

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROBİYOTİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK BİTKİSEL
SÜT İKAMELERİNDEN FERMENTE İÇECEK TASARIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra DEMİRCAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek HEPERKAN

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROBİYOTİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK BİTKİSEL
SÜT İKAMELERİNDEN FERMENTE İÇECEK TASARIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Büşra DEMİRCAN
(506151509)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek HEPERKAN

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506151509 numaralı Yüksek Lisans / Doktora Öğrencisi **Büşra DEMİRCAN**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**PROBİYOTİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK BİTKİSEL SÜT İKAMELERİNDEN FERMENTE İÇECEK TASARIMI**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : ~~Prof. Dr. Dilek Heperkan~~
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Doç. Dr. Filiz Altay**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Meral Birbir
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : 6 Eylül 2017
Savunma Tarihi : 15 Eylül 2017





Çok kıymetli aileme,



ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, tecrübelerini ve anlayışını esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Dilek Heperkan başta olmak üzere, İTÜ Gıda Mühendisliği bölümündeki bütün hocalarıma mesleki hayatımda katkıda buldukları için teşekkür ederim.

İtalya, Bologna Üniversitesi'ndeki çalışmalarına fırsat tanıyan, yardımlarını, tecrübelerini ve imkânlarını benimle paylaşan Prof. Dr. Andrea Gianotti başta olmak üzere, Prof. Elena Babini ve PhD. Lorenzo Nissen'e anlayışları ve değerli bilimsel paylaşımları çok teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca en güzel vakitleri birlikte geçirdiğim kıymetli arkadaşlarım Efkan Ok ve Merve Ece Arabacı'ya her zaman yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Son olarak, sonsuz sevgi ve destekleri için en özel teşekkürü canım aileme bir borç bilirim.

Eylül, 2017

Büşra Demircan
(Gıda Mühendisi)

FOREWORD

Thanks to all my lecturers in ITU Food Engineering Department, particularly my dear lecturer Prof. Dr. Dilek Heperkan who never spares her experiences, support and understanding during my university education.

Very special thanks to my advisors and lecturers Prof. Dr. Elena Babini and PhD. Lorenzo Nissen who share their understanding and scientific knowledge with me. Particularly Prof. Dr. Andrea Gianotti who gives an opportunity to do my studies in Bologna University, Italy and shares his experiences and opportunities with me. I owe to them and this preface is not sufficient my feelings.

Thanks to my dear friends Merve Ece Arabacı and Efkan Ok whom I spent with all my best times during my education period.

Finally, I owe to my family and very special thanks to them for their support and love.

September, 2017

Büşra Demircan
(Food Engineer)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Bitkisel Kaynaklı Süt İkameleri	3
2.2 Laktik Asit Bakterileri.....	7
2.3 Probiyotik Mikroorganizmalar	9
2.3.1 <i>Lactobacillus</i> cinsi bakteriler.....	11
2.3.2 <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakteriler	12
2.4 Fermantasyon	13
2.5 Bitkisel Kaynaklı Fermente Ürünlerin Fonksiyonel Özellikleri	15
2.6 Diyet Lifleri.....	18
2.7 Prebiyotikler	19
2.8 Aromatik Bileşenler	21
2.9 Protein ve Biyoaktif Peptitler	22
2.10 Antioksidan Aktivite	23
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1 Bitkisel Kaynaklı Süt İkameleri: Soya ve Pirinç Sütü	25
3.2 Probiyotik Laktik Asit Bakterisi İzolatları.....	25
3.3 Örneklerin Hazırlanması ve Fermantasyon.....	26
3.4 Mikrobiyal Ölçümler.....	27
3.4.1 Optik Yoğunluk	27
3.4.2 Yüzeye yayma plak yöntemi ile sayım.....	27
3.5 pH ölçümleri.....	28
3.6 Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	28
3.7 Antioksidan Aktivite	29
3.8 İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1 Birinci (Tarama) Kısım Bulguları	31
4.1.1 LAB türlerinin soya sütü ve pirinç sütü içerisindeki zamana bağlı pH etkileri	31
4.1.2 LAB türlerinin soya sütü ve pirinç sütü içerisindeki zamana bağlı gelişimleri	34

4.1.3 LAB türlerinin soya sütünün ve pirinç sütünün protein/peptit profillerine etkisi.....	36
4.1.4 Deneyin ikinci kısmında kullanılacak LAB türlerinin belirlenmesi.....	38
4.2 Deneyin İkinci Kısım Bulguları	39
4.2.1 LAB türlerinin bitkisel süt karışımları içerisindeki tekli ve kokteyl inokulasyonlarının mikrobiyal gelişimleri ve pH değerlerine etkisi.....	39
4.2.2 Bitkisel süt karışımlarının fermantasyondan önceki ve sonraki protein/peptit profilleri.....	43
4.2.5 Süt karışımlarının fermantasyondan önce ve sonra antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.....	49
5. SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR.....	55
EKLER.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	73



KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
LAB	: Laktik asit bakterisi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
APS	: Amonyum per sülfat
OD	: Optik yoğunluk
St	: Standart
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
FOS	: Fruktooligosakkarit
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
Lb.	: Lactobacillus
B.	: Bifidobacterium
EMP	: Embden Meyernhof Parnas
GOS	: Galaktooligosakkaritler
Sis	: Sistein
MRS	: De Man Ragosa Sharpe besi yeri



SEMBOLLER

μ	: Mikro
Abs	: Absorbans
v	: Hacim
w	: Ağırlık
L	: Litre
eq	: Eş değer
ppm	: Parts per million
RPM	: Revolutions per minute
kob	: Koloni oluşturan birim



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Literatürde bulunan fıstık ve tahıl fermente ürünlerinin özellikleri.....	5
Çizelge 2.2: Dünya çapında popüler olan tahıl ve diğer bitkisel kaynaklı fermente içeceklerin substrat ve mikroflorası.....	7
Çizelge 2.3 : Probiyotik mikroorganizmalar.	10
Çizelge 2.4 : Uçucu madde oluşumunu destekleyen reaksiyonlar.	21
Çizelge 3.1 : Kullanılan soya ve pirinç sütünün etiket bilgileri	25
Çizelge 3.2 : Deneyin tarama kısmında kullanılan probiyotik LAB türleri	26
Çizelge 3.3 : Deneyin ikinci kısmında kullanılacak olan süt karışımları oranı	27
Çizelge 3.4 : SDS jellerinin formülasyonu.	28
Çizelge 4.1 : Deneyin ikinci kısmında kullanılacak olan inokülümler.....	39
Çizelge 4.2 : Süt karışımlarının fermantasyondan sonraki antioksidan aktiviteleri ..	52



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Fermantasyon süresince ham maddede gözlemlenen değişiklikler.....	14
Şekil 4.1 : LAB türlerinin soya sütü fermantasyonu sonucundaki 6. saat pH değerlerine etkisi	33
Şekil 4.2 : LAB türlerinin soya sütü fermantasyonu sonucundaki 24. saat pH değerlerine etkisi	33
Şekil 4.3 : LAB türlerinin pirinç sütü fermantasyonu sonucundaki 6. saat pH değerlerine etkisi	33
Şekil 4.4 : LAB türlerinin pirinç sütü fermantasyonu sonucundaki 24. saat pH değerlerine etkisi.	34
Şekil 4.5 : LAB türlerinin soya sütü fermantasyonundaki 0, 6 ve 24. saatteki mikrobiyal gelişmeleri.	36
Şekil 4.6 : LAB türlerinin pirinç sütü fermantasyonundaki 0, 6 ve 24. saatteki mikrobiyal gelişmeleri.	36
Şekil 4.7 : LAB türlerinin fermantasyonun soya sütünün SDS-jel protein/peptit profiline etkisi	37
Şekil 4.8 : LAB türlerinin fermantasyonun pirinç sütünün SDS-jel protein/peptit profiline etkisi.	38
Şekil 4.9 : Bitkisel süt karışımlarının fermantasyonunun 6. ve 24. saatlerindeki pH değerleri	40
Şekil 4.10 : Bitkisel süt karışımlarının mikrobiyal gelişmeye etkisi	42
Şekil 4.11 : SR25 bitkisel süt karışımının fermantasyondan önceki ve sonraki protein/peptit profili	48
Şekil 4.12 : SR50 bitkisel süt karışımının fermantasyondan önceki ve sonraki protein/peptit profili	48
Şekil 4.13 : SR75 bitkisel süt karışımının fermantasyondan önceki ve sonraki protein/peptit profili	48
Şekil 4.14 : Bitkisel süt karışımlarının kokteyl inokülasyonlarla fermantasyondan önce ve sonraki protein/peptit profilleri.	49



PROBİYOTİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK BİTKİSEL SÜT İKAMELERİNDEN FERMENTE İÇECEK TASARIMI

ÖZET

Geleneksel işlenmiş ve doğal gıdaya artan taleple birlikte gıda endüstrisi araştırma ve geliştirmeye ayrılan bütçeyi arttırıp inovatif gıda üretimi denemeleri yapmaya başlayarak toplumun sürdürülebilirlik ve doğallık gerekliliklerini yerine getirmeye çalışmaktadır. Süt ve et ürünlerindeki geniş fermente ürün pazarına rağmen bitkisel kaynaklı fermente ürünlere olan talep artmakta sebebi ise şöyle sıralanmaktadır; laktoz ve kolesterol ihtiva etmeyen, diyet lifi, mineral, vitamin ve antioksidan gibi besinsel değerler açısından zengin gıdalardır. Tüm bu sebepler ve sonuçlar toplandığında, arz ve talebin bitkisel kaynaklı fermente gıdalar için artmakta olduğu görülmekte ve bunun sebeplerinin ise geleneksel ve güvenilir tarihinin olması, fonksiyonel son ürün oluşturması ve sağlık üzerinde pozitif etkisi etkisinin bulunmasıdır. Fermente gıdaların potansiyel sağlık etkileri ve avantajları ise şu şekildedir; antihipertansif etkinlik, kan şekerinin düşürülmesi, antidiyareik ve antitrombotik özelliklerdir, fermente gıdaların içeriğinin kapsamlı bir değerlendirmesi ve sağlık yararlarının sebeplerinin araştırılması sonucunda, fermantasyonun vitamin, mineral, aminoasit, yağ asitleri ve fitokimyasal değerlerini arttırdığı ve/veya gıdada mevcut bulunan bu içeriklerin transformasyona neden olduğu, bu yüzden sağlık etkisinin gıdanın fermente olmamış formuyla kıyaslandığında arttığı anlaşılmıştır. Gıda ürünlerine probiyotik takviye yapılması, ya da gıda ürünlerinin probiyotik mikroorganizmalar ile fermente edilmesi bağırsak mikroflorasını düzenlemekte bunun yanı sıra da sağlık üzerinde pozitif pek çok etkisinin olması bilimsel camia tarafından yoğun olarak araştırılan konulardan birisidir. Son zamanlarda, süt ya da et ihtiva etmeyen ürünlerin özellikle tahıl ve baklagillerin maya ve bakteri fermantasyonu inovatif ve fonksiyonel gıda araştırmaları ve üretiminde önemli bir yer tutmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, bitkisel kaynaklı süt ikamesi olarak kullanılacak soya sütü, pirinç sütü, soya-pirinç sütlerinin karışımlarının probiyotik laktik asit bakterileriyle (LAB) olan fermantasyonu sonucunda; oluşturulan ürünlerin mikrobiyolojik, metabolik özelliklerini incelemek ve gerek akademik çalışmalar, gerekse içecek sektörü için yeni probiyotik fermente bitkisel içecek üretiminde önemli olabilecek bilgiler sunmaktır. Bu bağlamda kullanılacak 12 *Lactobacillus* ve 2 *Bifidobacterium* probiyotik suşlarının, fermente bitkisel süt ürünlerinde fizyokimyasal ve metabolik davranışları incelenmiştir. Yapılan çalışma 2 kısıma ayrılmıştır, çalışmanın birinci "tarama" kısmında 12 *Lactobacillus* probiyotik suşunun soya ve pirinç sütündeki 0, 6, ve 24. saatteki mikrobiyal gelişmeleri ve pH değişimleri incelenmiştir. 12 *Lactobacillus* suşu arasından fermantasyon aktivitesine göre karar verilen 2 probiyotik *Lactobacillus* suşu çalışmanın ikinci kısmında kullanılmıştır. Ayrıca, çalışmanın tarama kısmında 12 *Lactobacillus* ve 2 *Bifidobacterium* suşları ile 24 saat fermentasyonda bırakılan bitkisel sütlerin ve fermantasyondan önceki halleri (sıfırıncı saat) için protein/peptit profilleri incelenmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında ise, soya ve pirinç sütleri 25% ,50%, 75 % (v/v) oranlarında karıştırılmış ve 3 farklı içecek tasarımı yapılmıştır, tarama kısmından karar verilen 2 *Lactobacillus* ve 2 *Bifidobacterium* çeşidi LAB bakterileri ile tekli veya kokteyl olarak tasarlanan içecekler fermente edilmiş, 6. ve 24. saat pH değerleri ve bu saatlerdeki mikrobiyal gelişmeleri belirlenmiştir, ayrıca 24 saatlik inkübasyon sonucu antioksidan ve protein/peptit profilleri de incelenmiştir.

Deneyin ilk kısmında; soya sütü ve pirinç sütünün 24 saatlik fermantasyonu sonucunda *Lb. rhamnosus* C243, *Lb. helveticus* CNBL, *B. bifidum* 700795, *B. longum* 12 türlerinin 6. ve 24. saatteki pH düşürme ve mikrobiyal gelişmelerine bakılarak en iyi fermantasyon yeteneği göstermiş olan suşlar olarak belirlenmiştir. Deneyin ikinci kısmında ise kullanımına karar verilen laktik asit bakterisi probiyotik suşları, hem tekli inoküle edilmiş hem de 2 tane kokteyl hazırlanarak inoküle edilmiştir. Kokteyl 1: *Lb. rhamnosus* C243+ *Lb. helveticus* CNBL+ *B. bifidum* 700795 ve kokteyl 2: *Lb. rhamnosus* C243, *Lb. helveticus* CNBL+ *B. longum* 12' dan oluşmaktadır. Bütün bitkisel süt karışımlarında inokülasyon 24 saatlik fermantasyon sonucunda 9,46-10,28 log kob/ml mikrobiyal gelişme gösterip pH değerleri ise 3,71-4,39 arasında değişmiştir. Ayrıca, 6. saatte, aynı orandaki süt karışımları içerisindeki tüm inokülasyonların pH değerleri istatistiksel olarak $p < 0,05$ 'den farklı bulunurken, mikrobiyal büyüme en az 9 log kob/ml olarak gözlemlenmiştir. Genel olarak, süt karışımlarındaki soya oranı arttıkça her bir inokülasyon için mikrobiyal gelişme ve pH da artış gözlemlenmektedir. Süt karışımlarının protein/peptid profilleri SDS-Jel elektroforezi ile incelenmiş olup, 24 saat fermente edilmiş süt karışımları ile fermente edilmemiş kontrol süt karışımlarının protein/peptid profilinin neredeyse tamamen değiştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, fermente edilmiş süt karışımlarının neredeyse tamamında molekül ağırlığı 37 kDa'dan büyük proteinlere rastlanmazken, fermente örneklerde molekül ağırlığı 25 kDa' dan küçük peptid miktarı artmıştır ve en yüksek artış 75%soya sütü+ 25% pirinç sütü içeren karışımın *Lb. rhamnosus* C243 ile fermantasyonu sonucunda gözlemlenmiştir. Antioksidan aktivite ABTS+ metodu ile incelenmiş olup, μg Askorbik Asit eq/ml olarak ifade edilmiştir. Fermente edilmemiş süt karışımlarında antioksidan aktivite gözlemlenmezken, fermente edilmiş süt karışımlarının tamamı antioksidan aktiviteye sahiptir ve 37,46-50,39 μg AA eq/ml arasında değişmektedir. En yüksek antioksidan aktivite gösteren örnek ise yine 75%soya sütü+ 25% pirinç sütlerini içeren karışımın *Lb. rhamnosus* C243 ile fermantasyonu sonucunda gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, deneyin birinci kısmında kullanımına karar verilen 14 farklı probiyotik LAB suşları, soya sütü ve pirinç sütü içerisindeki 24 saatlik fermantasyonları sonucunda pH düşürme aktivitesi ve mikrobiyal gelişme göstermiş, deneyin ikinci kısmı için seçilen 2 *Lactobacillus* ve 2 *Bifidobacterium* suşları yine soya-pirinç süt karışımları içerisinde tekli veya kokteyl olarak gelişme göstermiştir. Ayrıca laktik asit bakterileriyle yapılan 24 saatlik fermantasyon sonucunda antioksidan aktivitenin, düşük molekül ağırlıklı peptid bileşenlerinin arttığı gözlemlenmiştir. Fonksiyonel gıdalardan sağlık yararları elde edebilmek için, uygulanabilir probiyotik suşların muhafaza edilmesi ve büyümesinin desteklenmesi beklenmektedir, ayrıca ürünlerin son kullanma tarihlerinde minimum 6 log kob/ ml düzeyinde (veya g-1) probiyotik suş içermeleri gerekmektedir ve deneyde kullanılan probiyotik suşların tamamı 24 saatlik fermantasyon sonunda en az 9 log kob/ml gelişme göstermiş olup, probiyotik içecek olma gerekliliğini yerine getirmiştir. Bu bağlamda, bu çalışmanın sonuçları probiyotik kültürlerinin starter kültür olarak kullanımıyla elde edilecek fermente bitkisel içeceklerin tasarımı için değerli bilgiler sağlayabilir.

PRODUCTION OF NOVEL VEGETAL BASED BEVERAGES FERMENTED BY PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA

SUMMARY

Fermented foods and beverages are generally defined as processing of raw product through controlled microbial growth and enzymatic conversions of major and minor food component to develop new product as different in terms of nutritional value, texture, and color from raw material. There is substantial evidence of improvements in nutritional status and value arising from controlled fermentations. Further, there are some of the potential health benefits of fermented foods and beverages that have been explored.

