text{pH } 3$ ile karşılaştırıldığında bağırsakta probiyotik büyümesi için daha uygun olan $\text{pH'nin } 7$ olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar, kapsüllenmiş probiyotiklerle zenginleştirilmiş probiyotik çikolatanın, uzun süreli depolama sırasında minimum terapötik limitleri koruyabildiğini açıkça göstermiştir. Ayrıca çikolata bileşenlerinin kompleks karışımının gastrointestinal kanalda probiyotik büyümesi için iyi bir besin kaynağı olduğu sonucuna varılmıştır. Çikolata örneklerinde yağ asidi analizi GC-FID kullanılarak belirlenmiştir. Tüm örneklerde en fazla stearic asit tespit edilmiş olup yağ asidi miktarı depolama süresince önemli bir değişim göstermemiştir ($P < 0,05$).

Sonuç olarak bu doktora tez çalışmasında, maya suşlarının umut verici probiyotik potansiyele sahip olduğu gösterilmiş olup geleneksel olarak üretilen ürünlerde bulunan probiyotiklerin fonksiyonel özellikleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir.

Bu çalışmanın bulgularına göre, *S. boulardii* ile zenginleştirilmiş probiyotik çikolatanın iyi bir besin kaynağı ve insan sağlığı açısından potansiyel prebiyotik olan fonksiyonel bir atıştırma olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu bulgular, probiyotik çikolatanın, probiyotik işlevselliğinden ödün vermeden oda sıcaklığında saklanabileceğini göstermiştir.



KAYNAKLAR

- Abbas, C.A. (2006). Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. In *The Yeast Handbook: Yeasts in Food and Beverages* ed. Querol, A. and Fleet, G.H. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Abd El-Salam, M. H., Hippen, A. R., El-Shafie, K., Assem, F. M., ... Abbas, H. (2011). Preparation and properties of probiotic concentrated yoghurt (labneh) fortified with conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 2103-2110.
- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., & Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT Food Science Technology*, 79, 316-325.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., & Fowler, M. (2007). Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review, *Trends in Food Science & Technology*, 18(6), 290-298.
- Afzaal, M., Saeed, F., Arshad, M.U., Nadeem, M.T., Saeed, M., Tufail, T. (2019). The effect of encapsulation on the stability of probiotic bacteria in ice cream and simulated gastrointestinal conditions, *Probiotics Antimicrobial Proteins*, 11 (4), 1348-1354.
- Ahmed, W. ve Rashid, S. (2019). Functional and therapeutic potential of inulin: A comprehensive review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(1), 1-13.
- Aidoo, R. P., Afoakwa, E. O., & Dewettinck, K. (2014). Optimization of inulin and polydextrose mixtures as sucrose replacers during sugar-free chocolate manufacture-rheological, microstructure and physical quality characteristics, *Journal of Food Engineering*, 126, 35-42.
- Aidoo, R. P., Afoakwa, E. O., & Dewettinck, K. (2015). Rheological properties, melting behaviours and physical quality characteristics of sugar-free chocolates processed using inulin/polydextrose bulking mixtures sweetened with stevia and thaumatin extracts, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 62 (1), 592-597.
- Aidoo, R. P., Depypere, F., Afoakwa, E. O. & Dewettinck, K. (2013). Industrial manufacture of sugar-free chocolates – applicability of alternative sweeteners and carbohydrate polymers as raw materials in product development, *Trends in Food Science & Technology*, 32(2), 84-96.
- Aloglu, H. S., Ozer, E. G., & Oner, Z. (2016). Assimilation of cholesterol and probiotic characterization of yeast strains isolated from raw milk and fermented foods. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 63-70.

- Aloglu, H.S., Ozer, E.D., & Oner, Z. (2015). Assimilation of cholesterol and probiotic characterisation of yeast strains isolated from raw milk and fermented foods. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 63-70.
- Al-Seraih, A., Flahaut, C., Krier, F., Cudennec, B. & Drider, D. (2015). Characterization of *Candida famata* isolated from poultry feces for possible probiotic applications. *Probiotics Antimicrobial Proteins*, 7, 233-241.
- Amorim, J. C., Piccoli, R. H., & Duarte, W. F. (2018). Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Research International*, 107, 518-527.
- Ansari, F., Alian Samakkhah, S., Bahadori, A., Jafari, S.M., Ziaee, M., Khodayari, M.T., Pourjafar, H. (2021). Health-promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(4), 457-485.
- Arevalo-Villena, M., Briones-Perez, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Biotechnological application of yeasts in food science: starter cultures, probiotics and enzyme production. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1360-1372.
- Arroyo-Lopez, F.N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodriguez-Gomez, F., Jimenez-Diaz, R., Garcia-Garcia, P., Querol, A. and Garrido-Fernandez, A. (2012) Yeasts in table olive processing: desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, 160, 42–49.
- Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official methods of analysis of AOAC international*. Association of Official Analytical Chemists.
- Atlas, R. (2006). *Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food*, (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Baccouri, O., Boukerb, A. M., Farhat, L. B., Zébré, A., Zimmermann, K., Domann, E., ... & Muller, C. (2019). Probiotic potential and safety evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, isolated from traditional tunisian testouri cheese and rigouta, using physiological and genomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 881.
- Balasubramanian, K. & Ragunathan, R. (2012). Study of antioxidant and anticancer activity of natural sources. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 2, 192-197.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-Lopez, F.N., Rantsiou, K., Jimenez-Diaz, R., Garrido-Fernandez, A. & Cocolin, L. (2013) Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50, 135-142.
- Bevilacqua, A., Beneduce, L., Sinigaglia, M., Corbo, M.R. (2013). Selection of yeasts as starter cultures for table olives. *Journal of Food Science*, 78, M742–M751.
- Bevilacqua, A., Campaniello, D., Speranza, B., Sinigaglia, M. & Corbo, M. R. (2014). Selection of promising probiotic strains for foods: proposal for a possible flow-chart with a special focus on the dark side of probiotics. In *Probiotics in Health and Disease*. New Research ed. Roma, A. (pp. 1- 22). New York: Nova Publisher.

- Binetti, A., Carrasco, A., Reinheimer, J. and Suarez, V. (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 434-444.
- Biswas, N., Cheow, Y. L., Tan, C. P. & Siow, L. F. (2017). Physical, rheological and sensorial properties, and bloom formation of dark chocolate made with cocoa butter substitute (CBS), *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 82, 420-428.
- Bonatsou, S., Benitez, A., Rodriguez-Gomez, F., Panagou, E.Z. & Arroyo-Lopez, F.N. (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiology*, 46, 66-73.
- Bonatsou, S., Karamouza, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Kletsas, D., Papadimitriou, K., Tsakalidou, T., Nychas, G.J.E., Panagou, E. Z. (2018). Evaluating the probiotic potential and technological characteristics of yeasts implicated in cv. Kalamata natural black olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 271, 48-59.
- Boris, S., Suárez, J.E., Vázquez, F., Barbés, C. (1998). Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and Immunity*, 66,1985-1989.
- Buerth, C., Tielker, D. & Ernst, J.F. (2016), *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: yeast relatives with expanding applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 100, 6981-6990.
- C'avez, B., Ledebor, A. (2007). Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*, 25(7-8), 1193-1201.
- Campana, R., Van Hemert, S., & Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, 9,12.
- Canani, R. B., Cucchiara, S., Cuomo, R., Pace, F., & Papale, F. (2011). *Saccharomyces boulardii*: a summary of the evidence for gastroenterology clinical practice in adults and children. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15(7), 809-822.
- Chan, M.Z.A., Liu, S.Q. (2022). Coffee brews as food matrices for delivering probiotics: opportunities, challenges, and potential health benefits. *Trends Food Science Technology*, 119, 227-242.
- Chaves-Lopez, C., Serio, A., Paparella, A., Martuscelli, M., Corsetti, A.,... Tofalo, R., (2014). Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Food Microbiology*, 42, 117–121.
- Chen, H.Y., Li, X.Y., Liu, B.J., Meng, X.H. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions, *Journal of Functional Foods*, 29, 248-255.
- Cheng, J.W.S., Tang, Y.E., Jureen, R., Lin, R.T.P. & Teo, J.W.P. (2013). Modified protocol for yeast identification using matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *American Journal of Microbiological Research*, 1(4):71-73.

- Cizeikiene, D. & Jagelaviciute, J. (2021). Investigation of antibacterial activity and probiotic properties of strains belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera for their potential application in functional food and feed products. *Probiotics Antimicrobial Proteins*, 13(5), 1387-1403.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, United States: Wayne Pennsylvania.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226, 1065-1073.
- Correa Franca, R., Rochedo Conceição, F., Mendocça, M., Haubert, L., Sabadin, G., Diaz de Oliveira, P., Amaral, M.G.,... Padilha da Silva, W. (2015). *Pichia pastoris* X- 33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella* Typhimurium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 7953-7961.
- Czerucka, D., Piche, T. & Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26, 767-778.
- Davinelli, S., Corbi, G., Righetti, S., Sears, B., Olarte, H.H., Grassi, D., Scapagnini, G. (2018). Cardioprotection by cocoa polyphenols and ω -3 fatty acids: a disease-prevention perspective on aging-associated cardiovascular risk, *Journal of Medicinal Food*, 21(10), 1060-1069.
- de Araújo Etchepare, M., Nunes, G.L., Nicoloso, B.R., Barin, J.S., Moraes Flores, E.M., de Oliveira Mello, R., Ragagnin de Menezes, C. (2020). Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins, *LWT*, 117, 108601.
- de Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., Ramos, Ó. L. (2017). Micro-and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 23-45.
- Diosma, G., Romanin, D.E., Rey-Burusco, M.F., Londero, A. & Garrote, G.L. (2014). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterisation. *World Journal Microbiology Biotechnolog*, 30, 43-53.
- Diosma, G., Romanin, D.E., Rey-Burusco, M.F., Londero, A., and Garrote, G.L., (2014). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 43-53.
- Do, T. A., Hargreaves, J. M., Wolf, B., Hort, J., & Mitchell, J. R. (2007). Impact of particle size distribution on rheological and textural properties of chocolate models with reduced fat content. *Journal of food science*, 72(9), E541-E552.
- Dong, Q.Y., Chen, M.Y., Xin, Y., Qin, X.Y., Cheng, Z., Shi, L.E., Tang, Z.X. (2013). Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(7), 1339-1351.

- Dumitrescu, L., Popescu-Olaru, I., Cozma, L., Tulbă, D., Hinescu, M.E., Ceafalan, L.C., Gherghiceanu, M., Popescu, B.O. (2018). Oxidative stress and the microbiota-gut-brain axis. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B., & Cosentino, S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT*, 75, 100-106.
- Fakruddin, M. D., Hossain, M. N., & Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 1-11.
- FAO/WHO (2002). Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, London, Ontario, Canada.
- Farzanmehr, H. & Abbasi, S. (2009). Effects of inulin and bulking agents on some physicochemical, textural and sensory properties of milk chocolate. *Journal of Texture Studies*, 40(5), 536-553.
- Fernandez Maura, Y., Balzarini, T., Clape Borges, P., Evrard, P., De Vuyst, L. & Daniel, H.M. (2016). The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 233, 34-43.
- Fernandez-Gonzalez, M., Espinosa, J.C., Ubeda, J.F. and Briones, A.I. (2001). Yeasts present during wine fermentation, Comparative analysis of conventional plating and PCR-TTGE. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 639-644.
- Fhoula, I., Rehaïem, A., Najjari, A., Usai, D., Boudabous, A., Sechi, L. A., & Hadda-Imene, O. (2018). Functional probiotic assessment and in vivo cholesterol-lowering efficacy of *Weissella* sp. associated with arid lands living-hosts. *BioMed Research International*, (1), 1654151.
- Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., Tzia, C. (2020). A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(9), 1515-1536.
- França, R., Conceição, F., Mendonça, M., Haubert, L., Sabadin, G., Díaz de Oliveira, P., AmaralMG., da Silva, W.P., Moreira, A.N. (2015). *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella* Typhimurium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 7953-7961.
- Furuhashi, T., Sugitate, K., Nakai, T., Jikumaru, Y., Ishihara, G. (2018). Rapid profiling method for mammalian feces short chain fatty acids by GC-MS, *Analytical Biochemistry*, 543, 51-54.
- Gadhiya, D., Shah, N.P., Patel, A.R., Prajapati, J.B. (2018). Preparation and shelf life study of probiotic chocolate manufactured using *Lactobacillus Helveticus* Mtcc 5463. *Acta Alimentaria*, 47(3), 350-358.
- García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Nicoli, J. R., Iglesias, A. E., ... Halaihel, N. (2012). Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 798-802.

- Gebara, C., Chaves, K.S., Ribeiro, M.C.E., Souza, F.N., Grosso, C.R., Gigante, M.L. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 51(2), 872-878.
- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1156-1162.
- Gómez-Zavaglia, A., Kociubinsky, G., Pérez, P., Disalvo, E., De Antoni, G.L. (2002). Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 93,794-799.
- González, J. A., Gallardo, C. S., Pombar, A., Rego, P., and Rodríguez, L. A. (2004). Determination of enzymatic activities in ecotypic *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 3, 743-750.
- Gotteland, M., Poliak, L., Cruchet, S., Brunser, O. (2005). Effect of regular ingestion of *Saccharomyces boulardii* plus inulin or *Lactobacillus acidophilus* LB in children colonized by *Helicobacter pylori*. *Acta Paediatrica*, 94(12), 1747-1751.
- Granato, D., Barba, F.J., Kovačević, D.B., Lorenzo, J.M., Cruz, A.G., Putnik, P. (2020). Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11, 93-118.
- Grand View Research, (2020). Chocolate market size, share and trends analysis report by product (traditional, artificial), by distribution channel (supermarket and hypermarket, convenience store, online), by region, and segment forecasts, 2020–2027. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/chocolate-market> adresinden 30 Haziran 2021 tarihinde alınmıştır.
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58, 56-66.
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., ve Donkor, O. N. (2018). *Salmonella* infection prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: A review. *Microbiology*.
- Hadnağev, M., Dokic, L., Hadnağev, T. D., Pajin, B. ve Krstonosic, V. (2011). The impact of maltodextrin-based fat mimetics on rheological and textural characteristics of edible vegetable fat. *Journal of Texture Studies*, 42(5), 404-411.
- Hellström, A.M., Almgren, A., Carlsson, N.-G., Svanberg, U. and Andlid, T.A. (2012). Degradation of phytate by *Pichia kudriavzevii* TY13 and *Hanseniaspora guilliermondii* TY14 in Tanzanian togwa. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 73–77.