Fermentation of food and beverages with lactic acid bacteria have become important due to the some benefits on products; antimicrobial substances, sugar polymers, aromatic compounds, useful enzymes and probiotic properties of lactic acid bacteria lead to increase application in industry, these properties can be summarized as increasing functional properties of products with health effects, increasing organoleptic and nutritional properties, and increasing the shelf life of food with decrease usage of preservatives. Consideration of functional properties of fermented food and beverage with lactic acid bacteria, how they may provide health benefits, has led to the targeted identification of certain vitamins, minerals, amino acids, and phytochemicals like phenolics, fatty acids, and peptides that distinguish fermented foods from their nonfermented forms. Nowadays, in accordance with increasing demand for traditional processed and natural products, food and beverage industry have started to try innovative products which meet sustainability and naturalness requirements of population. Besides huge dairy and meat fermented product markets, vegetal based fermented products are demanded because of many reasons like lactose free, cholesterol free, rich in some nutritional components. As results of these, supply and demands most particularly increase for vegetal based fermented products because of wontedly consumption, functional, health promoting aspects. There are lots of vegetal based substrates as mainly fruit juices, vegetables and cereals that have been started to use as substitute in industry or searched in academia as alternative to conventional dairy substrates for the design of fermented and/or probiotic beverages. Currently, most of the studies have been conducted related with non-dairy fermented and/or probiotic milks on fruits, cereals and soy based products where colour and rheological evaluations, sensory analysis performed. Most of these vegetal based fermented innovative products are found in literature that were developed by using *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* genera. Also, innovative fermented products could have some added values if starter microorganisms are probiotics, based on health benefits that probiotics exhibit.

Soy has whole proteins, dietary fiber, low cholesterol, lactose free, and high levels of bioactive phenolic compounds. Isoflavones, classified as flavonoids and phytoestrogens, are characteristic phenolic components of soybean. During fermentation of soy products, complex organic compounds are broken down into smaller molecules by lactic acid bacteria, which exert various physiological functions beyond their nutritional properties such as improves the biofunctional properties due to the increase in free isoflavones and peptides that are inactive within the sequence of the parent structure. Soy milk has an unpleasant flavor according to majority of western people, this specific flavor is described as stale or beany which are due to some volatile compounds produced by the self-oxidation of polyunsaturated fatty acids or from the enzymatic action of lipoxygenase. From a nutritional point of view soy milk is a precious product should be improved as sensorial and fermentable aspects.

The aim of this study is the characterization of microbiological and functional properties of soy and rice plant based milks prior and after fermentation with different *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* strains, which have probiotic activity to provide important information to the literature and beverage industry for the production of novel plant based probiotic fermented beverages. On this purpose, fermentation was conducted inoculating the lactic acid bacteria strains at 1% v/v and a concentration of 0,9 unit of OD 600. The fermentation was prolonged for 24 hours at 37°C in microaerobic condition and the physicochemical parameters were determined according to the official methods, microbial growth and pH values were assayed and monitored through all the period of fermentation. Fermented milk samples were investigated as; Protein/peptide profiles were observed by means of SDS-PAGE, antioxidant activities were determined with ABTS+ method and compared with unfermented milk samples.

In this order, the experimental procedure was splitted in two parts. In the first, soy milk and rice milk were used separately to be fermented with a set of different bacterial species, including twelve different strains of *Lactobacilli spp.* and two strains of *Bifidobacterium spp.* Among these all, the bacterial strains that performed the best outputs of fermentation were selected to conduct the second part of the experimental procedure, employing soy and rice milks in different mixes, namely mix 1 (25% of soy and 75% of rice); mix 2 (50% of both milks) and mix 3 (75% of soy and 25% of rice). The best bacterial strain were selected on the basis of pH, growth, antioxidant and proteolytic activity.

The results obtained from the first part of the experiment showed that the strains *Lb. rhamnosus C243*, *Lb. helveticus CNBL*, *B. bifidum 700795*, *B. longum 12* were the best promising strains, according to pH decrease and quantification of relative colony forming units (cfu) in both soy and rice milk after six and 24 hours.

On the second part, the three milk mixtures were prepared so: (1) 25% soy milk+ 75% rice milk, (2) 50% soy milk+ 50% rice milk, (3) 75% soy milk+ 25% rice milk. Along with individual inocula of *Lb. rhamnosus C243* and *Lb. helveticus CNBL* strains, additionally two cocktail were prepared as follow: cocktail 1, composed by *Lb. rhamnosus C243*+ *Lb. helveticus CNBL*+ *B. bifidum 700795* and cocktail 2, composed by *Lb. rhamnosus C243*, *Lb. helveticus CNBL*+ *B.longum 12*. All bacterial strains in all milk mixtures showed that at the late time point of fermentation (24 hours) quantification of their relative cfu ranged between 9,46-10,28 log cfu/ml and pH measured between 3.71 and 4.39.

Further, pH values after 6 hours of fermentation were for all inocula in same ratio milk samples were found statistically different from each other $p < 0,05$, while microbial growth up to 8 log cfu/ml for each. Generally, when soy milk ratio increase in milk mixtures pH and microbial growing also increase for each inocula.

Protein/peptide profiles of fermented and not fermented milk mixtures obtained with SDS-Gel electrophoresis showed that after 24 hours of fermentation, the profile of milks mixtures at the beginning of the experiment, thus still not fermented, completely changed in comparison to those attained after 24 hours of fermentation.

Further, proteins with a molecular weight higher than 37 kDa were not detected for fermented milk mixtures, while peptides of molecular weight lower than 25 kDa increased. The results of SDS gel electrophoresis showed that the highest increment of peptides of molecular weight lower than 25 kDa was observed in mix 3 (75% soy and 25% rice) inoculated with *Lb. rhamnosus* C243. ABTS+ method was used to determine the antioxidant activity (expressed as μg ascorbic acid eq/ml) of samples of the second part of experiment after 24 hours of fermentation. ABTS+ results showed that the milk mixtures have antioxidant activity ranging between 37 and 50 μg AA eq/ml, and that the highest antioxidant activity was detected in mix 3 fermented with *Lb. rhamnosus* C243.

Overall, all the lactic acid bacteria strains used for this experiment showed the ability to grow in soy milk, rice milk and soy-rice milk mixtures with pH decreasing ability already after 6 hours of fermentation at 37°C. Moreover, fermentation with the strains tested increased antioxidant activity of soy and rice milks and their mixes, incremented low molecular weight peptides with richness and abundance.

In this regard, the results of this study could provide valuable insights in order to design novel probiotic fermented beverages with exploited functional properties. Further studies should evaluate shelf life of fermented probiotic beverage, viability of probiotic cultures in-situ and in-vivo conditions. Additionally, product flavor profile should be improved and sensorial consumer studies carried out in order to assess current products' acceptance by target consumers.



1. GİRİŞ

Geçtiğimiz son çeyrek yüz yılda, pek çok faktör küresel toplumun beslenme alışkanlığını önemli derecede değiştirdi, eğer bu faktörler geniş bir başlık altında toplanmaya çalışılırsa en önemli sebepler şu şekilde sıralanabilir; teknolojinin gelişmesi, hayat standartlarının değişmesi, yoğun çalışma saatleri, sınırlı fiziksel egzersizler ve ‘fast-food’ yani hızlı gıdaların tüketiminin artmasıdır. Değişen beslenme alışkanlığı ile birlikte, toplumun ‘sağlıklı’ gıdaya olan merakı ve özlemi, besinsel değerlere önem vermesi, gıda ve sağlık bağlantısını destekleyecek bilimsel çalışmaların sayısının artması ve medya sayesinde bu bilgilerin hızlı dağılması sonucunda kalabalık ve rekabetçi gıda pazarının kapıları açılmıştır, fakat en önemli pazar payı artışı fonksiyonel gıda pazarında olmuştur (Siro ve diğ, 2008). Fonksiyonel gıda tanımını destekleyen ve kabul gören tanımlar şu şekildedir: “ Temel beslenmenin ötesinde çeşitli pozitif sağlık etkisi yaratan gıdalar “ ve “ Normal bir diyetin parçası olarak tüketilmesi amaçlanan konvansiyonel gıdaya görüntü itibariyle ile aynı olup, sağlık açısından konsensiyonel gıda ile karşılaştırıldığında besinsel açıdan fizyolojik faydası olan gıdalar” (Bech-Larsen & Grunert, 2003).

İnsanlık tarihinin başlamasından yakın tarihe kadar olan süreçte, gıdanın sağlık etkisinden çok, tüketimine kadar bozulmadan korunması en önemli konu olmuştur ve gıdanın korunmasında fermantasyon en çok kullanılan, en temel yöntem olmuştur, bu amaçla düşünüldüğünde gıdanın fermantasyonu aslında ilk ‘processed food ‘ yani işlenmiş gıda olarak kabul görmektedir. Gıda fermantasyonun başlama tarihiyle alakalı yapılan çalışmalarda ilk kanıtta fermantasyonun M.Ö. 6000 yılına dayanan Irak’ta peynir yapımında kullanılmasında rastlanmıştır ve bu tarih hayvanlar ve bitkilerin evcilleştirilmeye başlanmasıyla aynı tarihtir, çalışmalar ekmek yapımı, şarap ve bira yapımı için uygulanan alkol fermantasyonu tarihinin ise M.Ö. 4000-2000 yılları arasında başlanıldığını göstermiştir. Gıda fermantasyonun bin yıllar öncesinde başlamasına rağmen, pastörizasyonun keşfine kadar (M.S. 1861), fermantasyon üzerinde mikroorganizmaların önemi anlaşılmamıştır, Sanayi devrimi (1758-1791) büyük ölçekli üretim devrini açmış ve pastörizasyon tekniğinin bu tarihlerde

keşfedilmesiyle birlikte büyük ölçekli fermente alkol üretimi, çeşitli fermente süt, et ve bitkilerin üretimine başlanmıştır (Ross ve diğ, 2002). Ayrıca son çeyrek yüzyılda fermantasyon ile alakalı bilimsel çalışmaların artması, uygulanan metotların, sonuçlarının geçerliliğinin ve doğruluğunun saptanılabilmesi sonucunda gıda ürünlerinde fermantasyon uygulamasının yalnızca koruma amaçlı olmadığını aynı zamanda gıdaya besinsel ve fonksiyonel katkılarının da bulunduğunu pek çok çalışma göstermiştir. Bu fonksiyonel katkının sebebinin ise gıda substratların dönüşümüyle beraber insanlar üzerinde sağlık etkisi bulunan biyoaktif maddelerin fermantasyon sonucunda oluşması, pek çok besin ögesinin biyolojik olarak kullanılabilir hale dönüştürülmesi ve probiyotik mikroorganizmaların pozitif sağlık etkisiyle alakalı olduğu gösterilmektedir (Marco ve diğ, 2017).

Geleneksel işlenmiş ve doğal gıdaya artan taleple birlikte gıda endüstrisi araştırma ve geliştirmeye ayrılan bütçeyi arttırıp inovatif gıda üretimi denemeleri yapmaya başlayarak toplumun sürdürülebilirlik ve doğallık gerekliliklerini yerine getirmeye çalışmaktadır (Hugenholtz, 2013). Süt ve et ürünlerindeki geniş fermente ürün pazarına rağmen bitkisel kaynaklı fermente ürünlere olan talep artmakta sebebi ise şöyle sıralanmaktadır; laktoz ve kolesterol ihtiva etmeyen, diyet lifi, mineral, vitamin ve antioksidan gibi besinsel değerler açısından zengin gıdalardır. Tüm bu sebepler ve sonuçlar toplandığında, arz ve talebin bitkisel kaynaklı fermente gıdalar için artmakta olduğu görülmekte ve bunun sebeplerinin ise geleneksel ve güvenilir tarihinin olması, fonksiyonel son ürün oluşturması ve sağlık üzerinde pozitif etkisi etkisinin bulunmasıdır (Marsh ve diğ, 2014). Gıda ürünlerine probiyotik takviye yapılması, ya da gıda ürünlerinin probiyotik mikroorganizmalar ile fermente edilmesi bağırsak mikroflorasını düzenlemekte bunun yanı sıra da sağlık üzerinde pozitif pek çok etkisinin olması bilimsel camia tarafından yoğun olarak araştırılan konulardan birisidir. Son zamanlarda, süt ya da et ihtiva etmeyen ürünlerin özellikle tahıl ve baklagillerin maya ve bakteri fermantasyonu inovatif ve fonksiyonel gıda araştırmaları ve üretiminde önemli bir yer tutmaktadır (Lee ve diğ, 2008; Torino ve diğ, 2013; Espinoza, 2010).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Bitkisel Kaynaklı Süt İkameleri

Bitkisel kaynaklı pek çok gıda özellikle meyve, sebze, tahıl ve baklagil suları içecek endüstrisinde ve akademik camiada süt ikame maddeleri olarak araştırılmaya ve üretilmeye başlanmıştır. Fermente ve/veya probiyotik içecek tasarımı, geleneksel süte alternatif olarak bitkisel kaynaklı sütler günümüzde fonksiyonel içecek üretiminde popülerite kazanmaktadır. Süte ikame fermente ve /veya probiyotik sütler için yapılan araştırmaların çoğu tahıl ve soya sütleri ile alakalı olup renk, reolojik ve duyusal analizler üzerinde yoğunlaşmıştır (Salmeron, 2015). İnovatif ve bitkisel kaynaklı süt ikame fermente ürünlerin çoğunda *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* türlerine ait suşlar çalışılmaktadır. İnovatif ve fonksiyonel bu ürünlerin eldesinde probiyotik suş kullanımının fermente olmayan bitkisel sütlerle kıyaslandığında pozitif sağlık etkilerinin bulunduğu gözlemlenmiştir. Hammadde olarak yoğunlukla lif bakımından zengin tahılların kullanımı üzerinde çalışılmakta, başlıca çalışmalar ise yulaf, pirinç, fındık sütlerinin fermantasyonu üzerinedir (Bernat ve diğ, 2014). Literatürde bulunan fıstık ve tahıl fermente ürünlerinin temel özellikleri çizelge 2.1’ de gösterilmektedir.

Soya fasulyesi besinsel değer açısından çok zengin bir bitki olup insan beslenmesinde bol miktarda protein ve kalori ihtiyacını karşılamaktadır, protein içeriğinin besinsel kalitesi diğer bitkisel kaynaklı proteinlerle kıyaslandığında önemli derecede pozitif fark yaratır (Bressani & Elias, 1968). Soya fasulyesi kaynaklı proteinlerin ve peptitlerin tüketiminin insan sağlığı üzerindeki pozitif etkilerini gösteren birçok çalışma mevcuttur ve bunların en önemli sonuçları kandaki kolesterol miktarının düşmesi ve kronik hastalıklara karşı korucu bir etkisi bulunmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca soya fasulyesi yüksek miktarda izoflavon (östrojen benzeri antioksidan özelliği bulunan madde) içermektedir (Bannwart ve diğ, 1984). Soya fasulyesinin probiyotik türlerle fermantasyonu sonucunda izoflavon miktarının glikosil yapısının parçalanması sonucunda oluşan aglikon ile birlikte arttığını gösteren

birçok çalışma mevcuttur (Chien ve diğ, 2006).Soya izoflavon aglikon yapısı izoflavon ile kıyaslandığında insan bağırsağı tarafından kolayca absorbe edilir (Izumi ve diğ, 2000). Wang ve arkadaşları Soya fasulyesinin probiyotik türlerle fermentasyonu sonucunda lezzetin arttığını, rafinoz ve stakioz gibi karbonhidrat miktarlarının azalmasıyla midedeki gaz rahatsızlığını azalttığını bildirmişlerdir (2006).

Tahıl, dünyanın neredeyse tüm bölgelerinde büyük miktarlarda yetişen ve temel beslenme gereksinimlerini karşılayan, içerdikleri yüksek miktardaki fitokimyasallar ve diğer biyoaktif bileşikler açısından önemli besin kaynaklarından birisidir (Lafiandra ve diğ, 2014). Ayrıca, gıda fermentasyonu açısından düşünüldüğünde tahıl grubu öne çıkan substratlardır ve başlıca fermente mikroorganizmalar ise Laktik asit bakterileri ve mayalardır, öne çıkan substrat olma sebebi ise prebiyotik özellikte olan insan bağırsağında sindirilemeyen karbonhidrat miktarının yüksek olmasındandır, prebiyotik özellikteki bu sindirilemeyen karbonhidratların insan sağlığına yararının yanı sıra, bağırsakta bulunan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi probiyotik bakterilerin etrafını sararak stabilitelerini artırıp, seçici olarak gelişmesini destekler (Blandino ve diğ 2003; Franz ve diğ 2014; Vashudha ve diğ, 2013). Tahıl ya da tahıl bileşenlerinin fonksiyonel fermente içecek üretiminde kullanılmasının faydaları özetlenecek olursa; (i) fermente edilebilir substrat miktarının fazla olması (ii) diyet lifi miktarının fazla olması ve diyet lifinin pozitif sağlık etkileri bulunması (iii) prebiyotik özellikte sindirilemeyen karbonhidrat içermesidir (Charalampopoulos, 2002). Tahıl esaslı fermente ürünler ham madde cinsine göre sınıflandırılabilirler; mısır, darı ve sorgum Afrika'da çok fazla tüketilirken, Avrupa'da yalnızca düşük oranda pirinç ve buğday fermentasyonuna dayalı ürünler kullanılmaktadır (Franz ve diğ, 2014). Bitkisel kaynaklı substratların hemen hemen bütün geleneksel fermentasyonunda laktik asit bakterileri özellikle *Lb. plantarum* suşları etkin rol almaktadır, amilolitik laktik asit bakteri türleri başlıca *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus pentosus* çeşitli pek çok tahıl bazlı geleneksel fermente üründen izole edilmiştir, bu geleneksel ürünlere örnek olarak Ogi (Nijerya, Afrika) , Mawe (Afrika), Boza (Türkiye, Balkanlar) verilebilir (Petrova ve diğ, 2010-2011). Ekolojik prevalans açısından düşünüldüğünde, mikroorganizmaların tahıl fermentasyonunda görülmesi şu şekilde sınıflandırılabilir, (i) allokton, örnek olarak *Lactococcus lactis* türü verilebilir, orijini hayvansal kaynaklı olmasına rağmen, bitki kaynaklı pek çok ürünün

fermantasyonunda karşılaşılan türlerdir, (ii) otokton, örnek olarak *Lactobacillus sanfranciscensis* türü verilebilir, bunlar bitkisel kaynaklı yerli mikroorganizmalar olup, tahıl fermentasyonunda karşılaşılan türlerdir, (iii) ubiquitous, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lb. brevis* and *Lb. plantarum* türleri örnek olarak verilebileceği gibi bu türler bitkisel, hayvansal vs. çok kaynaklı olup, tahılların fermentasyonunda önemli yer tutarlar (Ehrmann & Vogel, 2005). Çizelge 2.2 Dünya çapında popüler olan tahıl ve diğer bitkisel kaynaklı fermente içeceklerin substrat ve mikroflorasını göstermektedir.

Çizelge 2.1: Literatürde bulunan fıstık ve tahıl fermente ürünlerinin temel özellikleri (Bernat ve diğ., 2014).