- Hinne, M., Van de Walle, D., Haeck, J., Abotsi, E.E., De Winne, A., Saputro, A.D., Messens, K., Van Durme, J., Afoakwa, E.O., De Cooman, L., Dewettinck, K. (2019). Applicability of the melanger for chocolate refining and Stephan mixer for conching as small-scale alternative chocolate production techniques. *Journal of Food Engineering*, 253, 59-71.
- Hossain, M. N., Ranadheera, C. S., Fang, Z., Masum, A. K. M., & Ajlouni, S. (2022). Viability of *Lactobacillus delbrueckii* in chocolates during storage and in-vitro bioaccessibility of polyphenols and SCFAs. *Current Research in Food Science*, 5, 1266-1275.
- Hossain, M.N., Ranadheera, C.S., Fang, Z., Ajlouni, S. (2021a). Healthy chocolate enriched with probiotics: a review. *Food Science Technology*, 41 (3), 531-543.
- Hossain, M.N., Ranadheera, C.S., Fang, Z., Ajlouni, S. (2021b). Impact of encapsulating probiotics with cocoa powder on the viability of probiotics during chocolate processing, storage, and in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Food Science*, 86 (5), 1629-1641.
- Hossain, M.N., Ranadheera, C.S., Fang, Z., Hutchinson, G., Ajlouni, S. (2021c). Protecting the viability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* LGG using chocolate as a carrier. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 647-656.
- Hsiung, R.T., Fang, W.T., LePage, B.A., Hsu, S.A., Hsu, C.H. & Chou, J.Y. (2021). In vitro properties of potential probiotic indigenous yeasts originating from fermented food and beverages in Taiwan, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13, 113-124.
- ICCO, 2021. International Cocoa Organization. Supply-demand QBCS XLVII, No. 1 (Online).
- Jeyarani, T., Banerjee, T., Ravi, R., Krishna, A. G. G. (2015). Omega-3 fatty acids enriched chocolate spreads using soybean and coconut oils. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 1082-1088.
- Juturu, V. and Wu, J. (2018). Microbial production of bacteriocins: latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, 36, 2187-2200.
- Kaczorek, E., Chrzanowski, L., Pijanowska, A., Olszanowski, A. (2008) Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: rhamnolipids and saponins. *Bioresource Technology*, 99, 4285-4291.
- Kaushik, J.K., Kumar, A., Duany, R.K., Mohanty, A.K., Grover, S., Batish, V.K. (2009). Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PloS one*, 4(12), e8099.
- Kelesidis, T., & Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutics Advances in Gastroenterology*, 5, 111-125.
- Kemsawasd, V., Chaikham, P., Rattanasena, P. (2016). Survival of immobilized probiotics in chocolate during storage and with an in vitro gastrointestinal model. *Food Bioscience*, 16, 37-43.
- Kinta, Y. ve Hartel, R. W. (2010). Bloom formation on poorly-tempered chocolate and effects of seed addition. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87(1), 19-27.

- Kobus-Cisowska, J., Szymanowska, D., Maciejewska, P., Szczepaniak, O., Kmiecik, D., Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Cielecka-Piontek, J. (2019). Enriching novel dark chocolate with *Bacillus coagulans* as a way to provide beneficial nutrients. *Food and Function*, 10(2), 997-1006.
- Kopit, L. M., E. B. Kim, R. J. Siezen, L. J. Harris, & M. L. Marco. (2014). Safety of the surrogate microorganism *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 for use in thermal process validation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1899-1909.
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science*, 87, 4050-4056.
- Kwofie, M.K., Bukari, N., Adeboye, O. (2020). Probiotics potential of yeast and lactic acid bacteria fermented foods and the impact of processing: a review of indigenous and continental food products. *Advances in Applied Microbiology*, 10, 492-507.
- Lara-Hidalgo, C. E., Dorantes-Álvarez, L., Hernández-Sánchez, H., Santoyo-Tepole, F., Martínez-Torres, A., Villa-Tanaca, L., & Hernández-Rodríguez, C. (2019). Isolation of yeasts from guajillo pepper (*Capsicum annuum* L.) fermentation and study of some probiotic characteristic, *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 748-764.
- Leaw, S. N., Chang, H. C., Barton, R., Bouchara, J. P., & Chang, T. C. (2007). Identification of medically important *Candida* and non-*Candida* yeast species by an oligonucleotide array. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7), 2220-2229.
- Lim, P. Y., Wong, K. Y., Thoo, Y. Y. ve Siow, L. F. (2021). Effect of inulin, fructo-oligosaccharide, trehalose or maltodextrin (M10 and M30) on the physicochemical and sensory properties of dark compound chocolate. *LWT*, 149, 111964.
- Łukaszewicz, M. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*–Probiotic Yeast. In *Probiotics*. IntechOpen.
- Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A. (2014). Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2578-2590.
- Martín, M.A., Ramos, S. (2016). Cocoa polyphenols in oxidative stress: potential health implications. *Journal of Functional Foods*, 27, 570-588.
- Martins, F.S., Silva, A.A.,... Vieira, A.T. (2009). Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces bouardii* probiotic properties. *Archives of Microbiology*, 191, 623-630.
- Masum, A., Chandrapala, J., Adhikari, B., Huppertz, T., Zisu, B. (2019). Effect of lactose-to-maltodextrin ratio on emulsion stability and physicochemical properties of spray-dried infant milk formula powders. *Journal of Food Engineering*, 254, 34-41.

- McFarland, L.V. (2017). Floch, M.H., Ringel, Y., Walker, W.A. (Ed.), *Common organisms and probiotics: Saccharomyces boulardii*. The microbiota in gastrointestinal pathophysiology. London: Academic Press, 145-164.
- McFarland, L.V., Evans, C.T., Goldstein, E.J.C. (2018). Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*, 5, 124.
- Melo, C. W. B. D., Bandeira, M. D. J., Maciel, L. F., Bispo, E. D. S., Souza, C. O. D., Soares, S. E. (2020). Chemical composition and fatty acids profile of chocolates produced with different cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars. *Food Science and Technology*, 40, 326-333.
- Menezes, A.G.T., Ramos, C.L., Cenzi, G., Melo, D.S., Dias, D.R., Schwan, R.F. (2020). Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 280-288.
- Meyer, D., Bayarri, S., Tarrega, A., Costell, E. (2011). Inulin as texture modifier in dairy products. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1881-1890.
- Millsap, K., Van Der Mei, H., Bos, R. and Busscher, H. (1998). Adhesive interactions between medically important yeasts and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(4), 321-336.
- Min, M., Bunt, C. R., Mason, S. L., Hussain, M. A. (2019). Non-dairy probiotic food products: an emerging group of functional foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(16), 1-16.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Menard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S., Weitschies, W., Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113-1124.
- Mirkovic, M., Seratlic, S., Kilcawley, K., Mannion, D., Mirkovic, N., & Radulovic, Z. (2018). The sensory quality and volatile profile of dark chocolate enriched with encapsulated probiotic *Lactobacillus plantarum* bacteria. *Sensors*, 18(8), 8.
- Mishra, K., Ojha, H. & Chaudhury, N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036-1043.
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6463-6472.
- Moroni, A.V., Arendt, E.K. & Dal Bello, F. (2011). Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiology*, 28, 497-502.
- Motta, V. T. (2000). Bioquímica clínica: princípios e interpretações. Editora Médica Massau.

- Naimah, A. K., Al-Manhel, A. J. A., & Al-Shawi, M. J. (2018). Isolation, purification and characterization of antimicrobial peptides produced from *Saccharomyces boulardii*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24, 455-461.
- Nambiar, R. B., Sellamuthu, P. S., & Perumal, A. B. (2018). Development of milk chocolate supplemented with microencapsulated *Lactobacillus plantarum* HM47 and to determine the safety in a Swiss albino mice model. *Food Control*, 94, 300-306.
- Nami, Y., Haghshenas, B., Haghshenas, M., & Yari Khosroushahi, A. (2015). Antimicrobial activity and the presence of virulence factors and bacteriocin structural genes in *Enterococcus faecium* CM33 isolated from ewe colostrum. *Frontiers in Microbiology*, 6, 782.
- Nami, Y., Vaseghi, Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh, Jalaly. H., Lotfi, H., Eslami, S., & Hejazi MA (2019). Probiotic properties of *Enterococcus* isolated from artisanal dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 10, 300.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (1993). Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test: Tentative Standards, vol. 13 24. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA. NCCLS Documents M2-A5. Pedersen, L.L., Owusu-Kwarteng.
- Nebesny, E., Żyżelewicz, D., Motyl, I., & Libudzisz, Z. (2007). Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. *European Food Research and Technology*, 225, 33-42.
- Nejati, F., Oelschlaeger, A.T. (2016). In vitro characterization of *Lactococcus lactis* strains isolated from Iranian traditional dairy products as a potential probiotic. *Applied Food Biotechnology*, 3, 43–51.
- Nwanyanwu, C.E., Alisi, C.S., Nweke, C.O., Orji, J.C. (2012). Cell surface properties of phenol-utilizing bacteria isolated from petroleum refinery wastewater. *Journal of Research in Biology*, 2, 383-391.
- Ochangco, H.S., Gamero, A., Smith, I.M., Christensen, J.E., Jespersen, L. and Arnerborg, N. (2016) In vitro investigation of *Debaryomyces hansenii* strains for potential probiotic properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 141.
- Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., & Agrawal, R. (2015a). Hypolipidaemic and antioxidant effects of functional cereal-mix produced with probiotic yeast in rats fed high cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*, 17, 742-748.
- Ogunremi, O.R., Sanni, A.I. & Agrawal, R. (2015b) Probiotic potential of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 797-808.
- Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y., & Kawaguchi, M. (2013). Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nature Communications*, 4, 2191.
- Oliveira, T., Ramalhosa, E., Nunes, L., Pereira, J. A., Colla, E., & Pereira, E. L. (2017). Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives from Northeast of Portugal. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 44, 167-172.