Ham madde	Fermentasyonda kullanılan mikroorganizma	Var olan/eklenen prebiyotik
Malt, arpa ve buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L.acidophilus</i>	FOS, β -glukan, nişasta, diğer diyet lifleri
Buğday, yulaf ve arpa	<i>Lb.plantarum</i>	FOS, β -glukan, nişasta, diğer diyet lifleri
Yulaf	<i>Lb.reuteri</i> , <i>Lb.acidophilus</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>L.paracasei</i> , <i>L.plantarum</i>	β -glukan, diğer diyet lifleri
Pirinç	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.casei</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>B.lactis</i>	Nişasta, pentozan, diğer diyet lifleri
Darı	<i>Lb.paracasei</i> , <i>Lb.casei</i> , <i>Lb.rhamnosus</i> , <i>Lb.acidophilus</i>	İnulin, nişasta, pentozan, diğer diyet lifleri
Darı ve arpa	<i>Lb.reuteri</i> , <i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.rhamnosus</i>	İnulin, nişasta, pentozan, diğer diyet lifleri
Gernik buğdayı	<i>Lb.rhamnosus</i>	FOS ve diğer diyet lifleri
Hindistan cevizi	<i>Lb.paracasei</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>	Nişasta ve diğer diyet lifleri
Kestane	<i>Lb.rhamnosus</i>	Nişasta ve diğer diyet lifleri
Yer bademi, badem, fındık	<i>B.lactis</i> , <i>S.thermophilus</i>	Nişasta, FOS, diğer diyet lifleri

Fermente tahıl bazlı içecekler için bazı ticari örnekler verilecek olursa Proviva, Yosa, Grainfields Wholegrain bunlardan bazılarıdır. Proviva yulaf bazlı ticari ilk fermente üründür, probiyotik özellikte de olan bu içecek için probiyotik suş *L.plantatum* 299v

kullanılmaktadır (Corbo ve diğ, 2014). Yosa ise yine yulaf bazlı olup yoğurt benzeri hafif viskoz bir üründür, ürün yapımında yulaf ve suyun pişirilmesiyle ile puding kıvamında substrat hazırlanır ve *L. acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 probiyotik suşları ile fermente edilir (Nyanzi & Jooste, 2012, Zubaidah ve diğ, 2012). Grainfields Wholegrain ise köpüklü fermente ve probiyotik bir içecektir, fermantasyonunda laktik asit bakteri ve maya türleri birlikte kullanılmaktadır, substrata ve son ürüne takviye olarak bazı aminoasitler, vitaminler ve enzimler eklenmektedir. Fermantasyon substratı buğday, darı, arpa, çavdar, yulaf, pirinç gibi tahıllar, malt, mısır, yonca tohumu, keten tohumu, mung fasulyesi gibi pek çok bitkinin karışımıyla elde edilip probiyotik *Lactobacillus* ve maya türleri ile fermente edilir başlıca fermentatif mikroorganizmalar ise *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *Saccharomyces boulardii*, and *S. cerevisiae*' dir ve ilave şeker fermantasyon öncesi ve sonrası kullanılmamaktadır. (Kohajdova, 2014; Nyanzi & Jooste 2012; Vashudha & Mishra, 2013; Prado ve diğ, 2008). Com me ise Güney Vietnamda tüketilen su ile haşlanmış pirinç peltasinin doğal fermentasyonu sonucunda elde edilen kremamsı kıvamdaki fermente içecektir, 6 farklı bölgeden toplanan Com me örneklerinden 28 laktik asit bakteri türü izole edilmiştir ve başlıca türler *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, and *Lb.acidophilus* dir (Anh, 2015).

Soya fasülyesi başta olmak üzere baklagiller ve tahılların fermentasyonu üzerine yapılan çok fazla sayıda bilimsel çalışmalar da bulunmaktadır. Hassan ve arkadaşları pirinç, darı karışımını susam ve kabak çekirdekleriyle zenginleştirip ticari probiyotik kültürlerle (*S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* BB-12) fermente edip fonksiyonel probiyotik içecek üretimi üzerinde çalışmışlardır, fermentasyon parametleri ise 37 °C sıcaklıkta 16 saattir. Fermantasyon sonunda mikrobiyal yük 4.3×10^9 kob/ml ölçülmüş ve 15 günlük +4 °C de raf ömrü tahminlenmiştir (2012). Fermantasyon sonucunda içeceğin renk, doku, lezzet geliştirilmiş ve tüketici tarafından kabul edilme oranı artmıştır. Soya sütü üzerinde yapılan bir çalışmada ise probiyotik *L.acidophilus* suşu kullanılmış bu suşun fermentasyon kabiliyetine yalnız soya sütünde ve soya sütüne elma ilavesi ile bakılmıştır. *L.acidophilus* her iki ortamda da çok iyi büyüme göstermiş ve 21 günlük +4 °C de yapılan raf ömrü analizi sonucunda 8.73–9.11 log kob/ml mikrobiyal yük gözlenmiştir, bu değer probiyotik fonksiyonel içecek gerekliliğini sağlamaktadır (İçier ve arkadaşları, 2015).

Çizelge 2.2 : Dünya çapında popüler olan tahıl ve diğer bitkisel kaynaklı fermente içeceklerin substrat ve mikroflorası (Marsh ve diğ., 2014).

Ürün	Substrat	Bölge	Mikroflora
Amazake	Pirinç	Japonya	Küf: <i>Aspergillus spp.</i>
Boza	Arpa, yulaf, çavdar, darı, mısır, buğday veya pirinç	Balkanlar; (Türkiye, Bulgaristan)	LAB: <i>Leuconostoc (Leu. paramesenteroides, Leu. sanfranciscensis, Leu. mesenteroides), Lactobacillus (Lb. plantarum, Lb. acidophilus, Lb. fermentum)</i> ; Yeast: <i>Saccharomyces (S. uvarum, S. cerevisiae), Pichia fermentans, Candida spp.</i>
Bushera	Sorgum, darı unu	Afrika (Uganda)	Bacteria: <i>Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus.</i>
Koko	Darı	Afrika (Gana)	Bacteria: <i>Weissella confusa, Lb. fermentum, Lb. salivarius, Pediococcus</i>
Kvass	Çavdar ekmeği, çavdar, arpa maltı, arpa unu	Rusya	LAB: <i>Lb. casei, Leu. mesenteroides</i> ; Yeast: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pozol	Mısır	Meksika	Bacteria: <i>L. lactis, Streptococcus suis, Lactobacillus (Lb. plantarum, Lb. casei, Lb. alimentarium, Lb. delbruekii), Bifidobacterium, Enterococcus.</i>
Togwa	Mısır unu, darı, malt	Afrika (Tanzanya)	LAB: <i>Lactobacillus spp.</i> ; Yeast: <i>Saccharomyces cerevisiae, Candida spp.</i>
Hardaliye	Üzüm, hardal tohumu, vişne yaprağı	Türkiye	LAB: <i>Lactobacillus spp.</i> Uncharacterised fungal component
Kombucha	Çay	Çin ve dünyanın pek çok yerinde	Bacteria: <i>Gluconacetobacter (G. xylinus), Acetobacter, Lactobacillus</i> Yeast: <i>Zygosaccharomyces, Candida, Hanseniaspora, Torulaspora, Pichia, Dekkera, Saccharomyces</i>

2.2 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri yaşayan hücreler olup, gram pozitif, çubuk ya da kok şeklinde, spor oluşturmamayan, katalaz ve oksidaz negatif, prokaryot bakteriler olup, heterotrofik ve kemoorganotroflardır, yani organik bileşikleri enerji üretiminde karbon ve elektron kaynağı olarak kullanırlar (Burgain ve diğ, 2014).

Laktik asit bakterileri *Aerococcus*, *Alliococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinsindeki bakterilerdir (Stiles and Holzappel, 1997). LAB cinslerinin genel olarak bazı gıdaların fermantasyonunda kullanımı şu şekildedir; *Carnobacterium*, *Enterococcus* ve *Lactobacillus* süt, et sebze ve tahıl türlerinin fermantasyonunda, *Lactococcus* süt ürünleri fermantasyonunda, *Leuconostoc* sebze ve süt ürünlerinde, *Oenococcus* şarap üretiminde, *Pediococcus* sebze ve et ürünlerinde, *Streptococcus* ise yine süt ürünleri üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Vandamme ve diğ, 1996).

Laktik asit bakterileri (LAB) özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsleri gıda fermantasyonunda ve probiyotik gıda üretiminde yaygın olarak kullanılan bakterilerdir. Fermente gıdaların aroma ve lezzet oluşumunda başrolde bulunan laktik asit bakterileri fermantasyon sonucunda gıdaya güçlü bir asit tadı vermektedir. LAB fermantasyonu gıdanın asiditesini arttırırken, aynı zamanda da lipolitik ve proteolitik enzimlerinin aktivitesi sayesinde pek çok aromatik bileşik oluştururlar (Leroy and Vuyst, 2004). Gıda endüstrisinde LAB birçok alanda kullanılmaktadır, gıdanın asiditesini arttırıp pH' ının düşürmesinin yanı sıra, gıdadaki karbonhidrat miktarını da düşürmektedirler çünkü metabolik faaliyetlerinde kullanılacak enerjiyi gıdanın karbonhidrat içeriğinden karşılamaktadırlar. Laktik asit bakterilerinin büyümesi ve fermantasyonu sonucunda pH neredeyse 4,00 altına düşmekte böylece, gıda bozulmasında rol oynayan, insan sağlığına zararlı, patojen pek çok mikroorganizmanın gelişmesine engel olup, gıdanın raf ömrünü uzatırlar (Reddy ve diğ, 2008). Laktik asit bakterileri fermantasyonu 2 farklı metabolik yol izleyerek gerçekleştirilebilirler; bunlar homofermentatif ve heterofermentatif metabolik yollar olup, fermantasyon sonucunda ürettikleri başlıca son ürünler organik asitler, alkol ve karbondioksittir (Bryan ve diğ, 2015). Homofermentatif LAB türleri fermantasyon sonucunda başlıca laktik asit üretirken, heterofermentatif LAB türleri başlıca laktik asit, karbondioksit, alkol üretiminin yanı sıra, çeşitli pek çok son ürün üretiminden de sorumludurlar (Silve ve diğ, 2013).

2.3 Probiyotik Mikroorganizmalar

'Probiyotik' terimi latince kaynaklı olup anlamı 'hayat için' dir ve probiyotik mikroorganizma tanımı ilk olarak Kollath tarafından 1953'de yapılmıştır. Bu tanımda probiyotikler zararlı mikroorganizmaların büyümesini engelleyen organik ve inorganik gıda bileşeni olarak tanımlanmıştır (Mitsuoka, 1996). Nobel ödülü sahibi Rus bilim adamı Elie Metchnikoff'un teorisine göre; yaşlanmadan uzun ömrün sırrı fermente süt ürünlerinin düzenli olarak tüketilmesiyle alakalıdır ve bu ürünlerdeki laktik asit bakterilerinin bağırsak mikroflorasında bulunan zararlı mikroorganizmalarla yer değiştirdiğini böylece daha uzun ve sağlıklı bir ömür geçirilebileceğini savunmuştur (Lourens & Viljoen, 2001). Yapılan pek çok bilimsel çalışma ve tanımdan sonra Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) probiyotikleri şu şekilde tanımlamıştır; "Uygun miktarda tüketildiğinde pozitif sağlık etkileri bulunan yaşayan mikroorganizmalar" Genel olarak probiyotik ürün üretiminde kullanılan mikroorganizmalar şu şekildedir; laktik asit üreten mikroorganizmalar örn. *Bifidobacteria*, ve *Lactobacilli*, laktik asit üretmeyen mikroorganizmalar *Bacillus*, *Propionibacterium* ve patojen olmayan maya cinsleri örn. *Saccharomyces*' dir. Bu probiyotiklerin bağırsak mikroflorasında bulunması mukozal antikor üretimini artırır, ve bağışıklık sistemini güçlendirir (Zhou ve diğ, 2010; Champagne ve diğ, 2011). Yapılan birçok bilimsel araştırma sonucunda probiyotiklerin tüketiminin kanser hücrelerinin engellenmesinde pozitif etkileri olduğunu göstermiştir ve probiyotiklerin çalışma mekanizmasıyla alakalı 3 yöntem tanımlanmıştır bunlar; (i) kanserojen madde üreten organizmaların gelişimini engellemek (N-nitrozo bileşikleri, tirozin ve triptofanın fenolik bileşenleri ve safra steroidlerinin metabolitleri vs. gibi); (ii) kanserojen maddelerin inaktivasyonu ve/veya bağlanması; (iii) tümör hücrelerinin oluşumunun engellenmesi (McCartney, 2003). Probiyotik tüketiminin sağlık üzerine etkisini inceleyen çalışmaların çoğu laktoz sindirimi, ishal, ağız sağlığı, bağırsak sistemi düzeni, vajinal sağlık, bağışıklık sistemi ile alakalı olup, probiyotik tüketiminin sağlık üzerinde pozitif etkileri olduğunu göstermiştir.

Çizelge 2.3 : Probiyotik mikroorganizmalar (Prado et al, 2008).

<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i>	Diğerleri
<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>adelescetis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Clostridium botyricum</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>B. bifidum</i> 700795	<i>Enterococcus feacalis</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterecoccus faecium</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>B. longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteorides</i>
<i>Lb. fermentum</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lb. gasseri</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. helveticus</i>		<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Lb. johnsonii</i>		
<i>Lb. lactis</i>		
<i>Lb. paracasei</i>		
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		

Medikal uygulamalarda kullanılan bazı probiyotikler ise şöyledir; *Lactobacillus rhamnosus* GG; *L. reuteri*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Escherichia coli* türlerinin bazı suşları; *Bifidobacteria* ve *Enterococci* (*Enterococcus faecium* SF68) ve probiyotik maya *Saccharomyces boulardii* (Vrese ve diğ, 2007). Çizelge 2.3’de probiyotik mikroorganizmalar gösterilmiştir.

Gıda endüstrisinde probiyotik olarak en çok kullanılan LAB cinsleri *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus*’ dur ve bu cinslerin çoğu türü sindirim sistemindeki fizyokimyasal şartlara dayanıklıdır (Heyman and Menard, 2002). Probiyotik suşların gıda fermantasyonunda kullanılması gıdanın fonksiyonel özelliğini arttırmaktadır. Bu günlerde, probiyotiklerin gıdada kullanımı hayvansal kaynaklı süt ürünlerinde yaygın olsada, bitkisel kaynakların özellikle diyet lifi içeren tahıl ürünlerinin probiyotikleri kaplayıp, korumasıyla bağırsağa kadar canlı olarak iletilmesinde önemli rol aldığını birçok çalışma göstermektedir (Prado ve diğ 2008; Lamsal and Faubion 2009; Granato ve diğ 2010).

2.3.1 *Lactobacillus* cinsi bakteriler

Gıda mikrobiyolojisi ve insan sağlığı açısından en önemli taksonlardan birisi *Lactobacillus spp* dir. Laktik asit ailesine bağlı bir cins olan Laktobasiller zengin karbonhidrat içeren maddelerin bulunduğu çeşitli yaşam ortamlarında bulunurlar. Bu cinse ait türler; hayvan ve insanların mukoz membranlarında (ağız boşluğu, bağırsak ve vajina), bitki ve bitki kaynaklı ürünlerde, fermente veya bozulmuş gıdalarda, kanalizasyon vs. gibi çok geniş alanlara yayılmışlardır. Laktobasili türleri özellikle fermente gıda üretiminde (sebze, et ve süt fermantasyonunda) starter kültür, yardımcı ya da koruyucu kültür olarak kullanılırlar (Bernerdeau ve diğ, 2008). Geleneksel fermente ürünlerde doğal olarak bulunan Laktobasili türü düşük pH’a en dirençli bakteri türlerinden biri olup, gıda substratına göre adaptasyon olabilme özellikleri vardır bu özellikleri açısından gıda teknolojisi ve uygulamalarında büyük rol oynarlar (Tripathi and Giri, 2014). *Lactobacillus* cinsine ait türler, gram pozitif, çubuk ya da kok şeklinde spor oluşturmeyen bakterilerdir. Katalaz negatif, fermente edici, aerotolerant veya anaerobik, kemoorganotrofik, asidurik veya asidofilik bakteriler olup gelişimleri için kompleks (karnonhidrat, aminoasit, peptit, yağ asiti esterleri, tuz, vitamin vs.) besinlere ihtiyaç duyarlar. *Lactobacillus* türleri ağırlıklı olarak üzere homofermentatiflerdir yani yalnızca şekerden laktik asit üretirler, ya da heterofermentatiflerdir ve fermantasyon sonucunda laktik ve diğer organik asitlerle

birlikte karbondioksit üretimi yaparlar. Hammes ve Vogel (1995) Laktobasili türlerini fermantasyon yeteneklerine göre sınıflandırmışlardır; (i) zorunlu homofermentatif Laktobasili yalnızca heksoz şekerleri fermente edip Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolunu izleyip laktik asit üretenler (pentozları ve glukonatları fermente edemezler çünkü fosfoketolaz aktiviteleri yoktur), (ii) fakültatif heterofermentatif Lactobacillus, bu türler heksoz şekerleri EMP yoluyla fermente edebilirler, aynı zamanda pentoz şekerleri ve glukonatları da aldolaz ve fosfoketolaz aktiviteleri sayesinde fermente edebilirler, (iii) zorunlu heterofermentatif Laktobasili, heksoz şekerleri fosfoglukonat yoluyla laktat, etanol veya asetik asit ve karbondioksite dönüştürürler ve pentoz şekerleri de aynı yolla fermente edebilirler (Sanchez and Sanz, 2011).

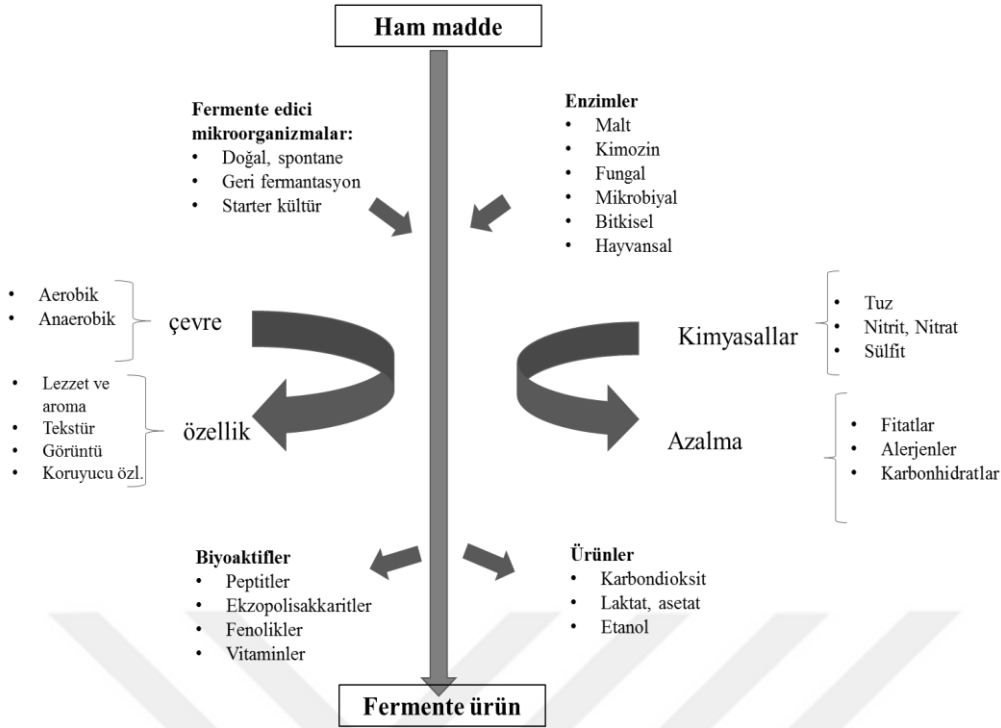
2.3.2 Bifidobacterium cinsi bakteriler

Bifidobacterium cinsi laktik asit bakterisi grubundadır, gram pozitif, zorunlu anaerob, hareketsiz, filamentöz olmayan, spor oluşturmeyen ve polimorfik-çubuk şeklindeki bakterilerdir. *Bifidobacterium* türleri yalnızca kısıtlı kaynaklardan izole edilebilirler bu kaynaklar; insan ve hayvanların mide- bağırsak kanalı, gaita örnekleri, bazı böceklerin bağırsağı, kanalizasyon ve bazı gıdalardır. *Bifidobacterium* spp. türleri fermantasyon sırasında monosakkarit ve disakkaritler için fructose-6-phosphate fosfoketolase yolunu kullanırlar, aynı zamanda pek çok bitkisel üründe bulunan oligosakkaritler, arabinoz, ksiloz, riboz, sükroz, selüloz vs. gibi karbonhidratları da kullanabilmektedirler. Probiyotik olarak kabul görülen birçok *Bifidobacterium* türünün sağlık etkisi araştırılmış ve bu türleri içeren ürünlerin kullanımı insan sağlığı üzerindeki pozitif etkileri için şiddetli bir şekilde önerilmiştir ve önerilen bu türler ‘generally safe’(GRAS) yani genel olarak güvenilir statüsündedirler (Margolles ve diğ., 2011). *Bifidobacterium* türlerinin ürettikleri organik asitler (çoğunlukla asetik asit ve laktik asit) patojenlerin dolaylı veya dolaysız olarak gelişmesini engellemektedirler ve bağırsaklardaki peristalsi hareketlerini uyarırlar. Asetik asit gram negatif bakteriler üzerinde laktik asitle kıyaslandığında daha antagonistik bir etkiye sahiptir bu nedenle, bifidobakterilerin mikrobiyal pertürbasyona karşı potansiyel uygulamaları, laktobasillerin potansiyel uygulamalarından daha geniş olabilir. Aynı zamanda *Bifidobacterium* türlerinin ürettiği çeşitli organik asitler birçok nitrat-indirgeyici bakterilerin gelişmesini engellemektedir. Bifidobakterilerin tiamin, riboflavin, B6 vitamini ve K vitamini ürettiği bilinmektedir. Ayrıca, folik asit, niasin ve piridoksin sentezleme yetenekleri hakkında raporlar da bulunmaktadır (McCartney, 2003).

2.4 Fermantasyon

Fermente gıdalar ve içecekler genel olarak ham maddenin besinsel değeri, dokusu ve rengi bakımından yeni ürün geliştirmek için kontrollü mikrobiyal büyüme ve enzimatik aktivite ile majör ve minör gıda bileşenlerinin değişmesi sonucunda ham ürünün yeniden işlenmesi olarak tanımlanır. Şekil 2.1’de hammaddede oluşabilecek değişiklikler özetlenmiştir. Gıdaların fermantasyonu 2 kategoride incelenebilir; ana metabolitler ve ana mikroorganizmalar. Bu sınıflandırmada (i) alkol ve karbondioksit üretimi; maya, (ii) Asetik asit; Asetobakter (iii) Lactic acid; Laktik asit bakterilerine ait cinsler örn. *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, ve *Streptococcus* (iv) Propiyonik asit; *Propionibacterium* (v) Amonyak ve yağ asitleri; *Bacillus* spp. ve küfler. Aynı zamanda fermantasyon gıda ürünleri açısından da tanımlanabilir; et fermantasyonu, balık fermantasyonu, süt, sebze, soya fasülyesi ve diğer baklagiller, tahıllar, üzüm ve diğer meyvelerin fermantasyonu gibi başlıklar altında da toplanabilirler. Genel olarak, ham madde yüksek miktarda monosakkarit ve disakkarit içeriyorsa (bazı durumlarda nişasta) öncelik olarak laktik asit bakterileri ve mayalar tarafından fermente edilir. Küfler ve *Bacillus* cinsi bakteriler sahip oldukları enzimlerle nişastanın sakkarifikasyonunda ve proteinlerin parçalanmasında veya primer fermantasyondan sonra ikincil olgunlaşma etkin rol oynarlar. Çok sayıdaki gıda ve mikroorganizma kombinasyonunun bir sonucu olarak binlerce farklı fermente ürün elde edilebilir (Marco ve diğ, 2017).

Ürünlerin fermantasyonunda laktik asit bakterisi kullanımı son ürünün fonksiyonel özelliklerini arttırmaktadır, LAB cinsi bakterilerin fermantasyon sırasında ürettikleri antimikrobiyal maddeler, şeker polimerleri, aromatik bileşenler, enzimler ve bazı cinslerinin probiyotik aktiviteleri sayesinde endüstride bir çok amaçla kullanılmakta, koruyucu madde kullanımını azaltarak raf ömrünün uzatılmasının yanı sıra, sağlık üzerine pozitif etkisini arttırmakta, besinsel ve organoleptik değerlerini arttırmaktadır. LAB bakterileri homofermentatif olup yalnızca glikozdan laktik asit üretebilirler (>90% teorik elde) ya da heterofermantatif olup laktik asit üretiminin yanısıra CO₂, asetik asit ve/veya etanol üretebilirler (Leroy and Vuyst, 2004). Bitkisel kaynaklı disakkaritler; maltoz ve sükroz gibi, bakteri hücrelerine spesifik geçirgenlik sisteminden geçirilerek hücre içerisine alınır, çeşitli enzimlerle fosforolize uğradıktan sonra monosakkarit haline getirilip, LAB çeşidine bağlı olarak farklı metabolik yollardan geçirilip fermantasyona uğrarlar (von Wright & Axelsson, 2012).



Şekil 2.1 : Fermantasyon süresince ham maddede gözlemlenen değişiklikler (Marco ve diğ.,2017).

Gıda fermantasyonu çeşitli iç ve dış faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir, iç faktörler; gıdanın pH'ı, nem içeriği, redox potansiyeli ve gıdanın besinsel içeriği ve yapısıdır. İç faktörlerin etkisine örnek verilecek olursa, mayaların gelişimi için en uygun pH 4-4,5 olmasına rağmen geniş pH spektrumunda gelişebilirler fakat LAB cinsi bakteriler genellikle düşük pH da gelişebilirler ($pH < 4$) ve laktik asit üretiminden kaynaklı pH düşüşünde de gelişmeye devam edebilirler. Fakat çoğu bakteri cinsi özellikle patojen ve bozulmaya sebep veren bakteriler $pH < 4$ de gelişemezler. LAB cinsi bakterilerin bu özellikleri fermente ürünün güvenli ve uzun raf ömürlü olmasını sağlar. Gıdanın nemi ve özellikle su aktivitesi (gıdanın içerisinde bulunan mikroorganizmaların ve enzimlerin aktivitesi için gerekli su oranı) mikroorganizmaların gelişmesi ve kontrolü için en önemli iç faktörlerden birisidir. Bazı küf ve maya cinsleri için gerekli su aktivitesi en az 0,88' dir, ve bir çok bakteri çeşidi gelişmek için 0,9 üzerinde su aktivitesine ihtiyaç duyarlar. Redoks potansiyeli (Eh) ise yine önemli bir iç faktör olup aerobik mikroorganizmalar pozitif redoks potansiyelli ortamlarda gelişebilirken, anaerobik mikroorganizmalar negatif redoks potansiyelinde gelişme gösterirler. Gıdanın içerisindeki indirgen şeker örn. glikoz anaerobların büyümesi için gerekli olan indirgeme koşullarını sağlar. Dış faktörlerden birisi olan

oksijen miktarı ise mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri için önemli olup fermantasyon yolunun belirlenmesinde rol oynar, LAB cinsi bakterilerin büyüyebileceği anaerobik ortamlarda zorunlu aerobların gelişmesi engellenir (Taylor, 2016).

2.5 Bitkisel Kaynaklı Fermente Ürünlerin Fonksiyonel Özellikleri

Hippocrates'in 2400 yıl önce " gıda şifadır, şifa gıdadır " sözünde de belirttiği gibi, sağlığın gıda ile alakası çok uzun yıllar öncesinden itibaren bilinmektedir, günümüzde yapılan pek çok bilimsel araştırma ile beslenmenin ve günlük besinsel ihtiyaçların karşılanması çoğu hastalığın tedavisinde ve engellenmesinde önemli rol oynamaktadır. Gıdaların fermantasyonuyla birlikte gıdanın besinsel değerlerinin arttığı yapılan araştırmalarla ispatlanmıştır (Otle ve Cagindi 2012). Fermente gıdaların potansiyel sağlık etkileri ve avantajları ise şu şekildedir; antihipertansif etkinlik, kan şekerinin düşürülmesi, antidiyareik ve antitrombotik özelliklerdir, fermente gıdaların içeriğinin kapsamlı bir değerlendirmesi ve sağlık yararlarının sebeplerinin araştırılması sonucunda, fermantasyonun vitamin, mineral, aminoasit, yağ asitleri ve fitokimyasal değerlerini arttırdığı ve/veya gıdada mevcut bulunan bu içeriklerin transformasyona neden olduğu, bu yüzden sağlık etkisinin gıdanın fermente olmamış formuyla kıyaslandığında arttığı anlaşılmıştır (Wilburn ve Ryan, 2017).

Bitkisel kaynaklı fermente gıdalar alerjen olmamaları ve düşük yağ içeriğine sahip olmalarının yanı sıra, mineral, vitamin ve çeşitli antioksidan özellikteki maddeler açısından zengin olduğu günümüzde bilinmekte ve tüketim miktarı Dünya genelinde günden güne artmaktadır (Espinoza, 2010). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda, insan vücudunun monogastrik sisteminde bitkisel birçok protein içeriğinin sindiriminin zor olmasına rağmen, tahıl tanelerinin laktik asit bakterileriyle fermantasyonu sonucunda fermente edici mikroorganizmaların sahip olduğu proteolitik enzimler sayesinde proteinin parçalandığı ve insan vücudunda sindiriminin ve emiliminin arttığı belirlenmiştir. LAB bakterileri bitkisel kaynaklı ürünlerin fermantasyonu sırasında çeşitli B vitaminlerini üretmekte ve bazı toksik veya besinsel bir önemi bulunmayan bileşenlerin miktarını azaltmaktadır. Fitik asit bitkisel kaynaklı ve besinsel bir önemi olmayan bir bileşen olup, metal iyonlarını şelatlamaktadır, tahılların LAB cinsi bakterilerle fermantasyonu sonucunda pH değerinin düşmesi fitaz enziminin aktivitesini düşürmekte/engellemektedir, böylece fitik asit miktarı

azalmakta, esansiyel mineraller; mangan, demir, çinko ve kalsiyum miktarı fermente bitkisel gıda içerisinde artmaktadır. Ayrıca mangan elementi laktik asit bakterilerinin gelişimi içinde önemli faktörlerden birisidir (Blandino ve diğ, 2003; Wood, 2003 ve Laatikainen ve diğ, 2016).

Biyoaktif yağ asitleri olan konjuge linoleik asit (CLA) ve konjuge linolenik asit (CLNA), insan fizyolojisinde önemli bir yere sahiptir, bu yağ asitleri esansiyel olmakta ve insan vücudunda üretilmemektedir, antikanserojen, antidiyabetik, anti aterosklerotik etkilere sahip olan bu biyoaktif yağ asitlerinin bitkisel kaynaklı ürünlerin LAB cinsi bakterilerle fermantasyonu sonucunda miktarlarının arttığı yakın bir tarihte keşfedilmiş ve fonksiyonel bitki, tahıl kaynaklı ürünlerin üretiminde kullanılmaya başlanmıştır (Russell ve diğ, 2011; Ogunremi ve diğ, 2017). Mikrobiyal bazlı biyoaktif ürünlerin üretimi mikroorganizmanın türüne ve suşuna bağlıdır, örnek verilecek olursa, hayvansal ve bitkisel kaynaklı süt ürünlerinde folat, riboflavin ve B12 gibi B vitaminlerinin sentezi tamamen fermantasyonda kullanılan LAB cinsine bağlıdır (Chamlagain ve diğ, 2015; Russo ve diğ, 2014).

Fermantasyon teknolojisinin koruyucu etkisi birçok gıdada olduğu gibi, tahıl bazlı ürünlerde gözlemlenmiştir. LAB cinsi bakterilerin diğer bakteriler üzerindeki antibiyosiz etkilerinin kaynakları şu şekilde sıralanabilir; ürettikleri organik asitler, hidrojen peroksit ve antibiyotikler. Fermantasyon sonucunda LAB cinsi bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyallere örnek verilirse, organik asitler; laktik asit, asetik asit, formik asit, fenillaktik asit, kaproik asit olabilmekte, doğal antimikrobiyaller ise karbondioksit, hidrojen peroksit, diasetil, etanol, reuterin ve reuterisiklidir. LAB cinsi bakterilerin fermantasyon sonucu oluşturdukları organik asitler bitkisel kaynaklı gıdanın pH değerini 4.0 ün altına düşürmekte ve bitkinin doğal mikroflorasında bulunan bozulmaya sebebiyet veren mikroorganizmaların gelişimini durdurmaktadır. Üretilen organik asitlerin diğer mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisinin sebebi, mikroorganizmaların hücre zarının yük değerlerinin değişmesi sonucunda, zarın zarar görmesi ve aktif iletimin durmasından kaynaklanmaktadır. Doğal antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra, organik asitler örn. asetik asit, son ürünün aromasına da katkıda bulunmaktadır (Messens and De Vuyst, 2002). Organik asitlerin öneminin yanı sıra, LAB bakterilerinin hidrojen peroksit üretimi de gıdanın korunmasında önemli bir yer tutmaktadır, katalaz negatif olan LAB cinsi bakteriler oluşturdukları hidrojen peroksitin birikmesine sebep olmakta ve

hidrojen peroksite hassasiyeti bulunan mikroorganizmaların inhibisyonuna sebep olmaktadır (Blandino ve diğ, 2003). Bakteriyosinler; biyoaktif peptitler olup, ribozomal olarak LAB cinsi bakteriler tarafından sentezlenip hücre dışına salınan doğal antimikrobiyallerdir. LAB bakteriyosinlerinin gıda endüstrisinde kullanımının önemli bir yer bulunmaktadır, bu maddeler ökaryotik hücreler için toksik değildir, insan sindirim sisteminde sindirilebilir, düşük pH ve yüksek ısıya dayanıklı ve geniş antimikrobiyal etki alanına sahiptirler (Galvez ve diğ, 2007).

LAB cinsi bakterilerin bitkisel kaynaklı ürünlerde gelişmesi ve fermantasyonu sonucunda flavanoid bileşenlerin glikozil hidrolaz, esteraz, dekarboksilaz ve fenolik asit redüktaz gibi çeşitli enzimler sayesinde daha biyoaktif bileşenlere dönüşmesine sebep olmaktadır (Flannino ve diğ, 2015). Ayrıca bitkisel kaynaklı gıdaların LAB fermantasyonuyla toplam fenolik bileşen miktarının da arttığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır, yapılan çalışmalar sonucunda fermente tahıl ve çeşitli bitkilerin antioksidan aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir, bu artış yine LAB cinsine ve türüne bağlı olarak değişmektedir (Ng ve diğ, 2011). Soya fasulyesi, pirinç, arpa, gernik buğdayı ve yulaf ile yapılan çalışmaların laktik asit bakterileri ile fermantasyonu sonucunda, fermente edilmemiş örneklerle kıyasla daha yüksek antioksidan aktiviteleri gözlemlenmiştir (Coda ve diğ, 2012; Wang ve diğ, 2006). Aktif akil katekoller bitkilerin fermantasyonu neticesinde üretilir ve Nrf2 (NFE2L2) proteinini aktif hale getirirler, bu protein memelilerde oksidatif stresin ana düzenleyicisidir, antioksidan ve detoks enzimlerinin aktivitesini düzenleyip hücrelerin kimyasal ve oksidatif bozulmalarını engellemektedir (Senger ve diğ, 2016). Bitkisel kaynaklı tanelerin, bu tanelerden hazırlanan bitkisel sütlerle kıyaslandığında daha düşük protein içeriğine, esansiyel aminoasitlerin örn. lizin miktarlarının, nişasta ve tanin, fitik asit, polifenol gibi bileşenlerin daha az olduğu bildirilmiştir (Blandino ve diğ, 2003). Bu bileşenler değişik kimyasal yapılarda ve fonksiyonlarda bulunurlar, fakat fermantasyon sayesinde bu tanelerin karbonhidrat miktarı özellikle sindirilemeyen poli ve oligosakkarit miktarı azalmakta, protein kalitesi ve lizin seviyesi artmasının yan sıra, bazı aminoasitlerin sentezlenmesi ve B grup vitaminlerinin mevcudiyeti artmaktadır. Fonksiyonel ve sağlıklı gıdaların üretimi için bitkisel kaynaklı ham madde kullanımı ve bu hammaddelerin LAB ve maya fermantasyonu üzerine yoğun bir şekilde günümüz endüstrisi ve akademik camia çalışmaktadır ve elde edilen sonuçların hemen hemen hepsi bu ürünlerin fonksiyonel

ve sağlık açısından yararlı olduğunu desteklemektedir (Lee ve diğ, 2008; Torino ve diğ, 2013).