- Omemu, A.M., Oyewole, O.B. & Bankole, M.O. (2007). Significance of yeasts in the fermentation of maize for ogi production. *Food Microbiology*, 24, 571-576.
- Oracz, J., Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Budryn, G., Luzak, B. (2020). Bioavailability and metabolism of selected cocoa bioactive compounds: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(12), 1947-1985.
- Orłowski, A., Bielecka, M. (2006). Preliminary characteristics of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains as probiotic candidates. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 15, 269-275.
- Padilla, B., Frau, F., Ruiz-Matute, A. I., Montilla, A., Belloch, C.,... Manzanares, P., (2015). Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by β -galactosidases from dairy *Kluyveromyces*. *Journal of Dairy Research*, 82, 356-364.
- Pais, P., Almeida, V., Yilmaz, M., Teixeira, M.C. (2020). *Saccharomyces boulardii*: what makes it tick as successful probiotic?. *Journal of Fungi*, 6(2), 78.
- Palma, M. L., Zamith-Miranda, D., Martins, F. S., Bozza, F. A., Nimrichter, L., Montero-Lomeli, M., ... Douradinha, B. (2015). Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: Is there room for improvement? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(16), 6563–6570.
- Pandiyan, C., Annal Villi, R., Kumaresan, G., Murugan, B., & Gopalakrishnamurthy, T. R. (2012). Development of synbiotic ice cream incorporating *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces boulardii*. *International Food Research Journal*, 19(3).
- Pech-Canul, A.d. I.C., Ortega, D., García-Triana, A., Gonz'alez-Silva, N. (2020). A brief review of edible coating materials for the microencapsulation of probiotics. *Coatings*, 10 (3), 197.
- Perez Coello, M., Briones Perez, A.I. & Ubeda Iranzo, J.F. (1999). Characteristics of wine fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from La Mancha region. *Food Microbiology*, 16, 563-573.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M.R. and Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 26-35.
- Perrier, J. D., Mihalov, J. J. & Carlson, S. J. (2018). FDA regulatory approach to steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*, 122, 132-142.
- Petruzzi, L., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. and Bevilacqua, A. (2016). Ochratoxin A removal by yeasts after exposure to simulated human gastrointestinal conditions. *Journal of Food Science*, 81, M2756–M2760.
- Pienaar, G.H., Einkamere, O.B., Van der Merwe, H.J., Hugo, A. & Fair, M.D. (2015). The effect of an active live yeast product on the digestibility of finishing diets for lambs. *Small Ruminant Research*, 123, 8-12.
- Pieniz S., Andreazza R., Anghinoni T., Camargo F., Brandelli A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37,251-256.

- Pieniz, S., T. M. de Moura, A. P. V. Cassenego, R. Andreazza, A. P. G. Frazzon, F. A. de Oliveira Camargo, & A. Brandelli, (2015). Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control*, 51,49-54.
- Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A. and Bezirtzoglou, E. (2012). Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: a review. *Engineering in Life Sciences*, 12, 1-9.
- Posteraro, B., Sanguinetti, M., Romano, L., Torelli, R., Novarese, L., & Fadda, G. (2005). Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), 295-304.
- Powell, C. D., Quain, D. E., & Smart, K. A. (2003). The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS yeast research*, 3(2), 149-157.
- Prado, S., Romalde, J. L., & Barja, J. L. (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiology*, 1-11.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.
- Probiotics Market Outlook. (2018). Development trends, market demands, industry analysis & forecast by 2024. Maharastra, India.
- Psani, M. and Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1329-1336.
- Ragavan, M. L., & Das, N. (2017). Isolation and characterization of potential probiotic yeasts from different sources. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(4), 451-5.
- Rai, A. K., & Jeyaram, K. (2017). Satyanarayana, T. & Kunze, G. (Ed.). *Role of yeasts in food fermentation. Yeast diversity in human welfare*. Singapore: Springer.
- Rai, A. K., Kumari, R., Sanjukta, S., & Sahoo, D. (2016). Production of bioactive protein hydrolysate using the yeasts isolated from soft chhurpi. *Bioresource Technology*, 219, 239-245.
- Rai, A. K., Pandey, A., & Sahoo, D. (2018). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*.
- Rai, A. K., Sanjukta, S., & Jeyaram, K. (2017). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 2789-2800.
- Rajkowska, K., & Kunicka-Styczyńska, A. (2010). Probiotic properties of yeasts isolated from chicken feces and kefirs. *Polish Journal of Microbiology*, 59(4), 257.
- Rajkowska, K., Kunicka-Styczynska, A., & Rygala, A. (2012). Probiotic activity of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* against human pathogens. *Food Technology and Biotechnology*, 50(2), 230.

- Ramos C.L., De A.E.G., Freire A.L., Schwan R.F. (2011). Diversity of bacteria and yeast in the naturally fermented cotton seed and rice beverage produced by Brazilian Amerindians. *Food Microbiology*, 28, 1380-1386.
- Ranadheera, C. S., Naumovski, N., Ajlouni, S. (2018). Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations. *Current Opinion in Food Science*, 22, 109-114.
- Rinkinen M., Jalava K., Westermarck E., Salminen S. & Ouwehand A. C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?. *Veterinary Microbiology*, 92(1-2), 111-119.
- Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 93, 13-25.
- Rodriguez Furlan, L. T., Baracco, Y., Lecot, J., Zaritzky, N. v& Campderros, M. E. (2017). Effect of sweetener combination and storage temperature on physicochemical properties of sucrose free white chocolate. *Food Chemistry*, 229, 610-620.
- Romanin, D. E., Llopis, S., Genoves, S., Martorell, P., Ram on, V. D., Garrote, G. L., et al. (2015). Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows antiinflammatory and anti-oxidative stress properties in vivo models. *Beneficial Microbes*, 1-12.
- Romano, P., Pietrafesa, R., Romaniello, R., Zambuto, M., Calabretti, A. & Capece, A. (2015). Impact of yeast starter formulations on the production of volatile compounds during wine fermentation. *Yeast*, 32, 245-256.
- Roohvand, F., Ehsani, P., Abdollahpour-Alitappeh, M., Shokri, M. Kossari, N. (2020). Biomedical applications of yeasts-a Patent view, part two: era of humanized yeasts and expanded applications. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30, 609-631.
- Saad, S. M. I., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. (2011). Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas (1. ed.). São Paulo: Livraria Varela.
- Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z., & Khosroushahi, A. Y. (2017b). Secretion metabolites of dairy *Kluyveromyces marxianus* AS41 isolated as probiotic, induces apoptosis in different human cancer cell lines and exhibit anti-pathogenic effects. *Journal of Functional Foods*, 34, 408-421.
- Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z., Jam, A. M., & Khosroushahi, A. Y. (2017a). Secretion metabolites of probiotic yeast, *Pichia kudriavzevii* AS-12, induces apoptosis pathways in human colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*.41, 36-46
- Saikia, D., Manhar, A. K., Deka, B., Roy, R., Gupta, K.,... Namsa, N. D., (2017). Hypocholesterolemic activity of indigenous probiotic isolate *Saccharomyces cerevisiae* ARDMC1 in a rat model. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 154-162.