2.6 Diyet Lifleri

Diyet lifleri, heterojen ve kompleks yapıda fitokimyasal bileşen içeren maddelerdir ve 2008 yılında WHO ve FAO tarafından yapılan tanımı şu şekildedir ‘‘ Yapısında en az on veya daha fazla monomer bulunduran, insanların ince bağırsağındaki enzimler tarafından sindirilmeden geçip, kalın bağırsakta bulunan mikroflora tarafından fermente edilebilen polisakkaritlerdir ‘‘ (Fernández ve diğ, 2016). Diyet lifleri şu şekilde kategorize dileyebilir; (i) Gıdanın kendisinde doğal olarak bulunan ve tüketilen karbonhidrat polimerleri (ii) Fiziksel, kimyasal veya enzimatik yollarla gıda ham maddesinden ayrıştırılıp, sağlık ve bilim otoriteleri tarafından etkileri onaylanan karbonhidrat polimerleri, (iii) Pozitif sağlık etkileri bulunan ve otoriteler tarafından onaylanan sentetik karbonhidrat polimerleri (Phillips & Cui, 2011). Diyet liflerinin bir çok fiziko-kimyasal özellikleri ve sağlık etkileri vardır; örn. su bağlama kapasiteleri yüksektir ve böylece gıdanın vizkositesini arttırlar, sağlık etkileri ise insan vücudundaki kolesterol ve yağı bağlayabilirler, kan şekerini düşürürler ve bağırsak sistemini düzenlerler (Foschia ve diğ, 2013).

Diyet lifleri birçok açıdan gruplandırılabilir, bunlardan ikisi yapılarına göre ve çözünürlüklerine göredir. Yapılarına göre diyet lifleri lineer ya da lineer olmayan moleküller olarak ayrılır, çözünürlüklerine göre yapılan gruplandırmada ise çözünür veya çözünür olmayan diyet lifleridir. znr olmayan diyet lifleri; bitkilerin hücre çeperi bileşenleridir örn. selüloz, lignin, hemiselüloz, çözünür olan diyet lifleri ise; selüloz içermeyen polisakkaritlerdir örn. pektin, gam, zamk (Dai and Chau, 2017). znr olmayan diyet lifleri çoğunlukla kalın bağırsakta probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermente edilir böylece probiyotik mikroorganizmaların gelişimi desteklenir. znr diyet lifleri ise, kanda bulunan şeker miktarını ve kolesterol miktarını fazla ise düşürür ve bu değerlerin dengede kalmasını sağlar. Diyet liflerinin tkretiminde tahıllar önemli bir rol oynar, diğer bitki türleriyle kıyaslandığında yüksek oranda diyet lifi içerirler ve diyet lifi içeren başlıca tahıllar şu şekildedir; buğday, yulaf, arpa, pirinç, avdar ve başlıca diyet lifi bileşenleri ise; arabinoksilanlar, β -glukanlar, fruktanlar ve dirençli nişastalardır (Foschia ve diğ, 2013).

Arabinoksilanlar, tahıllardaki nişasta dışında bulunan en yaygın polisakkarittir, ana bileşenleri ksiloz ve arabinozdur ve genel olarak pentoz olarak da tanımlanır. Fenolik asitler örn. ferulik asit ester bağıyla C(O)-5 pozisyonundaki arabinoza bağlıdır, aynı zamanda ferulik asit serbest radikal yakalayıcıdır ve antioksidan özelliğinde olup pozitif sağlık etkileri bulunmaktadır (Mendis ve Simsek, 2014). Arabinoksilanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, bu polimerlerin *Lactobacilli spp.*, *Clostridium coccoides*, *Eubacterium rectale* gibi probiyotiklerin kalın bağırsaktaki gelişimini pozitif yönde etkilediğini ve yapılan in-vivo çalışmalarla da katılımcıların sindirim sistemlerinin mikroflorasının da düzenlendiği desteklenmiştir (Sanchez ve diğ, 2009). β -glukan, neredeyse bütün ot familyasında bulunan bir diyet lifidir, aynı zamanda bazı tahıl ürünlerinin endosperm hücre duvarlarında yüksek miktarda bulunurlar, β -glukan içeren gıdaların tüketiminden sonra kan şekerinin oranının düzenlenmesinde rol oynarlar. Düzenli tüketiminin hiperkolesterolemik hastalığa sahip insanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda LDL (kötü huylu) kolesterolü düşürdüğü saptanmıştır. Ayrıca birçok çalışma β -glukan içeren gıdaların tüketiminin tokluk hissi süresini arttırdığını ve kilo kontrolü için tüketiminin önemli olduğunu göstermiştir. Çözülebilir özellikte olan β -glukanın laksatif etkisi düşüktür fakat yine de kalın bağırsaktaki fermantasyonu sindirim sisteminin düzenlenmesinde rol oynar (Tosh ve Miller, 2016). Frukta nlar tahıllarda, soğan, sarımsak, enginar, kuşkonmaz, marul gibi bitkilerde yaygın olarak bulunur, kalın bağırsak mikroflorası tarafından kullanılabilirler ve yan ürün olarak kısa zincirli yağ asitleri üretilmesine neden olurlar. Frukta nların düzenli tüketimi örn. fruktan oligosakkarit (FOS) ve polisakkarit olan inulin, genel sağlık üzerinde birçok pozitif etkiye sahiptir; kan değerlerini düzenler, bağırsak içi ve dışı mikroflorayı düzenler, immün sistemini güçlendirir ve alerji riskini azaltır (Delgado ve diğ, 2010; Vos ve diğ, 2007; Peshev ve Ende, 2014).

2.7 Prebiyotikler

Prebiyotikler gastrointestinal sistemdeki (ince barsak) sindirim ve emilim için direnç gösteren bir grup karbonhidrat olarak karakterize edilmiştir; kalın bağırsak mikroflorası tarafından fermente edilir, sınırlı sayıda kolonik bakterilerin büyümesini ve aktivitesini seçici olarak teşvik eder, sonucunda ise bağırsak mikroflora dengesini daha sağlıklı olacak şekilde değiştirir (Miremadi ve Shah, 2012; Gibson and Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2007). Prebiyotik olarak tanımlanan bileşenlerin hepsi lif yapısında olmasına rağmen, lif türlerinin tamamı probiyotik özelliğe sahip

değillerdir. Bir gıda bileşeninin prebiyotik olarak tanımlanabilmesi için bilimsel olarak kanıtlanmış çeşitli gereklilikleri yerine getirmesi gerekmektedir bu gereklilikler; (i) Mide asitine dayanıklı olmalı, memelilerin enzimleri tarafından hidrolize edilebilmeli ve üst gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilebilmelidir (ii) Kalın bağırsak mikroflorası tarafından fermente edilmelidir (iii) Seçici olarak, bağırsak mikroflorasındaki sağlık etkisi bulunan mikroorganizmaların gelişmesini desteklemelidir (Slavin, 2013). Prebiyotik tüketimi, bağışıklık sistemini güçlendirir, kolonik bütünlüğü iyileştirir ve korur, bağırsak enfeksiyonlarının oluşma sıklığını ve süresini azaltabilir, sindirim fonksiyonlarını iyileştirir (Sharma ve diğ, 2012). Mikrobiyom, insan beslenmesinden enerji ve besin çıkarma yeteneğinin yanı sıra, insan bağışıklık sisteminin geliştirilmesinde önemli bir rol oynayan metabolik fonksiyonları düzenlenmesinde etkilidir. Bağırsak mikroflorası bileşimi obez-zayıf bireyleri, diyabetik-diyabetik olmayan hastaları veya alkolsüz steatohepatit gibi karaciğer hastalıklarına maruz kalmış kişileri karakterize eden bir faktördür. Diyetler, bağırsak mikroflorasını değiştirebilir ve konak dokulardaki örn. karaciğer, yağ dokusu, kas ve bağırsaktaki genlerin ekspresyonunu modüle edebilir (Delzenne ve diğ, 2011). Kompleks karbonhidratlar, bozulmadan ince bağırsaktan geçerek kalın bağırsağa ulaşır ve burada yalnızca belli mikroorganizma cinsleri tarafından kullanılabilir. Laktuloz, galaktooligosakkaritler (GOS), fruktooligosakkaritler (FOS), inulin ve inulin hidrolizatları, matlooligosakkaritlerve dirençli nişasta insan diyetinde yaygın olarak kullanılan prebiyotiklerdir. Bu karbonhidratların probiyotik mikroorganizmalar tarafından kalın bağırsaktaki fermantasyonu sonucunda oluşan başlıca ürünler kısa zincirli yağ asitleridir örn. asetat, bütirat, propiyonat, daha sonra üretilen bu yağ asitleri host hücre tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Pratikte, insan diyetinde en çok tüketilen oligosakkaritler inulin, inulin hidrolizatları ve oligofruktanlardır. Örnek verilecek olursa, inulinin fermantasyonu sonucunda oluşan kalın bağırsaktaki kısa zincirli yağ asitleri, kalın bağırsakta bulunan *Bifidobakterium* spp. cinsi bakterilerin büyümesini desteklemekte ve bağırsak mikroflorasının düzenlenmesinde yardımcı olmaktadır (Sharma ve diğ, 2012; Dai ve Chau, 2017).

2.8 Aromatik Bileşenler

Gıdanın tat, koku (aroma), ve dokusunun birleşmesiyle oluşan algı ‘lezzet’ oluşturur. Dildeki tat reseptörleri yalnızca ekşi, tatlı, tuzlu ve acı algılarken; aroma bileşikleri (koku maddeleri) çok daha fazla nitelik uyandırır ve bu nedenle ağırlıklı olarak gıdaların karakteristik lezzetinden sorumludurlar. Gıdadaki lezzet gelişimi, uçucu bileşiklerin oluşmasıyla sonuçlanan bazı reaksiyonlara bağlıdır, çizelge 2.4 uçucu madde oluşumunu destekleyen reaksiyonları göstermektedir.

Çizelge 2.4 : Uçucu madde oluşumunu destekleyen reaksiyonlar (Grosch ve diğ., 2004).

REAKSIYONLAR
Enzimatik
Ester bağlarının esteraz veya lipaz enzimleriyle hidrolizi
Doymamış yağ asitlerinin lipoksigenaz ve hidroperoksit liyaz enzimleriyle oksidasyonu
Aldehitlerin alkol hidrogenaz enzimiyle hidrojenlenmesi
Enzimatik olmayan
Glikozidlerin ve laktonların hidrolizi
Hidroksi asitlerden lakton oluşumu
Hidroperoksitlerin bozulması
Tiyol, aldehit ve keton reaksiyonları
Alkol gruplarının dehidrasyonu ve reaksiyonları

Farklı LAB cinsi bakterilerin fermantasyonuyla da tahıl bazlı içeceklerin aroma profili, duyu analizi ve asetaldehit miktarlarında büyük farklar göstermektedir. Örn. maltlanmış tahıllardan hazırlanmış bitkisel sütün, *L. plantarum*, *L. acidophilus* ve *L. reuteri* ile hazırlanan formülasyonlarında, fermantasyon sonucunda *L. plantarum* kullanılan formülasyonun duyu analiz raporuna göre daha çok kabul gördüğü bildirilmiştir (Salmerón ve diğ., 2015). Bitkisel kaynaklı ürünlerde bulunan ya da LAB fermantasyonu sırasında ara ürün olarak üretilen karbonhidrat, aminoasit ve diğer kimyasal bileşenler örn. organik asitler, yağ asitleri değişik metabolik yollar izlerler,

bu metabolik aktiviteler de spesifik organoleptik bileşenlerin oluşmasına sebep olur. Merkezde bulunan pirüvat, alt reaksiyonlar için başlangıç noktasıdır; uçucu olmayan bileşikler örn. şekerler, bazı karboksilik asitler bu içeceklerde tatlı, ekşi gibi tat bileşenlerini oluştururlar, uçucu bileşikler ise örn. alkoller, aldehitler, ketonlar, esterler ve karboksilik asitler tüketim esnasında sıvı kısımdan ayrılıp koku ve lezzet olarak algılanırlar (Peyer ve diğ, 2016).

2.9 Protein ve Biyoaktif Peptitler

Protein molekülü (polipeptit), aminoasitlerin peptit bağıyla lineer olarak bağlanmasıyla oluşur ve proteinin yapısı bu polipeptit zincirlerin çapraz bağlanma ve kıvrılmasına bağlı olarak değişmektedir, protein çeşitliliği ise aminoasit monomerlerinin çeşidine ve proteinin uzunluğuna bağlıdır. Ayrıca, protein çeşitliliği polipeptit zincirlerinin diğer moleküllere örn. yağlara, karbonhidratlara, metallere bağlanmasına da bağlıdır. Baklagil ve tahıl tanelerinin protein içeriği kütleye 8-15 % 'ni oluşturmaktadır ve besinsel olarak önemi ise insan vücundan sentezlenemeyen (esansiyel) aminoasitleri içermesinden kaynaklanmaktadır. Bu tanelerde bulunan esansiyel aminoasitlerden bazıları lizin, metiyonin, lösin, izolösindir, protein miktarının fazla olması gıdanın besinsel olarak önemini belirtirken yetersiz olmakta ve protein kalitesinden bahsetmemektedir. Protein kalitesi, besinsel önem açısından esansiyel aminoasit miktarıyla alakalı olup, polipeptitlerin hidrolize olması sonucunda oluşan esansiyel aminoasit miktarıyla alakalıdır (Bekes and Wrigley, 2016).

Gıda kaynaklı biyoaktif peptit terimi, ana proteinin dizisi içinde aktif olmayan farklı kısa amino asit zincirlerini (2-20 aminoasit) belirtir. Bu aktif peptitler gastrointestinal sistemde sindirildiğinde, gıda proseslerinde örn. olgunlaştırma, fermantasyon, pişirme sırasında, depolama sürecinde veya in vitro proteolitik enzim hidrolizleri sonucunda elde edilir (Castilla ve diğ, 2012). Özetlenecek olursa; biyoaktif peptitler (i) gıdanın fermantasyonunda kullanılan proteolitik mikroorganizmalarla, (ii) protein hidrolizatlarının üretimi sırasında, (iii) proteinlerin in vivo sindirimlerinde, (iv) proteinlerin in vitro sindirimde proteolitik enzimlerin kullanılmasıyla örn. pepsin, tripsin, alkalaz ve pankreatin elde edilir (Korhonen ve Pihlanto, 2006). Örneğin, soya sütünün fermantasyonu boyunca, proteinler oligopeptit, dipeptit, tripeptit gibi daha basit formlara dönüştürülür ve vücut fonksiyonlarında biyoaktif peptit olarak görev alırlar. Proteinlerin enzimatik hidrolizi ile kıyaslandığında, mikrobiyal fermantasyon

ucuz ve kolay bir yöntemdir, gerekli bütçe yatırımı yalnızca mikroorganizmaların gelişimi için gerekli olup, proteaz enzimleri LAB bakterilerinin hücrelerinden kolaylıkla ayrıştırılabilir (Agyei ve Danquah, 2011).

Bitkisel kaynaklı proteinler, yüksek miktarda biyoaktif peptitler içerirler, bu biyoaktif peptitlerin çoğu yaşa bağlı örn. kalp rahatsızlıkları, kanser, obezite, düşük immün sistemi gibi hastalıkların engellenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Yapılan bilimsel araştırmaların sonucunda, bitkisel proteinlerin, protein hidrolizatlarının ve peptitlerinin hayvan ve insanlarda kandaki kolesterol miktarını düşürdüğünü göstermiştir. Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda gastrointestinal sistemde emilimi gerçekleşen bazı biyoaktif peptitlerin direkt olarak hedef organa ulaştığı ve aktivitesini gösterdiğini bildirmektedir (Ruiz ve diğ, 2014).

2.10 Antioksidan Aktivite

Antioksidanlar gıda veya insan hücrelerinde oksidasyonu engelleyen moleküllerdir, gıda takviyesi olarak yaygın kullanılmaktadırlar. Antioksidan aktivite ise, antioksidanların gıdada veya insan hücresinde serbest radikalleri bağlama ve etkisiz hale getirme kapasitesidir (Chu ve Chen, 2006). Doğal antioksidanların çoğu kompleks karışımlar içerisinde bulunmaktadır, bu kompleks karışımlar içerisindeki bileşenler serbest radikaller üzerinde farklı etkilere sahip olabilirler ve/veya birbirlerini sinerjistik veya antogonistik olarak etkilemektedirler (Niki, 2010). Çeşitli rahatsızlık ve hastalıkların sebebinin oksidatif stres oluşumuyla alakalı olduğu, yakın tarihte bilim insanlarının ve halkın dikkatini çekmiştir. Dolayısıyla, birçok hastalığın önlenmesi ve sağlıklı bir yaşam tarzı sürmek için, gıda tüketimindeki antioksidan içeriği bilimsel otoriteler tarafından ana ölçütlerden biri olarak kabul edilmektedir (Niki, 2010). Sağlık etkilerinin yanı sıra, antioksidanlar gıdanın raf ömrünün korunmasında ve uzatılmasında da önemli rol oynamaktadır. Antioksidanlar, gıdada lipid oksidasyonunu önlemekte veya engellemekte böylece gıdada oluşabilecek istenmeyen aromatik bileşenlerin oluşmasını engelleyip, gıdanın besinsel değerlerini örn. protein ve vitamin bileşenlerini korumaktadır (Bamdad ve Chen, 2013).