- Sambrani, R., Abdolalizadeh, J., Kohan, L. Jafari, B. (2021). Recent advances in the application of probiotic yeasts, particularly *Saccharomyces*, as an adjuvant therapy in the management of cancer with focus on colorectal cancer. *Molecular Biology Reports*, 48, 1-10.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R. & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605-616.
- Scott, K.P., Grimaldi, R., Cunningham, M., Sarbini, S.R., Wijeyesekera, A., Tang, M.L.K., Lee, J.C.Y., Yau, Y.F., Ansell, J.,... Theis, S. (2019). Developments in understanding and applying prebiotics in research and practice—an ISAPP conference paper. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 934-949.
- Shah, A. B., Jones, G. P. & Vasiljevic, T. (2010). Sucrose-free chocolate sweetened with *Stevia rebaudiana* extract and containing different bulking agents - effects on physicochemical and sensory properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(7), 1426-1435.
- Shekarchizadeh, H., Kadivar, M., Ghaziaskar, H. S., & Rezayat, M. (2009). Optimization of enzymatic synthesis of cocoa butter analog from camel hump fat in supercritical carbon dioxide by response surface method (RSM). *The Journal of Supercritical Fluids*, 49(2), 209-215.
- Shi, Y., Zhai, M., Li J. & Li, B. (2020). Evaluation of safety and probiotic properties of a strain of *Enterococcus faecium* isolated from chicken bile. *Journal of Food Science and Technology*, 57(2), 578-587.
- Silva, M. P., Tulini, F. L., Marinho, J. F., Mazzocato, M. C., De Martinis, E. C., Luccas, V., Favaro-Trindade, C. (2017). Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1: evaluation of chocolate stability and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, 75, 640-647.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C. M., Peres, C., and Malcata, F. X., (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behaviour, *LWT-Food Science and Technology*, 44(6), 1349-1354.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C.M., Peres, C., Malcata, F.X. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT* , 44(6), 1349-1354.
- Singh, T.P., Kaur, G., Malik, R.K., Schillinger, U., Guigas, C., & Kapila, S. (2012). Characterization of intestinal *Lactobacillus reuteri* strains as potential probiotics. *Probiotics Antimicrobial Proteins*, 4,47-58.
- Smith, I.M., Baker, A., Arnerborg, N. and Jespersen, L. (2015). Non- *Saccharomyces* yeasts protect against epithelial cell barrier disruption induced by *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 61, 491-497.
- Socci, V., Tempesta, D., Desideri, G., De Gennaro, L., Ferrara, M. (2017). Enhancing human cognition with cocoa flavonoids. *Frontiers in Nutrition*, 4, 19.

- Son, S.H., Yang, S.J., Jeon, H.L., Yu, H.S., Lee, N.K., Park, Y.S., Paik, H.D. (2018). Antioxidant and immunostimulatory effect of potential probiotic *Lactobacillus paraplantarum* SC61 isolated from Korean traditional fermented food, jangajji. *Microbial Pathogenesis*, 125, 486-492.
- Song, H., Yu, W., Liu, X. & Ma, X. (2014). Improved probiotic viability in stress environments with post culture of alginate microencapsulated low density cells. *Carbohydrate Polymers*, 108, 10-16.
- Sorrenti, V., Ali, S., Mancin, L., Davinelli, S., Paoli, A., Scapagnini, G. (2020). Cocoa polyphenols and gut microbiota interplay: bioavailability, prebiotic effect, and impact on human health. *Nutrients*, 12 (7), 1908.
- Staniszewski, A., Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potential probiotic yeasts—characteristics and food application. *Food*, 10, 1306.
- Stortz, T. A. ve Marangoni, A. G. (2011). Heat resistant chocolate, *Trends in Food Science & Technology*, 22(5), 201-214.
- Strauss, M.L.A, Jolly, N.P., Lambrechts, M.G. and Rensburg, P., (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91(1), 182-190.
- Swanson, K.S., Gibson, G.R., Hutkins, R., Reimer, R.A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K.P., Holscher, H.D., Azad, M.B.,... Delzenne, N.M., (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 17(11), 687-701
- Syal P. & Vohra A. (2013). Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5(3), 390-398.
- Syal, P. ve Vohra, A. (2013). Probiotic potential of yeasts from traditional Indian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5(2), 390–398.
- Szajewska, H., & Kołodziej, M. (2015). Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 42, 1149-1157.
- Tareb R., Bernardeau M., Gueguen M. & Vernoux J.P. (2013). In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heatkilled forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 637-649.
- Tasteyre, A., Barc, M. C., Karjalainen, T., Bourlioux, P., & Collignon, A. (2002). Inhibition of in vitro cell adherence of *Clostridium difficile* by *Saccharomyces boulardii*. *Microbial Pathogenesis*, 32(5), 219-225.
- Todorov, S.D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B., Holzapfel, W.H., Dicks, L.M.T. (2008). Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 465-477.

- Tulumoglu, S., Yuksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., Simsek, O., Cinar, B. & Yasar, E. (2013). Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe*, 24, 36-42.
- Türk Gıda Kodeksi (2017) *Türk Gıda Kodeksi Kakao ve Çikolata Ürünleri Tebliği* (Tebliğ No: 2017/29). Resmi Gazete (Tarih: 3 Kasım 2017 Cuma, Sayı: 302299). <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/11/20171103-10.htm>
- Ubeda, J., Chacon-Ocana, M., Diaz-Hellin, P., Ramirez-Perez, H & Briones, A. (2016). Genetic and phenotypic characterisation of *Saccharomyces* spp. strains isolated in ancient distillery plants. *FEMS Yeast Research*, 16, 35.
- Uysal, S. (2016). *Yoğurtlardan İzole edilen Mayaların Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması*. [0Yüksek Lisans Tezi], Gazi Üniversitesi.
- Van de Walle, D., Heymans, R. & Dewettinck, K. (2018). Linking the physicochemical properties of bulking agents to the sensory characteristics of fat-based suspensions. *Journal of Food Engineering*, 234, 82-89.
- Vera-Pingitore, E., Jimenez, M.E., Dallagnol, A., Belfiore, C., Fontana, C., Fontana, P., Wright, A., Vignolo, G. & Plumed-Ferrer, C. (2016). Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. *LWT*, 71, 288-294.
- Vidhyasagar, V. & Jeevaratnam, K. (2013). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. *Journal of Functional Foods*, 5, 235-243.
- Viljoen, B.C. (2006) Querol A, Fleet H (ed.). Yeast ecological interactions. Yeast–yeast, yeast–bacteria, yeast fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. Yeasts in food and beverages. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 83-110.
- Wang, R., Sun, J., Lassabliere, B., Yu, B., Liu, S. Q. (2022). Green tea fermentation with *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and *Lactiplantibacillus plantarum* 299V. *LWT*, 157, 113081.
- Wasilewski, A., M. Zielińska, M. Storr and J. Fichna. (2015). Beneficial effects of probiotics, prebiotics, synbiotics, and psychobiotics in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(7), 1674-1682.
- Wilson, B., ve Whelan, K. (2017). Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: Definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32, 64-68.
- Xu, R., Ma, S., Wang, Y., Liu, L., & Li, P. (2010). Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. *African Journal of Microbiology Research*, 4(9), 783-795.
- Yalçın, H. Y., (2007). *Beyaz Peynirlerde Bozulmaya Neden Olan Yarrowia lipolytica ve Debaryomyces hansenii'nin Fenotipik ve Genotipik İdentifikasyonu* [Doktora Tezi]. Ege Üniversitesi.
- Yalçın, H. Y., Çorbacı, C., (2013). Isolation and Characterization of Amylase Producing Yeasts and Improvement of Amylase Production. *Turkish Journal of Biochemistry*, 38(1), 101-108.

- Yasmin, I., Saeed, M., Pasha, I., Zia, M.A., (2019). Development of whey protein concentrate-pectin-alginate based delivery system to improve survival of *B. longum* BL-05 in simulated gastrointestinal conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11 (2), 413-426.
- Zahoor, F., Sooklim, C., Songdech, P., Duangpakdee, O., Soontorngun, N. (2021). Selection of potential yeast probiotics and a cell factory for xylitol or acid production from honeybee samples. *Metabolites*, 11, 312.
- Zamora-Vega, R., Montañez-Soto, J. L., Venegas-González, J., Bernardino-Nicanor, A., Cruz, L. G., & Martínez-Flores, H. E. (2013). Development and characterization of a symbiotic cheese added with *Saccharomyces boulardii* and inulin. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2828-2834.
- Zárate, G., Pèrez-Chaia, A., González, S., Oliver, G., (2000). Viability and β -Galactosidase Activity of Dairy Propionibacteria Subjected to Digestion by Artificial Gastric and Intestinal Fluids. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1214-1221.
- Zullo, B.A., Ciafardini, G. (2019). Evaluation of physiological properties of yeast strains isolated from olive oil and their in vitro probiotic trait. *Food Microbiology*, 78,179-187.