Bitkisel kaynaklı gıdaların fermantasyonu sonucunda antioksidan aktiviteleri artmaktadır, bunun sebebi ise yapısal olarak bağlı olan flavonoidlerin bağımsız forma dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. Fermantasyon boyunca bitkisel hücre duvarları parçalanabilmekte ve sonucunda birçok biyoaktif molekülün sentezi de

yapılabilmektedir (Katina ve diğ, 2007; Đorđević ve diğ, 2010). Tahıllarda antioksidan özellik açısından dominant olan grup fenolik asitlerdir ve alt grup olarak hidrogenbenzoik asitler, hidroksisinnamik asitler olarak ayrılmaktadır. Hidroksisinnamik asit türevleri özellikle ferulik asit tahıllarda en yaygın fenolik asit çeşidi olup, hücre duvarının yapısal bileşenlerine ester veya eter bağları oluşturmaktadır. Bitkilerin hücre duvarı bileşenleri diyet lifi özelliğinde olup, en önemli fenolik asit kaynaklarından birisidir. Ferulik asit, p-kumarik asit, sinapik asit ve bazı fenolik asit dehidrodimerleri, tahıl tanelerinden elde edilen diyet lifi fraksiyonlarında saptanmıştır. Ayrıca, diyet lifi polisakkaritleri fenolik asitlere bağlı olup, kalın bağırsakta bakteriyel enzimler sayesinde serbest bırakılabilir (Guo ve Beta, 2013). Ligninolitik ve karbonhidrat metabolize edici enzimler fenolik glikozitleri hidrolize edebilmekte, oluşan serbest aglikonların antioksidan aktivitesi ise bağlı haline kıyasla daha yüksek olmaktadır (Vattem veShetty, 2003). Bitkilerin antioksidan aktivitesinin genel kaynağının polifenol, fenol içeriğiyle alakalı olduğunun bilinmesine rağmen, son zamanlarda yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarla birlikte bitkisel kaynaklı proteinlerin ve aktif peptitlerin da yüksek derecede antioksidan aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (García ve diğ, 2013).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Bitkisel Kaynaklı Süt İkameleri: Soya ve Pirinç Sütü

Bu çalışmada bitkisel süt ikamesi olarak soya ve pirinç sütü kullanılmıştır, bu ürünler market ürünleri olup Alinor Spa ® Company (Ripalta Cremasca, Italy) şirketinden tedarik edilmiştir. Ürünler Tetra Pak ® ile paketlenmiş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmektedir. Tedarik edilen soya ve pirinç sütünün başlangıç mikrobiyal yükü hedef mikroorganizma besi yerleri üzerine yayma plak yöntemi ile kontrol edilmiştir. E.coli (Lysogeny Brot, LB) 37°C, LAB (MRS 37°C), maya ve küf (Sabouraud Chloramphenicol Agar, SCA 30°C), koliform bakteri (Violet Red Bile Agar, VRBA 37°C), mezofilik mikroorganizmalar (Plate Count Agar, PCA 30°C), psikrofil mikroorganizmalar (Plate Count Agar, PCA 10°C). Analizlerde kullanılan bütün brot ve agarların markası Oxoid' tir (Basingstoke, UK.). Market ürünü olan soya sütü ve pirinç sütünün etiket bilgileri Çizelge 3.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 : Kullanılan soya ve pirinç sütünün etiket bilgileri

Soya sütü besin öğeleri	100 ml	Pirinç sütü besin öğeleri	100 ml
Enerji	36 kcal	Enerji	55 kcal
Yağ	1,7 g	Yağ	1,1 g
*Doymuş yağ	0,3 g	*Doymuş yağ	0,1 g
Karbonhidrat	1,3 g	Karbonhidrat	10,5 g
*Şeker	0,5 g	*Şeker	7,0 g
Lif	1,0 g	Lif	0,7 g
Protein	3,5 g	Protein	0,4 g
Tuz	0,05 g	Tuz	0,1 g

3.2 Probiyotik Laktik Asit Bakterisi İzolatları

Çalışmada kullanılan bütün mikroorganizma çeşitleri Bologna Üniversitesi Tarım, Gıda Bilimleri ve Teknolojileri Departman'ına (İtalya) ait kütüphaneden alınmıştır. 12

Lactobacillus ve 2 *Bifidobacterium* türü bakteri kullanılmıştır. Kullanılan bakteriler gliserol stoklardan (-20 °C) 100 µL alınıp 10 mL Brot kullanılarak canlandırılmıştır. *Lactobacillus* türlerinin canlandırılmasında Man Rogosa Sharpe (MRS) Brot, *Bifidobacterium* türlerinin canlandırılmasında MRS+ sistin (0,5 g/L) (Sigma -Aldrich, St Louis, Mo., ABD) Brot kullanılmıştır ve 37 °C 24 saat mikroaerob şartlarda inkübasyona bırakılmıştır. 1 günlük inkübasyondan sonra brotlardan 100 µL alınıp tekrar 10 mL brotlara eklenip canlandırma işlemi tekrarlanmıştır. Her bir bakteri için iki kere canlandırma işlemi yapılmıştır. Tarama kısmında kullanılan LAB türleri çizelge 3.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 : Deneyin tarama kısmında kullanılan probiyotik LAB suşları.

<i>Lb. sanfranciscensis</i> BB12
<i>Lb. helveticus</i> CNBL 1156
<i>Lb. rhamnosus</i> C1112
<i>Lb. rhamnosus</i> C243
<i>Lb. plantarum</i> 82
<i>Lb. plantarum</i> 325
<i>Lb. casei</i> LBCD1
<i>Lb. fermentum</i> PRLF
<i>Lb. plantarum</i> 98b
<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lb. plantarum</i> 6BHI
<i>Lb. fermentum</i> MRI 3

3.3 Örneklerin Hazırlanması ve Fermantasyon

Çalışmanın birinci ve ikinci kısmında da fermantasyon Wang ve diğ., tarafından uygulanan prosedüre bazı eklemeler yapılarak uygulanmıştır. Gliserol stoklarından 2 kere yenilenerek alınan LAB türleri, türlerine göre MRS ve MRS+Sistin içerisinde bir kez daha canlandırılıp 12 saat 37 °C, mikroaerob şartlarda inkübe edilmiştir (2002). 12 saatin sonunda brotlardan 1 mL alınıp 600 nm optik yoğunluklarına bakılmıştır, 0.8-1 absorbans değerinde optik yoğunluğu olan LAB türleri fermantasyonda kullanılmıştır. Hazır olan brotlardan 1 mL alınıp 10 dk 13000 RPM santrifüj işlemi uygulanmıştır,

pelet 1 mL NaCl 1% (w/v) solüsyonuyla yeniden çözdürülüp 5 min 13000 RPM santrifüj uygulanmıştır ve pellet yine tuz solüsyonuyla yıkanmış bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır. Final pelet 1 mL tuz solüsyonuyla çözdürülmüş ve inokülasyon için hazır hale getirilmiştir. LAB türlerinin süt örneklerine inokülasyonu 1 % (v/v) olarak belirlenmiştir ve fermentasyon 37 °C, 24 s mikroaerob şartlarda yapılmıştır (Ai ve diğ, 2015). Çalışmanın birinci kısmında soya sütü ve pirinç sütü ayrı ayrı çalışılmıştır, ikinci kısımda ise birinci kısımda belirlenen 2 *Laktobacillus* spp. ve 2 *Bifidobacterium* spp. suşları tekli veya kokteyl olarak hazırlanan süt karışımlarına eklenmiştir. Çizelge 3.3’ de deneyin ikinci kısmında kullanılacak olan süt karışımlarının oranları gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 : Deneyin ikinci kısmında kullanılacak olan süt karışımları oranı.

Süt Karışımları	Oran
SR25	25% Soya sütü + 75% Pirinç sütü
SR50	50% Soya sütü+ 50% Pirinç Sütü
SR75	75% Soya sütü+ 25% Pirinç sütü

3.4 Mikrobiyal Ölçümler

3.4.1 Optik Yoğunluk

Bitkisel sütlere eklenecek mikrobiyal inokülasyon miktarına inkübe edilmiş brotların optik yoğunluklarına bakılarak karar verilmiştir. Bu amaçta 6705 UV/Vis. Spektrofotometre (Jenway, UK) kullanılmış ve 600 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Absorbans değerleri 0,8-1 abs den fazlaysa eğer, MRS veya MRS+sis brotla seyreltme yapılmış ve Denklem 3.1 kullanılmıştır.

Denklem 3.1

$$\frac{C1 \text{ (brotun absorbans değeri)}}{V1 \text{ (volume örneğin hacmi)}} = \frac{0,9 \text{ (istenilen absorbans değeri)}}{V2}$$

3.4.2 Yüzeğe yayma plak yöntemi ile sayım

Mikrobiyal gelişme “koloni oluşturan birim; kob/mL” olarak, inoküle ve inkübe edilmiş süt örneklerinin *Laktobacillus* suşları için MRS agar, *Bifidobacterium* suşları için MRS+sis agar üzerine yayma plak yöntemiyle 10 luk seri dilüsyonlar hazırlanmış örneklerden ekim yapıp, 37 °C, 24 s mikroaerob şartlarda inkübe edilen petrilerin sayımı yapılır ve log kob/mL olarak ifade edilmiştir (Ai ve diğ, 2015).

3.5 pH ölçümleri

Çalışmanın birinci ve ikinci kısmında da pH ölçümleri Basic 20 (Crison Instruments, Barcelona, Spain) pH metre ile 3 tekrarlı yapılmıştır.

3.6 Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS analizi birinci ve ikinci kısımda da 24 saat fermantasyona bırakılmış süt örneklerinin protein profilini anlamak için yapılmıştır, kontrol olarak pirinç sütü, soya sütü ve 25% 50% 75% bitkisel süt karışımları kullanılmıştır. Deneyin birinci kısmında kullanılan örnekler 70% lik trikloroasetik asit (TCA) ile çöktürülüp, 5 dk buz içerisinde bekletildikten sonra 14000 RPM, 5 dk santrifüjlenmiştir. Daha sonra pelet hazırlanan tampon çözelti ile tekrar askıya alınmıştır ve 5 dk 100 °C su banyosunda bekletildikten sonra jellere yüklenmiştir. Deneyin ikinci kısmında ise, süt örnekleri vortekslenip 20 µL filtrasyon şırınga ile uygulanıp, su banyosunda 5 dk 100 °C su banyosunda bekletildikten sonra jellere yüklenmesi gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE protokolünde jeller Çizelge 3.4 deki gibi hazırlanmıştır. fermente edilmiş sütler ve kontrol olarak kullanılacak sütler için, resolving jel 16% akrilamid/Bis (37.5:1, 40%) konsantrasyonunda ve stacking jel 4% akrilamid/Bis (37.5:1, 40%) konsantrasyonunda hazırlanmıştır (Sigma -Aldrich, St Louis, Mo., ABD). Hazırlanan jeller örneklerin yüklenmesinden sonra 100 V sabit voltaj ile Bio-Rad PowerPac 3000 (Bio-Rad, US) yürütülmüştür ve standart olarak Precision Plus Protein TM All Blue Standard (Bio-Rad, US) kullanılmıştır.

Çizelge 3.4 : SDS jellerinin formülasyonu.

Materyal	Resolving Jel 16%	Stacking Jel 4%
Saf su	3,54 mL	5,98 mL
Akrilamid/Bis (40% 37.5:1)	8,54 mL	0,85 mL
Tris HCl 1 M (pH 8.8)	7,5 mL	1 mL
SDS 10%	200 µL	80 µL
APS 10%	200 µL	80 µL
TEMED	20 µL	10 µL

3.7 Antioksidan Aktivite

Antioksidan aktivite Marecek ve diğ., 2017 tarafından uygulanan ABTS+ metotuna bazı değişiklikler yapılarak ölçülmüştür. Katyon radikal ABTS+ solüsyonu, 10 mL ABTS solüsyonun (Sigma -Aldrich, St Louis, Mo., ABD) 7 mmol, 20mM CH₃COONa (Sigma -Aldrich, St Louis, Mo., ABD) pH 4,5 ile karıştırıldıktan sonra karışımdan 9 mL alınmış, ve 9 mL 2,45 mM K₂S₂O₈ (Sigma -Aldrich, St Louis, Mo., ABD) ile tekrar karıştırılmıştır, final ABTS+ reaktifi bu karışımın 12-16 saat karanlıkta bekletilmesinden sonra elde edilmiştir. ABTS+ reaktifi asetat tampon çözeltisi (250 ml of 20 mM CH₃COONa pH 4,5) ile seyreltilmiştir ve absorbans değeri 734 nm dalga boyunda 0.700 ± 0.01 abs olacak şekilde ayarlanmıştır. Antioksidan aktivitesi ölçülecek örneklerin spektrofotometrik ölçümleri için; Örnekler 10 µl örnek + 190 µl seyreltilmiş ABTS+ solüsyonu kullanılmıştır ve her örnek için sonuçlar 3 kere tekrarlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi ise 10 µl Askorbik asit (Sigma -Aldrich, St Louis, Mo., ABD) için konsantrasyon aralığı 0-600 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Beyaz kontrol olarak 10 µl su ve 190 µl seyreltilmiş ABTS+ kullanılmıştır. Absorbans değerleri örneklerin karanlık ortamda 30 dakika bekletilmesinden sonra plaka okuyucu Tecan Spark 10M (Tecan, Switzerland) kullanılarak 734 nm de ölçülmüştür. Örneklerin antioksidan değerleri µ eşdeğer gram Askorbik Asit/ml (µg AA eq/ml) olarak yorumlanmıştır ve bu değer plakalardaki renk değişimlerinin beyaz kontrole göre absorbanslarının farkıyla denklem (3.2) ile hesaplanmıştır.

Denklem 3.2

$$\text{Azalma (A) } 734 \text{ nm(30 dk)} = 1 - \frac{\text{A örnek (734 nm)}}{\text{A beyaz (734 nm)}}$$

3.8 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde varyans analizleri metodu olan ANOVA kullanılmıştır ve sonuçlar arasındaki farklılıklar Duncan's New Multiple Range Test ($p < 0.05$) ile yorumlanmıştır. Bu amaçta SPSS programı kullanılmıştır ve örneklerin pH, mikrobiyal büyüme ve antioksidan aktivitelerinin farklılıkları istatistiksel olarak yorumlanmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Birinci (Tarama) Kısım Bulguları

4.1.1 LAB türlerinin soya sütü ve pirinç sütü içerisindeki zamana bağlı pH etkileri

Test edilen bütün LAB türleri ayrı ayrı olarak soya sütünde ve pirinç sütünde gelişme göstermiş olup, bu bitkisel sütlerin LAB fermantasyonu sonucunda pH değerlerinin düştüğü gözlemlenmiştir. Soya sütünün 25 °C deki pH değeri ortalama 7,17 ve pirinç sütünün ortalama pH değeri 7,30 değerinde ölçülmüş olup, literatür taraması sonucunda karar verilen bütün LAB türleri ile soya sütü ve pirinç sütünün 24 saat 37 °C de fermantasyonun sonucunda pH değerlerini soya sütünde 4,20; pirinç sütünde ise 3,5 değerlerine kadar düştüğü gözlemlenmiştir. Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4 LAB türlerinin fermantasyonu sonucunda pirinç sütü ve soya sütündeki pH değişimlerini ve istatistiksel olarak farklılıklarını $p < 0,05$ göstermektedir. İstatistiksel olarak her bir LAB türünün soya sütü ve pirinç sütü içerisinde 6. ve 24. saatteki pH düşürme aktiviteleri kıyaslandığında pH değerlerinin birbirinden farklı olduğu gözlemlenmiştir. Her bir LAB türünün zamana ve süt çeşidine göre pH üzerine etkileri Ek'A da gösterilmiştir.

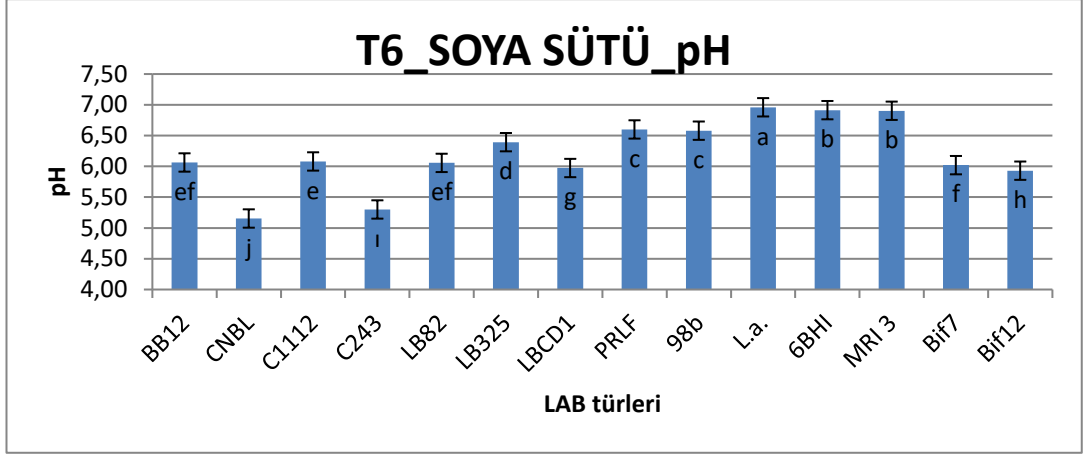
Her iki bitkisel sütün de probiyotik LAB bakterileriyle fermantasyonu sonucunda, her bir bakterinin pH değerine etkisi 6. Saatte istatistiksel olarak farklılık göstermektedir ($p < 0,05$). Ayrıca her bir zaman aralığı ve bitkisel süt çeşidi düşünüldüğünde, pirinç sütünün 24 saatlik fermantasyonu sonucunda en düşük pH değeri gözlemlenmiştir. Pirinç sütündeki 24 saatlik pH değerlerinin soya sütünün aynı bakterilerle olan fermantasyonlarından pH değerlerinin daha düşük olmasının sebebi pirinç sütünün formülasyonundaki karbonhidrat/şeker içeriğinin fazla olmasından kaynaklanıyor olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, *Lb. plantarum* suşlarının 24 saatlik fermantasyonun pirinç sütü ve soya sütü içerisindeki pH düşürme etkisi diğer LAB türlerine göre daha fazladır. Manini ve arkadaşları pH değeri 6,3 olan buğday kepeğinin 13 farklı LAB suşunu başlangıç popülasyonu 7.8 log kob/ml olacak şekilde inoküle etmişlerdir, 8

saatlik fermantasyon sonucunda bütün LAB suşlarının ortalama 2,7 log kob/ml civarında gelişmesinde artış gösterdiği ve pH değerlerinin 5,6-4,0 arasında değiştiği gözlemlenmiş olup en düşük pH değerleri *Lb. plantarum* suşlarının kullanımıyla elde edilmiştir (2016).

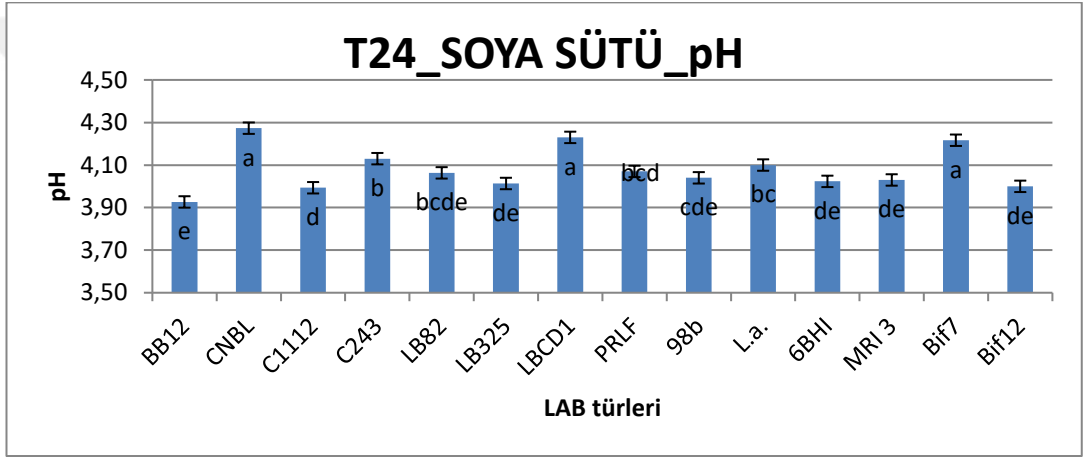
Bunun sebebi *L. plantarum* suşlarının amilolitik etkisinden kaynaklandığı düşünülebilir, amilolitik enzim aktivitesi sonucunda fermente edilebilir şeker miktarı artmaktadır. Songre ve diğ. *L. plantarum* suşlarının potansiyel amilolitik enzim aktivitelerini darı fermantasyonu sonucunda ürettikleri yüksek laktik asit miktarı ile raporlamışlardır (2009).