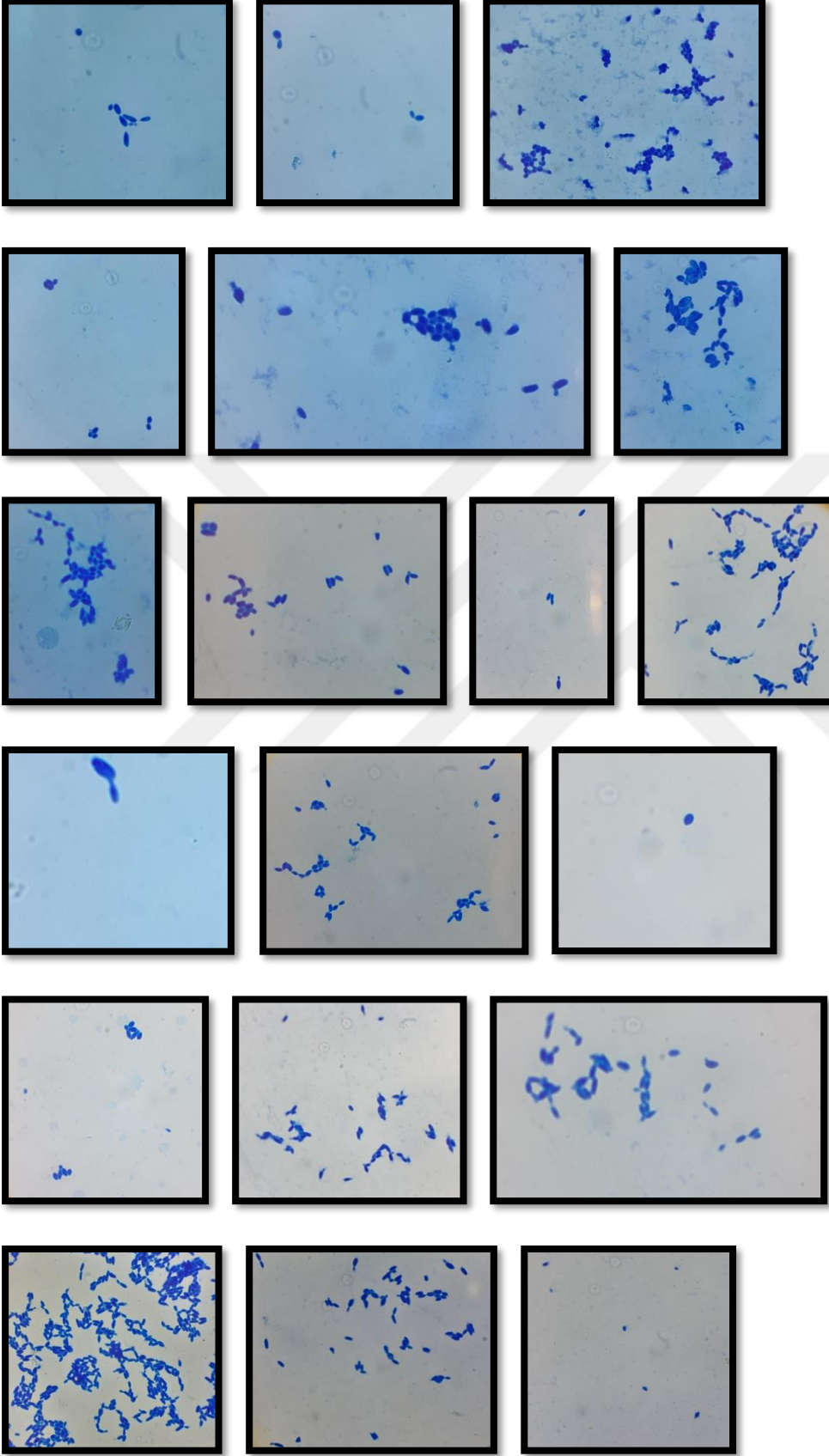
EKLER

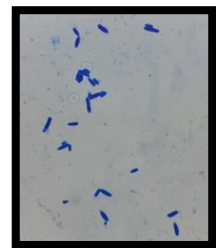
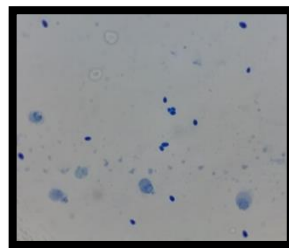
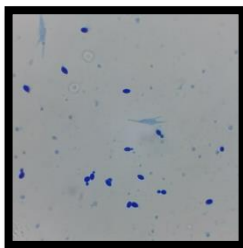
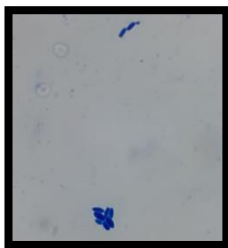
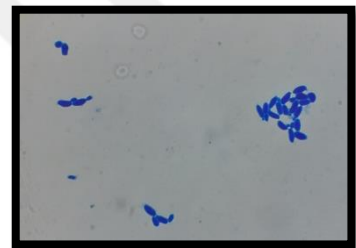
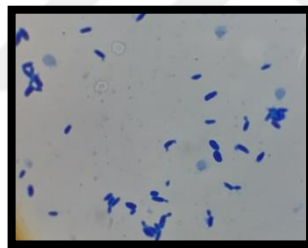
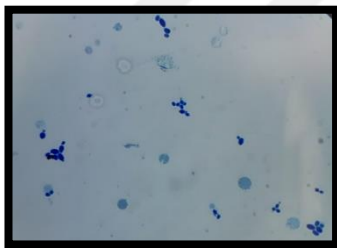
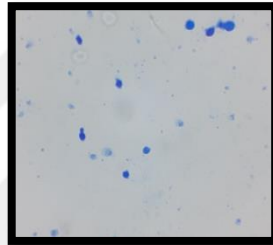
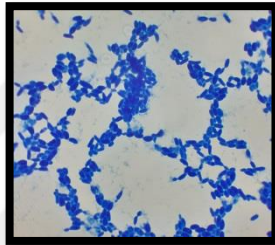
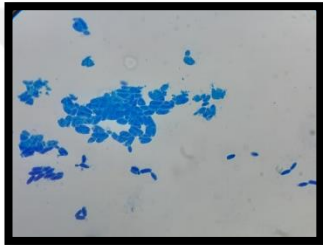
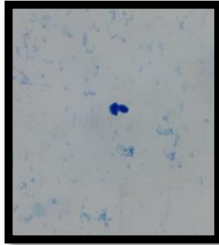
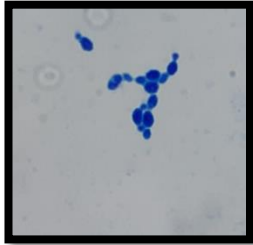
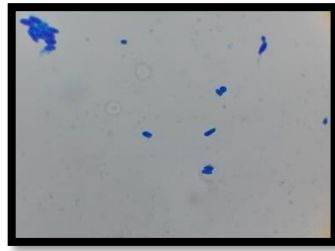
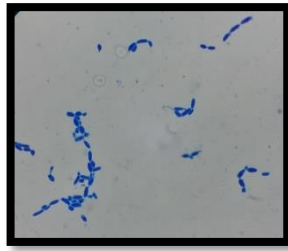
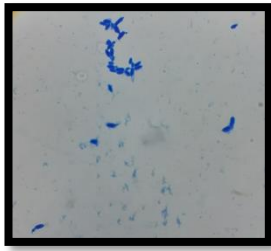
EK A Mayların mikroskop görüntüleri

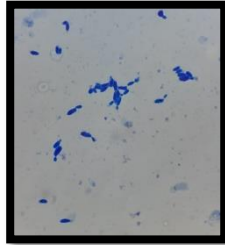
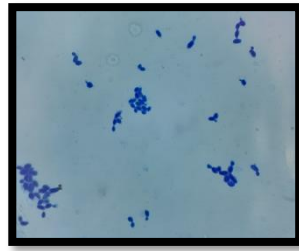
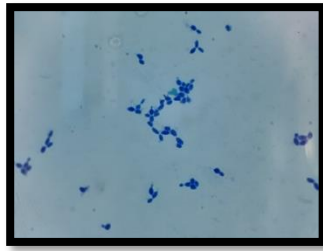
EK B Mayaların 18S-28S rRNA sekans dizimleri



EK A Mayaların mikroskop görüntüleri







EK B Mayaların 18S-28S rRNA sekans dizimleri

GATCAGGTTCAAGACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTGCGGCTTGGTTCGCC
TTTTGCGGAACATGTCTTTTCTCGTTGTAACTCTACTTCAACTTCTACAGT
TTTCTACACAACTTTTCTTCTTTGGGAAGATACGTCTTGTGCGTGCTTCCCA
GAGGTGACAAACACAAACAACTTTTTATTATTATAAACCAGTCAAAACCA
ATTCGTTATGAAATTAAAAATATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG
ATCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGC
AGAATTCCGTGAATCATCGAATCTAAGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTAT
TCCTGGGGGCGATGCCTGTTTGAGCGTCATTCCTTCTCAAACAATCATGTT
TGGTAGTGAGTGAACCTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATTGCTAGCCTGTTA
TTTGGTTGTGATTTTGCTGGCTTGGATGACTTTGTCCAGTCTAGCTAATACC
GAATTGTCGTATTAGGTTTTACCAACTTCGGCAGACTGTGTGTTGGCTCGG
GCGCTTTAAAGACTTT

Torulaspora delbrueckii

Accession number: NR_111257.1

Örnek numarası: 1

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC
ATTACAGAATCTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGCCTGCCAGAGATT
AAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTT
CTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGGTGTTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGA
AAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTTCCACTCATTGGTAC
AAACTCCAAAACCT

Candida parapsilosis

Accession number: NR_130673.1

Örnek numarası: 2

AGGGAAAAAACTCTAGATCTTAACCTTTCAATAACTTTATTAAAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGGGAATTG
CGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACA

TTGCGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATATTTACTC
TCAAACCTCCGGGTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAAAAT
AAGTTTTAGCCCCATTCTTCTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Metschnikowia pulcherrima

Accession number: NR_164379.1

Örnek numarası: 4

TTTCGTCGGGAACCTTGGGAAAGATCAATAATTTTGTTTACTGGAAATTT
TAAAAAGCGGAAAGAAAACAAAAACCCCTTAAATGTTGAATATTGCATA
AAGTTGGCAAGGAAAATTTTAGAAAAACAAACAAAACCTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATGCCTA
GTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTTTTGAACGCACATTGCG
CCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGC
GCGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACGTGTAAAGAGCGTCG
GAGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGGAATAAGGCCGAGCGAACTAGACT
ATTTTCAGGGACGCTTGCGGCGAGGAGTGAGTGCGCGCGCAACAAAAAG
CTCGACCTCAAATCAGTAGATCGGA

Pichia kudriavzevii

Accession number: NR_131315.1

Örnek numarası: 6

CTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTATACCAACACCACACTGTGTGGGCG
CACAAAACACCTAAACCTGGAGTATACACACGTCAACAAAAGATCTAAA
AGAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAG
CGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCG
AGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCGTCGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGT
CTGAGCGTCGTTTCCTTCTTGTTACCGCGGGGTCTTTCAGATCCTCTCT
GCGCAGAGCTGGCCGTGCCATTGGCCCGGCCGAAAAGAAACGATGCGGA
CGAAGCGAACTACATCGGGACGCTTTGGCCGCCGAGCGAAAAAA

Pichia membranifaciens

Accession number: NR_111195.1

Örnek numarası: 9

AGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGC
CGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTT
GCTATTCCAAACCGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAATTAA
AACCGTTTCAATACAAAACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTT
CTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAAT
TTTATTTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAA
ATTTTAAAATATTA AAAA A C T T T C A A C A C G G A T C T C T T G G T T C T C G C A T C
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCC
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGG
GGCATGCCTGTTTAAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTG
AGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTG

Saccharomyces cerevisiae

Accession number: NR_111007.1

Örnek numarası: 8

GTGTTTTTATTGAACAAATTTCTTTGGTGGCGGGAGCAATCCTACCGCCA
GAGGTTATAACTAAACCAAACCTTTTTATTTACAGTCAAACCTTGATTTATTA
TTACAATAGTCAAAACCTTTCAACAACGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCA
TGCTGTTTGAAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCCCGGGTTTGGTGTGAGC
AATACGCTAGGTTT

Candida tropicalis

Accession number: NR_111250.1

Örnek numarası: 30

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGATTATGAATGAATAGATT
ACTGGGGGAATCGTCTGAACAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCAGTTC
TTGATTCTCTGCTATCAGTTTTCTATTTCTCATCCTAAACACAATGGAGTTTT
TTCTCTATGAAC T A C T T C C C T G G A G A G C T C G T C T C C A G T G G A C A T A A A C
A C A A C A A T A T T T T G T A T T A T G A A A A A C T A T T A T A C T A T A A T A T T T A A T A T T C A
A A C T T T C A A C A C G G A T C T C T T G G T T C T C G C A T C G A T G A A G A A C G C

Kluyveromyces marxianus

Accession number: NR_111251.1

Örnek numarası: 44

AGGGCATGCCTTAGTACGGCGAGTGAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
CTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGC
CGTTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCC
CGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAAT
ATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAA
GAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG
GGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGG
GAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCC
ATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCC
AGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTT
ATATGCCGCCCCGTCTTGAACCCACGGAGAACACAAAA

Örnek numarası 85

S. boulardii

5. ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Eda KILIÇ KANAK

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2014, Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
- **Yükseklisans** : 2017, Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM

- 2016 yılında Sakarya Üniversitesi'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Hâlen aynı kurumda çalışmaya devam etmektedir.
- 2022–2023 yılları arasında Tübitak 1002 Hızlı Destek Projesi kapsamında 123O288 numaralı Yeni İzole Edilen Probiyotik Özellikli *Saccharomyces boulardii*'nin Mikroenkapsülasyonu ve Sükroz İçermeyen Prebiyotik Çikolatada Kullanımı isimli projede yürütücü olarak görev almıştır.
- 2019 yılında Erasmus personel hareketliliği kapsamında Council for Agricultural Research and Economics (CREA) Araştırma Merkezinde (İtalya)'nde gözlemci araştırmacı olarak bulunmuştur.
- 2022 yılında 2022-7-24-157 nolu ve Çerezlik kabak (*Cucurbita Pepo.*), manda sütü ve probiyotik maya kullanılarak üretilen labnenin mikrobiyolojik, duyu ve tekstürel özelliklerinin araştırılması isimli Sakarya Üniversitesi Lisansüstü Tez Projesi (LÜTEP) projesinde araştırmacı olarak görev almıştır.
- 2021 yılında 2021-9-33-75 nolu ve Geleneksel peynirlerden izole edilen enterokok suşlarının probiyotik özelliklerinin incelenmesi isimli Sakarya Üniversitesi Genel Araştırma Projesi-B (GAP-B) projesinde araştırmacı olarak görev almıştır.
- 2020 yılında 2020-7-24-33 nolu ve Geleneksel yöntemlerle üretilmiş zeytin ve zeytin ürünlerinden izole edilen mayaların probiyotik aktivitelerinin incelenmesi isimli Sakarya Üniversitesi Yüksek Lisans Tez Projesinde araştırmacı olarak görev almıştır.
- 2019 yılında 2019-7-25-290 nolu ve Farklı gıdalardan izole edilen mayaların probiyotik özelliklerinin değerlendirilmesi ve fonksiyonel gıda geliştirilmesi isimli Sakarya Üniversitesi Lisansüstü Tez Projesi (LÜTEP)-Doktora projesinde araştırmacı olarak görev almıştır.