Soya sütünün LAB türleriyle fermantasyonu sonucunda *Lb. helveticus* CNBL ve *Lb. rhamnosus* C243 6. saatte en düşük pH değerine sahip inokülumlardır ve diğer türlerin soya sütü içerisindeki pH değerleri 6-6,50 arasındayken, bu türler pH değerini 5,30 un altına düşürmüşlerdir. Çalışmada bulunan bu sonucun aksine, Santos ve diğ., 2014 ve Champagne ve diğ., 2009 yaptıkları çalışmalarda *Lb. rhamnosus* suşlarının soya sütü fermantasyonunda pH düşürme etkilerinin az olduğunu belirtmişlerdir. Sonuçlar arasındaki bu farklılığın sebebinin bu tez çalışmasında kullanılan soya sütünün ticari bir ürün olup, formülasyonuna ve üretim sırasındaki fiziksel, kimyasal değişimlere uğradığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

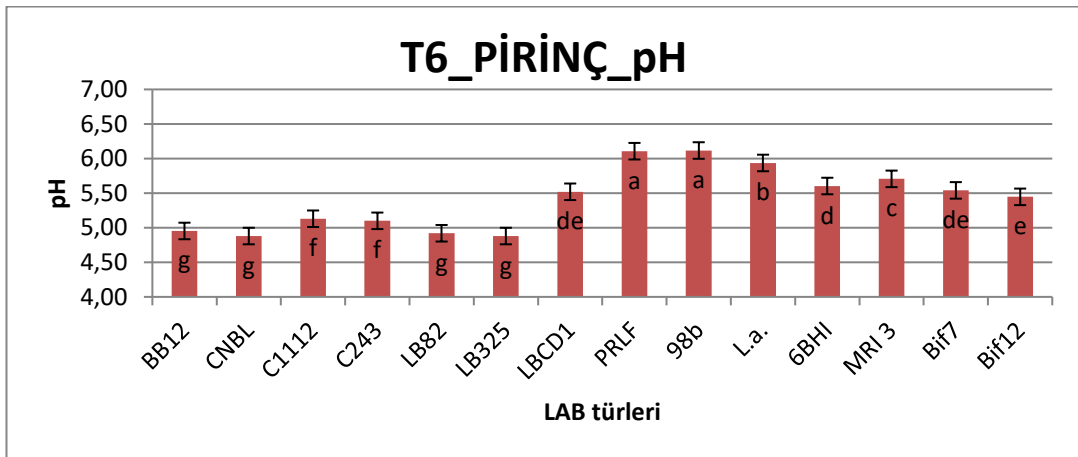
Soya sütünün ve pirinç sütünün LAB türleriyle fermantasyonun 24. saatindeki pH değerleri arasındaki istatistiksel olarak benzerlikler artmıştır. Her iki süt ortamında da LAB türlerinin fermantasyonun 6. ve 24. saatteki pH değerlerine bakıldığında, starter kültür kararının verilmesinde ilk 6 saatteki pH değişimlerinin dikkate alınması gerektiği bulunmuştur. Ayrıca gıda endüstrisi her zaman enerji tasarrufu kontaminasyonun engellenmesi, ve üretimin hızlanması açısından kısa süreli fermantasyonu tercih etmektedir (Matejcekova et al., 2017).



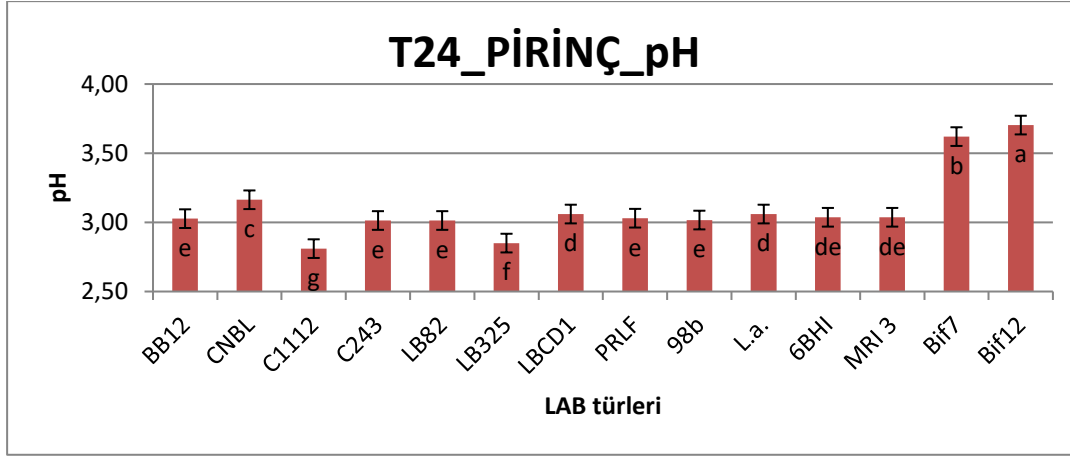
Şekil 4.1 : LAB türlerinin soya sütü fermantasyonunun 6. saat pH değerlerine etkisi ($p < 0,05$).



Şekil 4.2 : LAB türlerinin soya sütü fermantasyonu sonucundaki 24. saat pH değerlerine etkisi ($p < 0,05$).



Şekil 4.3 : LAB türlerinin pirinç sütü fermantasyonu sonucundaki 6. saat pH değerlerine etkisi ($p < 0,05$).



Şekil 4.4 : LAB türlerinin pirinç sütü fermantasyonu sonucundaki 24. saat pH değerlerine etkisi ($p < 0,05$).

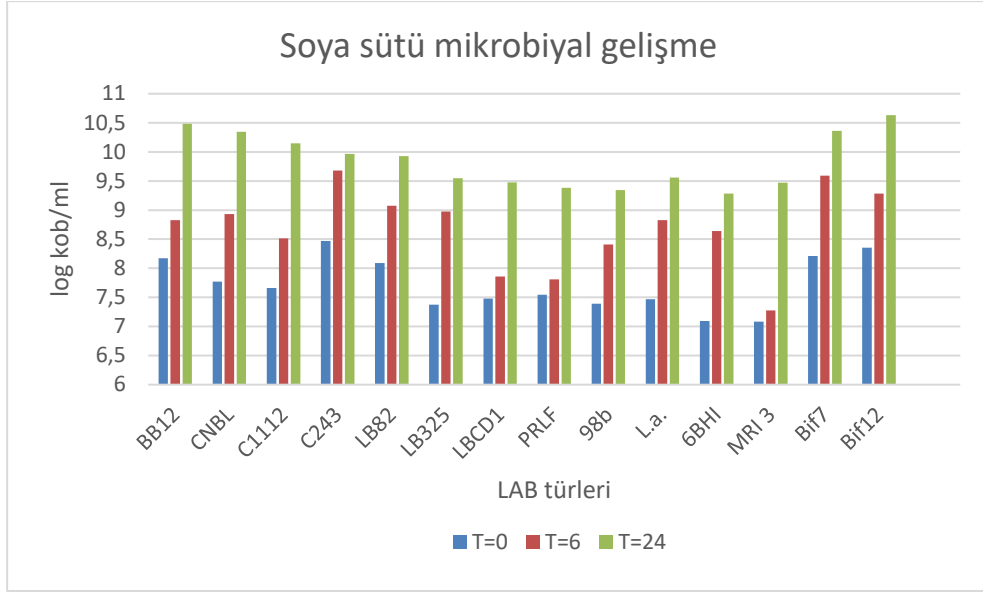
4.1.2 LAB türlerinin soya sütü ve pirinç sütü içerisindeki zamana bağlı gelişimleri

Laktik asit bakterilerinin inokülüm miktarına optik yoğunluklarına bakılarak karar verilip, 0,9 abs' ye sahip LAB Lactobacilluslar uygun saflaştırılmalar sonucunda bitkisel sütlerin fermantasyonunda kullanılmış olup, LAB türlerinin soya sütü ve pirinç sütüne ait mikrobiyal yükleri 0, 6 ve 24. saate göre uygun besi yerlerine yayma plak yöntemiyle (Bifidobakteriler için MRS+sis agar, Laktobasililer için MRS agar) yapılmış, ve plakaların 37 ° C de 24 saatlik inkübasyonu sonucu sayımlarının log kob/ml birimindeki grafikleri şekil 4.5 ve 4.6 da gösterilmiştir, şekillerden görüleceği üzere, her iki süt ortamında da her inokülüm için 0, 6, 24 saatler arasında mikrobiyal yük artmıştır. Mikrobiyal yüklerin sıfırinci saat sonuçlarına göre LAB bakterileri soya ve pirinç sütüne en az 7 log kob/ml olarak eklenmiştir ve her bir LAB türü her iki süt içerisinde de en az 1 log kob/ml gelişme göstermiştir. Santos ve Schwan yer fıstığı-soya sütünün fermantasyonunda *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lc. Lactis* ve *Lb. bulgaricus* kullanmış ve başlangıç olarak her bir tür 7 log kob/ml inoküle edilmiştir, LAB türleri 24 saatlik fermantasyon sonucunda gelişimleri en az 8 log kob/ml gözlemlenmiştir (2014). Yine LAB türlerinin soya sütünün fermantasyonunda kullanılmasıyla ilgili yapılan bir deneyde Zhao ve Shah *Lb. acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. zaeae*, ve *Lb. rhamnosus* türlerini fermantasyonda kullanmış ve bu türlerin 24 saatlik fermantasyon sonucunda sayılarında en az 1,3-1,4 log kob/ml artış ve pH değerlerinde ise 6,70 den 4,55 düşüş gözlemlenmiştir (2014).

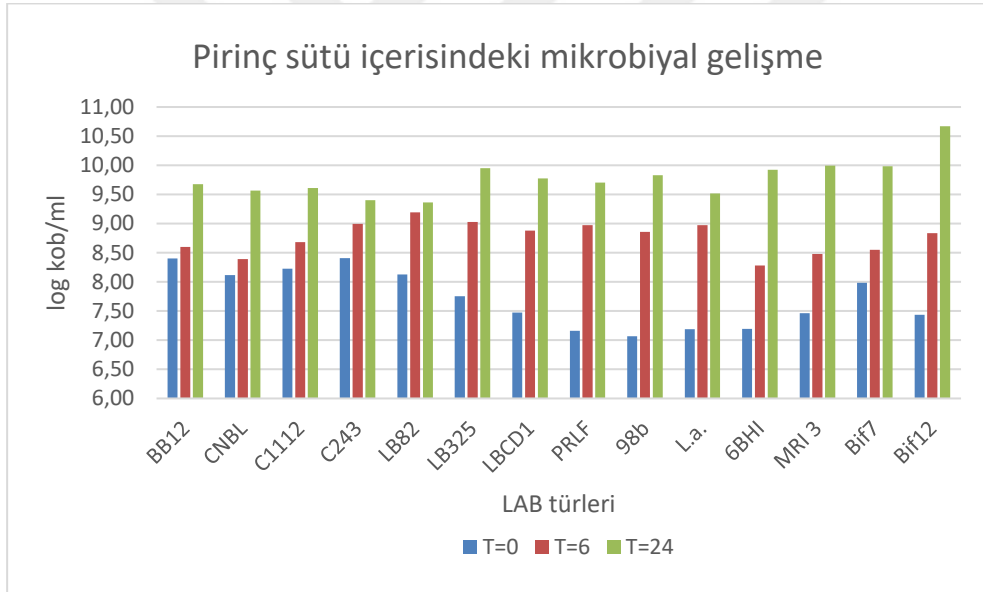
Mikroorganizmaların 0. ve 24. saat yüklerine bakılıp aradaki fark yüzde olarak ifade edildiğinde soya sütünde *Lb. helveticus* CNBL inokülümünün gelişmesindeki artış 24

saatlik fermantasyon sonucunda 33% olmuştur ve soya sütündeki en yüksek mikrobiyal gelişmeyi göstermiştir, en düşük mikrobiyal gelişmeyi ise 14,26 % ile *Lb. rhamnosus C243* göstermiştir. Pirinç sütünde ise, *Bifidobacterium longum B12* en yüksek mikrobiyal gelişme göstermiştir 43% pH değeri düşünülduğünde 24 saatlik fermantasyon sonucunda pirinç sütündeki en yüksek pH yine *B.longum B12* fermantasyonunda gözlemlenmişti ve yine *Lb. rhamnosus C243* 12% lik artışla en düşük aktiviteyi göstermiştir. *Lb. rhamnosus C243* ün iki süt ortamında da ilk 6 saatteki pH düşürme etkisi düşünülduğünde, gelişme oranının düşük olmasının sebebi düşük pH değerinden kaynaklanabilir, bu sonuç Marazza ve diğ. tarafından da desteklenmektedir, soya sütünün *Lb. rhamnosus* ile 24 saatlik fermantasyonu sonucunda pH değerinin 4,5 in altına düştüğünde mikrobiyal gelişmenin düştüğünü de bildirmişlerdir (2009). Ayrıca Wang ve diğ. göre de, soya sütünde mikrobiyal gelişmedeki düşüş ve ortamın pH değerindeki düşüş arasında bir kolerasyon olduğunu ve asit üretiminin artmasının laktobasili ve bifidobakterilerin gelişmesinde düşüşe sebep olduğunu bildirmişlerdir (2002). İki çalışmanın ve bu deneyden elde edilen sonuçlara göre *Lb. rhamnosus C243* gelişiminin ortam pH değerinden etkilendiği çıkarımı yapılabilmektedir. Fakat pH değerinin her iki süt ortamında da 24 saatlik fermantasyon sonucunda en çok 4,5 in altına düşmesine rağmen, mikrobiyal yükler bütün türler için her iki ortamda da en az 9 log kob/ml olarak bulunmuştur.

Fonksiyonel gıdalardan sağlık yararları elde edebilmek için, uygulanabilir probiyotik suşların muhafaza edilmesi ve büyümesinin desteklenmesi beklenmektedir, ayrıca ürünlerin son kullanma tarihlerinde minimum 10^6 kob/ ml düzeyinde (veya g-1) probiyotik suş içermeleri gerekmektedir (Matejekova et al., 2017). Bu tez çalışmasında kullanılan probiyotik LAB türlerinin her iki süt çeşidinde de mikrobiyal gelişme göstermesi ve 24 saatlik fermantasyon sonucunda kullanılan probiyotik suşların sayısının en az 9 log kob/ml olarak gözlemlenmesi bu suşların soya ve pirinç sütlerinin fermantasyonunda, veya bu ürünlerin kullanımıyla yeni üretilebilecek içeceklerin tasarımına elverişli türler olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5 : LAB türlerinin soya sütü fermantasyonundaki 0, 6 ve 24. saatteki mikrobiyal gelişmeleri.



Şekil 4.6 : LAB türlerinin pirinç sütü fermantasyonundaki 0, 6 ve 24. saatteki mikrobiyal gelişmeleri.

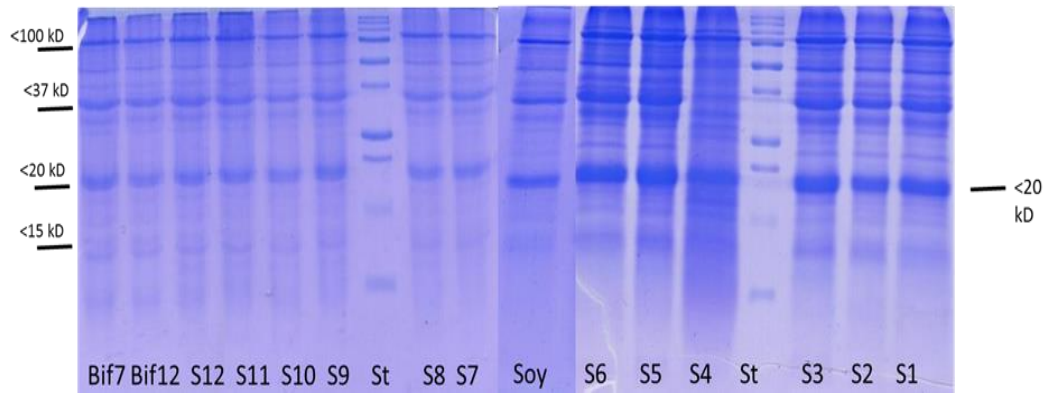
4.1.3 LAB türlerinin soya sütünün ve pirinç sütünün protein/peptit profillerine etkisi

Kontrol olarak soya sütü ve pirinç sütünün (sıfıncı saat) kullanıldığı ve 24 saatlik fermantasyon sonucunda 14 probiyotik LAB suşlarının bitkisel sütünün protein/peptit profiline etkileri SDS- Jel ile şekil 4.7 ve 4.8 de gösterilmiştir. Örneklerin SDS-jellere yüklenmeden önceki protein saflandırma basamağında 70% lik trikloroasetik asit (TCA) kullanılmış ve çözünür çözünür olmayan bütün protein/peptitlerin görülmesi hedeflenmiştir. Kontrol pirinç ve soya sütünün LAB türleriyle fermente edilmiş soya,

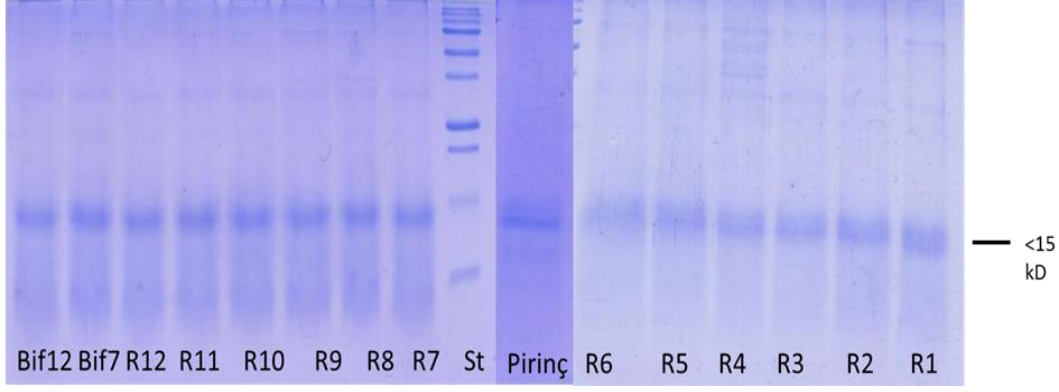
pirinç sütleri kıyaslandığında protein/peptit profillerinde, soya sütünün *Lb. rhamnosus* C243 ile fermantasyonu dışında, bir fark gözlemlenmemiştir. *Lb. rhamnosus* C243 ile fermente edilmiş soya sütünün SDS-Jel profile incelendiğinde molekül ağırlığı 20 kDa'dan küçük olan bantlarda sıklaşma ve koyulaşma gözlemlenmiştir, bunun anlamı molekül ağırlığı 20 kDa'dan küçük protein/peptit yoğunluğunun artmasıdır. Solieri ve diğ. yaptığı çalışmada inek sütünün 39 farklı LAB suşuyla fermantasyonu sonucunda çalıştıkları suşlar arasında *Lb. casei* PRA205 ve *Lb. rhamnosus* PRA331 suşlarının proteolitik aktivitelerinin en yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (2015).