- 2017 yılında 2017-50-01-006-2017 nolu ve Geleneksel olarak üretilen bazı köy peynirlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve antimikrobiyel etkilerinin araştırılması. İsimli Sakarya Üniversitesi Yüksek Lisans Tez Projesinde araştırmacı olarak görev almıştır.
- 2016 yılında 2016-01-16-019-2017 nolu ve Sakarya yöresinde geleneksel olarak üretilen peynirlerden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi isimli Sakarya Üniversitesi Hızlı Destek Projesinde araştırmacı olarak görev almıştır.

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

DİĞER ESERLER:

1. Kanak, E. K., Yılmaz, S. Ö. (2023). Investigation of some probiotic properties of Lactobacillaceae strains isolated from traditional Tulum cheese in Turkey. *Mljekarstvo*, 73 (4) 238-249.
2. Kanak, E. K., Yılmaz, S. Ö., Altındış, M., Tanriverdi, E. S., & Otlı, B. (2023). Determination of safety status and probiotic properties of Enterococcus strains isolated from traditional cheeses in Turkey. *Journal of Applied Microbiology*, 134(1), Ixac005.
3. Kanak, E. K., Yılmaz, S. Ö. (2021). Identification, antibacterial and antifungal effects, antibiotic resistance of some lactic acid bacteria. *Food Science and Technology*, 41(Suppl.1), 174-182.
4. Kanak, E. K., Yılmaz, S. Ö. (2019). Maldi-tof mass spectrometry for the identification and detection of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from local cheeses. *Food Science and Technology*, 39 (Suppl. 2), 462-469.
5. Kılıç Kanak, E., Vatandaş, N., Bayram, Ş., Dirikolu, H., Seçkin, H.B., & Öztürk Yılmaz, S. (2022). Gıda Güvenliği Açısından Covid-19 Etkeni Sars-Cov-2 ve Korunma Yöntemleri Hakkında Tüketici Bilinci. *Akademik Ziraat Dergisi*, 11(2), 373-382.
6. Kanak, E. K. , Öztürk Yılmaz, S. , Özacar, Z. Z. , Uflas, B. , Bilek, M. & Yılmaz, B. (2022). Gıda Mühendisliği ve Kimya Bölümü Öğrencilerinin Probiyotik Gıda Konusunda Bilinç Düzeylerinin Değerlendirilmesi. *Akademik Gıda*, 20 (1) , 71-79. DOI: 10.24323/akademik-gida.1097854.

7. Kanak, E. K., Öztürk, S. N., Özdemir, Y., Kübra, A. S. A. N., Yılmaz, S. Ö. (2021). Gıda takviyeleri kullanım alışkanlıklarının değerlendirilmesi. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10(1), 168-177.
8. Kanak, E. K., Yılmaz, S. Ö. (2018). Sakarya’da geleneksel olarak üretilen bazı yöresel peynirlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin MALDI-TOF MS Yöntemi ile tanımlanması ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. *Sakarya University Journal of Science*, 22(3), 1055-1062.
9. Keskin, P., Kılıç Kanak, E. ve Öztürk Yılmaz, S. (2023). Zeytin ve Zeytinyağında Bulunan Mayalar, Faydaları, Probiyotik Aktiviteleri ve Etki Mekanizmaları. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2683-2691.
10. Kıyak, E., Kılıç Kanak, E. ve Öztürk Yılmaz, S. (2022). Kabak Türlerinin (*Cucurbita maxima*, *C. moschata*, *C. pepo*) Probiyotik Yoğurt Çeşitlerinde Prebiyotik Amaçlı Kullanımı. *Bursa Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 36(2), 433-446. <https://doi.org/10.20479/bursauludagziraat.987819>.
11. Başkan, S., Kılıç Kanak, E., Öztürk Yılmaz, S. (2022). Borun antimikrobiyel etkileri ve gıdalarda koruyucu olarak kullanım olanaklarının değerlendirilmesi. *GIDA* 47(3), 399-407. doi: 10.15237/gida.
12. Kanak, E. K. ve Yılmaz, S. Ö. (2019). Probiotic Yeasts and the Role of Yeasts in Probiotic Foods. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(9), 1268-1274.
13. Özyılmaz B., Öztürk Yılmaz S., Kılıç Kanak E. (2021). Investigation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Different Kinds of Sunflower Seeds. *III. International Conference on Agricultural, Biological and Life Science*. 1-3 September, Edirne, Turkey.
14. Kılıç Kanak, E., Öztürk Yılmaz S., Mumcuoğlu İ. (2018). Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from traditionally produced local cheese. *3rd International Congress on Food Technology*. 10-12 October, Nevşehir, Turkey.
15. Kılıç Kanak E., Öztürk Yılmaz S., Aygün N., Uzun Ç. (2021). The Effect of The Use of Lemon Oil on The Microbiological and Sensory Properties of Raw Meatballs. *II. International Congress of the Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 25-29 October, Gazimağusa, Cyprus.

16. Kılıç Kanak E., Öztürk Yılmaz S., Yavuz M. (2021). Investigation of Antimicrobial Effects of Some Extracts. *II. International Congress of the Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 25-29 October, Gazimağusa, Cyprus.
17. Öztürk Yılmaz S., Kılıç Kanak E., Uzun Ç., Aygün N. (2018). The microbiological quality of çiğ köfte sold in Sakarya. *The 4th International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus"*. 19-21 April, Girne, KKTC.
18. Öztürk Yılmaz S., Kılıç Kanak E., İnel A., Duman Z. (2018). Investigation of antimicrobial effects of some aromas on bacteria and yeast. *The 4th International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus"*. 19-21 April, Girne, KKTC.
19. Öztürk Yılmaz S., Kılıç Kanak E., Dursun S., Budak Ş. (2018). Lactic acid bacteria isolation from traditional fermented boza and antimicrobial properties of lactic acid bacteria. *The 4th International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus"*. 19-21 April, Girne, KKTC.
20. Haskaraca G., Kılıç Kanak E., Demirok Soncu E., Kolsarıcı N. (2018). A traditional turkish meat product: Inegöl meatball and changes in quality characteristics during cold storage. *The 4th International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus"*. 19-21 April, Girne, KKTC.
21. Öztürk Yılmaz S., Kılıç Kanak E., Çekiç A., Şanlı F. (2018). Antimicrobial properties of aromas. *3rd International Congress on Food Technology*. 10-12 October, Nevşehir, Turkey.
22. Öztürk Yılmaz S., Kılıç Kanak E., Bal Ş., Şen M., Yazıcı Y., Polat G., Yavaş G. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of sumac and oleuropein. *3rd International Congress on Food Technology*. 10-12 October, Nevşehir, Turkey.
23. Demirok Soncu E., Haskaraca G., Kılıç E., Küçük B., Şahin SS., Yılmaz HS., Kolsarıcı N. (2015). Green Tea Extract as a Natural Antioxidant to Retard Lipid Oxidation in Inegöl Meatball During Refrigerated Storage. *The 3rd International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus"*. 01-04 October, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, p 437.
24. Yılmaz S. Ö., Ulaş A., Dönmez Ş., Adıyaman M., Gür A., Efendioğlu E., Çimen B., Kılıç E. (2016). Sakarya'da piyasaya sunulan sade yoğurtlarda

depolama süresince bazı mikroorganizmaların sayılarının ve pH değişimlerinin belirlenmesi. *12. Gıda Kongresi*. 05-07 Ekim. Page:358.

25. Yılmaz S. Ö., Uyanık E., Kılıç E. (2016). Zakkum bitkisinin kök ve yapraklarından el de edilen ekstraktların ve limon suyunun gıda orjinli bakterilerden *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhimurium* üzerine antimikrobiyel etkisinin incelenmesi. *12. Gıda Kongresi*. 05-07 Ekim 2016. p 359.