Ayrıca, soya sütüne ve pirinç sütüne ait SDS-Jeller kıyaslandığında bant yoğunluğu ve sıklığının birbirinden çok farklı olduğu gözlemlenmektedir, birbirinden çok farklı protein/peptit içeriğine sahip bu iki sütün aynı zamanda formülasyondaki protein miktarları da birbirinden farklıdır, pirinç sütünün protein miktarı 0,4 g iken soya sütünün protein miktarı 3,5 g olarak etiket bilgilerinde verilmiştir.

Kontrol olarak kullanılan veya fermente edilmiş soya sütlerinin SDS-Jel profiline bakıldığında, protein-peptit bantlarının genellikle 20 kDa'dan sonra başladığı ve 37 kDa'dan sonra bant sayısının sıklaştığı görülürken, kontrol ve fermente pirinç sütlerinde protein/peptit bantları 15 kDa'dan küçük gözlemlenmektedir. Pirinçte bulunan ana proteinler glutelinler ve prolaminlerdir, major protein olan glutelin 80% olarak bulunurken 5-10% prolamin bulunmaktadır ve molekül ağırlıkları glutelin için 24-36 kDa olarak değişirken prolamin molekül ağırlıkları 13-16 kDa arasında değişmektedir (Wang ve diğ, 2016; Bekes, 2016).



Şekil 4.7 : LAB türlerinin fermantasyonun soya sütünün SDS-Jel protein/peptit profiline etkisi. S1= *Lb. sanfranciscensis*; S2 = *Lb. helveticus*; S3 = *Lb. rhamnosus*; S4 = *Lb. rhamnosus*; S5 = *Lb. plantarum*; S6 = *Lb. plantarum*; S7 = *Lb. casei*; S8 = *Lb. fermentum*; S9 = *Lb. plantarum*; S10.= *Lb. acidophilus*; S11= *Lb. plantarum*; S12 = *Lb. fermentum* MRI3; Bif12 = *Bifidobacterium longum* 12; Bif7 = *B. bifidum* 700795 St=protein standart



Şekil 4.8 : LAB türlerinin fermantasyonun piriñ sütünün SDS-Jel protein/peptit profiline etkisi. R1= *Lb. sanfranciscensis*; R2 = *Lb. helveticus*; R3 = *Lb. rhamnosus*; R4 = *Lb. rhamnosus*; R5 = *Lb. plantarum*; R6 = *Lb. plantarum*; R7 = *Lb. casei*; R8 = *Lb. fermentum*; R9 = *Lb. plantarum*; R10= *Lb. acidophilus*; R11= *Lb. plantarum*; R12 = *Lb. fermentum MRI3*; Bif12 = *Bifidobacterium longum 12*; Bif7 = *B. bifidum 700795*, St=protein standart

Kontrol olarak kullanılan piriñ sütünde glutelin proteinlerine ait bantlar gözlemlenmemiştir (molekül ağırlığı 24-36), ve bunun sonucunda piriñ sütü prosesinde bu proteinin kaybolduğu yorumu yapılabilmektedir. Bitkisel kaynaklı süt üretimi prosesinde bazı enzimler örn. proteaz, lipaz, amilaz vb. kullanılmaktadır, pH düzenlemeleri ve UHT sterilizasyonu (140-150 °C, 2 sn) uygulanmaktadır (Bernat ve diğ., 2014). Sonuç olarak, piriñ sütü üretimi sırasında kullanılan proteaz enzimi veya UHT sterilizasyonu glutelin içeriğinin kaybolmasına sebep olmuş olabilir.

4.1.4 Deneyin ikinci kısmında kullanılacak LAB türlerinin belirlenmesi

Deneyin ikinci kısmında kullanılacak olan inokülömler, birinci kısımda soya ve piriñ sütüne inoküle edilen 12 Laktobasili türünden elde edilen 6. ve 24. saatlerdeki pH düşürme ve mikrobiyal gelişme aktivitelerine göre belirlenmiştir. Birinci kısımda da kullanılan 2 Bifidobakteri türünün kullanımına ise bu değerlendirmelere bakmaksızın seçilen Laktobasili türleriyle kokteyl olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Soya sütü içerisindeki LAB türlerinin 6. saat mikrobiyal yükleri kıyaslandığında, *Lb. rhamnosus C243*, 24. saat mikrobiyal yükleri kıyaslandığında *Lb. sanfranciscensis BB12* en yüksek aktiviteyi gösterirken, pH değerleri için 6. saatte ve 24. saatte *Lb. helveticus CNBL* en düşük pH aktivitesini göstermiştir. Piriñ sütü içerisinde ise 6. saatte *Lb. plantarum LB82* ve 24. saatte *Lb. plantarum LB325* en yüksek mikrobiyal yük değerlerini gösterirken pH değerleri için 6. saatte *Lb. helveticus CNBL* ve *Lb. plantarum LB325*, 24. saatte *Lb. rhamnosus C243* ve *Lb. rhamnosus C1112* en düşük pH değerlerini göstermiştir. Sonuç olarak, karar verilen Laktobasili türleri; *Lb.*

rhamnosus C243 ve *Lb. helveticus* CNBL dir. Deneyin ikinci kısmında kullanılacak inokülümün listesi Çizelge 4.1. de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 : Deneyin ikinci kısmında kullanılacak olan inokülümünler.

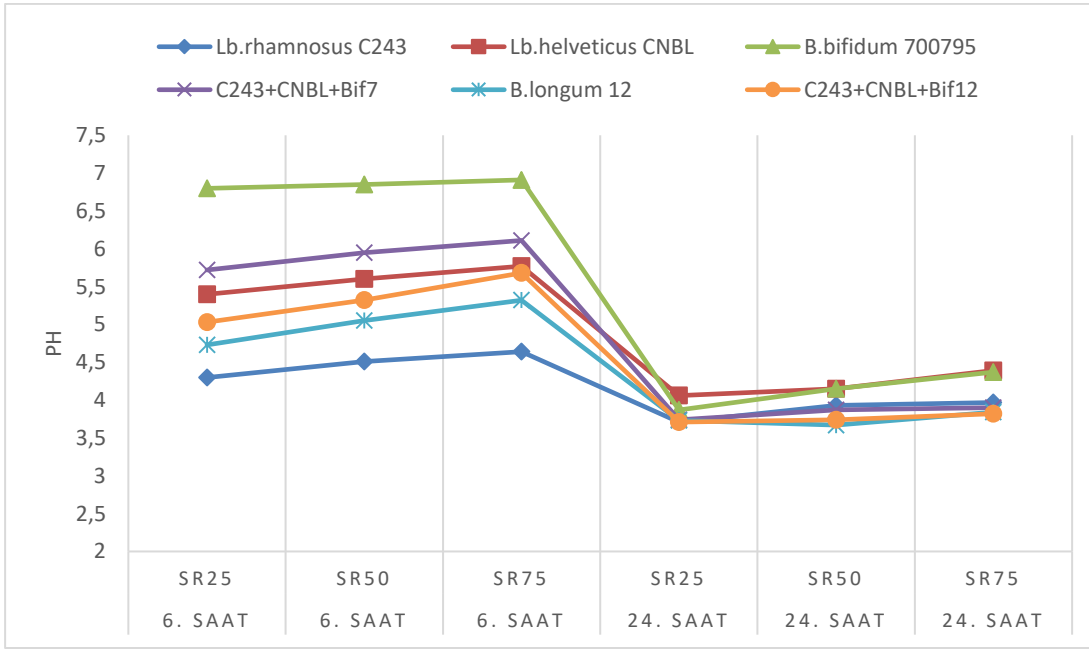
Inokülümünler
<i>Lb. rhamnosus</i> C243
<i>Lb. helveticus</i> CNBL
<i>B. bifidum</i> 700795
Kokteyl 1: <i>Lb. rhamnosus</i> + <i>Lb. helveticus</i> + <i>B. bifidum</i> 700795
<i>B. longum</i> B12
Kokteyl 2: <i>Lb. rhamnosus</i> + <i>Lb. helveticus</i> + <i>B. longum</i>

4.2 Deneyin İkinci Kısım Bulguları

4.2.1 LAB türlerinin bitkisel süt karışımları içerisindeki tekli ve kokteyl inokulasyonlarının mikrobiyal gelişimleri ve pH değerlerine etkisi

Tekli veya kokteyl olarak bitkisel süt karışımlarına inoküle edilen probiyotik LAB suşlarının bütün bitkisel süt karışımlarında (SR25, SR50, SR75) 24 saatlik inkübasyon sonucunda pH değerleri 3,86-4,38 değerleri arasında gözlemlenmiştir. Şekil 4.9 süt karışımlarının değişen inokülümünlere göre pH değerlerini 6. ve 24. saatte göstermektedir. Bütün bitkisel süt karışımlarında, 6. saat pH değerleri her bir inokülüm için kıyaslandığında *B. bifidum* 700795 ile fermente edilen süt karışımlarının pH değerlerinin en yüksek olarak bulunmuş ve en düşük pH değerleri ise *Lb. rhamnosus* C243 suşunun kullanımıyla gözlemlenmiştir. Ayrıca istatistiksel olarak inokülümünlerin hepsi süt karışımlarının içerisinde pH değerleri açısından farklı bulunmuştur $p < 0,05$ fakat 24 saatlik fermantasyon sonucunda fermente süt karışımlarının pH değerlerindeki benzerlik istatistiksel olarak artmıştır. Her bir bitkisel süt karışımı içerisindeki inokülümünlerin pH üzerindeki etkisinin 6. ve 24. saatteki değişimlerini gösteren grafikler Ek A' da gösterilmektedir. Süt karışımlarının tekli veya kokteyl olarak kullanıldığı 24 saatlik fermantasyon sonucunda, SR25 süt karışımı için *Bifidobacterium longum* 12, SR50 ve SR75 süt karışımları içinse *Lb. rhamnosus* C243+ *Lb. helveticus* CNBL+ *Bifidobacterium longum* 12 (kokteyl 2) en düşük pH değerini göstermiştir. Her bir inokülüm için pH değerleri süt karışımlarına ve zamana göre (6. ve 24. saat) göre kıyaslandığında, bütün inokülümünler en yüksek pH değerini 6. saat ölçümleri için SR75 süt karışımında gösterirken, en düşük pH değerlerini SR25

süt karışımında 24. saatteki ölçümlerinde göstermişlerdir. Mikrobiyal gelişme bütün süt karışımları ve inokülüm için kıyaslandığında 24 saatlik fermantasyon sonucunda inokülüm süt karışımları farketmeksizin 9,46-10,28 log kob/ml arasında gelişme göstermiştir. Şekil 4.10' da süt karışımlarının zamana göre mikrobiyal etkisi gösterilmektedir. Şekil 4.10 dan da anlaşılacağı üzere, mikrobiyal gelişmeler de süt karışımlarının oranlarının veya kullanılan inokülümün çok farklı sonuçlar ortaya çıkartmadığı gözlemlenmiştir. Böylece kullanılan her inokülümün probiyotik içecek tasarımında kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu gözlemlenmiştir.



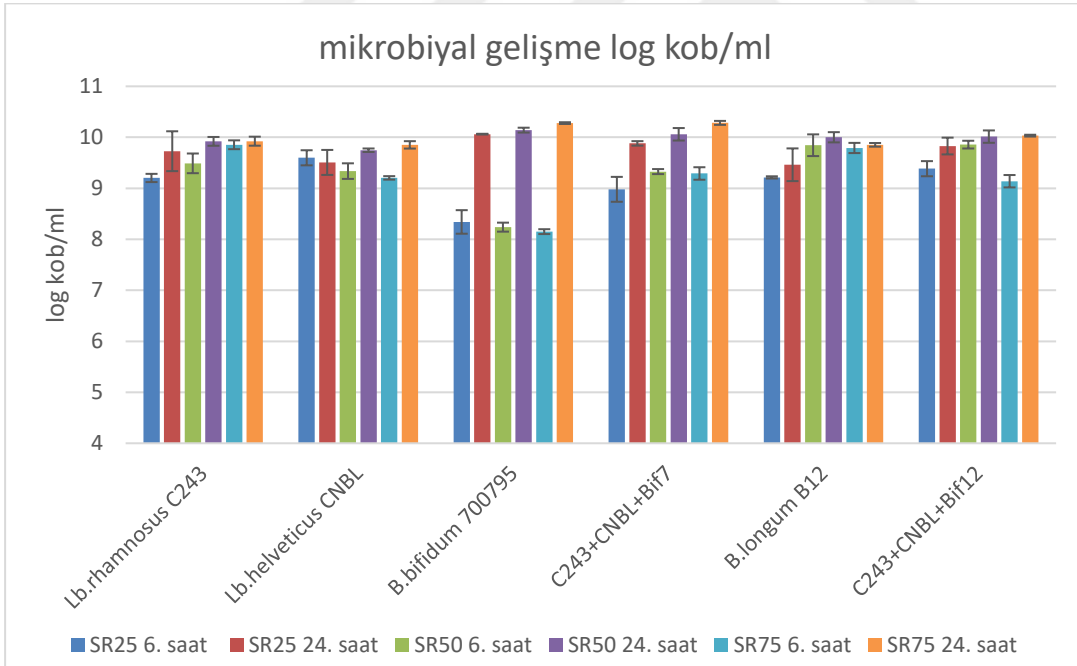
Şekil 4.9 : Bitkisel süt karışımlarının fermantasyonunun 6. ve 24. saatlerindeki pH değerleri

Bütün süt örneklerinde mikrobiyal gelişme 6. saat için kıyaslandığında, *B. bifidum* 700795 6 saatlik fermantasyon sonucunda tüm süt karışımlarında 8,2 log kob/ml civarında en düşük gelişmeyi gösteren inokülümdür ve karışımların oranlarından etkilenmemiştir. Gibson ve Wand yaptıkları çalışmalar sonucunda 8 *Bifidobacterium* türünden yalnızca *B. bifidum* türünün ortamdaki oligofruktoz miktarından etkilenmediğini gözlemlenmişlerdir. Aynı oran süt karışımlarında, *B. bifidum* 700795 nin tekli inokülümünün, *B.bifidum* 700795 içeren kokteyl inokülümü (*Lb.rhamnosus* C243 +*Lb. helveticus* CNBL+ *B.bifidum* 700795) mikrobiyal gelişme açısından kıyaslandığında 6. saatte kokteyl inokülümünün mikrobiyal gelişmesi neredeyse 1 log kob/ml tekli inokülümden daha fazladır ve pH düşüşü kokteyllerde daha fazla gözlemlenmiştir fakat 24. saat sonunda kokteyl inokülüm süt karışımları içerisinde

10,06-10,27 mikrobiyal gelişme göstermiş olup tekli inokülüm arasında büyük bir fark gözlemlenmemiştir. Aynı süt karışımlarında, *B.longum 12* tekli inokülümünün, kokteyl inokülüm (*Lb.rhamnosus C243 + Lb. helveticus CNBL+ B.longum 12*) ile pH ve mikrobiyal gelişim açısından kıyaslandığında ilk 6 saatte pH değeri kokteyl inokülümde daha fazla olmuştur fakat mikrobiyal gelişimde büyük bir fark gözlemlenmemiştir. Çok-kültürlü organizmaların besinler için rekabet edebileceği ya da birbirinin gelişmelerini engelleyebilecek metabolik ürünler üretebileceği iddiasına rağmen, çalışmamızda birlikte kokteyl inokülasyonlar inhibe edici etkiler göstermemiştir. Gomes ve diğ. göre, *Lactobacilli* yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir ve proteolitik aktiviteleri sayesinde ortamdaki peptitler ve amino asit miktarını artırıp *Bifidobacterium* cinsi mikroorganizmaların gelişmesini desteklemektedir (1998). Ayrıca Santos ve arkadaşları da yer fıstığı-soya sütünün fermantasyonunda kullandıkları LAB-maya türlerinin kombinasyonlarında gelişmenin desteklendiğini ve 24 saatlik fermantasyon sonucunda pH değerinin düştüğünü bildirmişlerdir (2014). Matejcekova ve diğ. karabuğdayın fermantasyonunda *Lb. rhamnosus GG* ile fresco kültürü (*Lc. lactis spp. lactis, Lc. lactis spp. cremoris, St. salivarius subsp. thermophiles* türlerinden oluşan kokteyl) çalışmıştır ve sonucunda tekli *Lb. rhamnosus GG* ' un karabuğday içerisinde gelişimi 8 saatlik fermantasyon sonucunda 8 log kob/ml iken fresco kültürü ile yapılan inokülasyon ve 8 saatlik fermantasyon sonucunda tekli *Lb. rhamnosus GG* gelişimi 2,5 log kob/ml artmış pH değeri ise 58% daha fazla azalmıştır (2017).

Süt karışımlarının tamamında, inokülüm 6. ve 24. saatler arasında az oranda da olsa artış göstermişlerdir, ve tüm süt karışımlarında *B. bifidum 700795* 6. ve 24. saatler arasında en çok gelişme gösteren inokülüm olmuştur ve gelişmesinde en az 2 log kob/ml artış göstermiştir. Aynı zamanda bütün süt karışımlarında *B.bifidum 700795* inokülümünün 6. saat için pH değerleri 6.5 üzerindedir, ve 24 saatlik fermantasyon sonucunda süt karışımlarında pH değeri 4,37'nin altına düşmüştür, 6. saatte 8,15-8,34 log kob/ml değerlerinde olan mikrobiyal gelişmesi ise tüm süt karışımlarında fermantasyon sonunda 10 log kob/ml'nin üzerindedir. Chou ve Hou yaptıkları çalışmada, soya sütünün *Bifidobacterium infantis CCRC 14633* ve *B. longum B6* suşlarının 37 °C 48 saatlik fermantasyon boyunca gelişimini desteklediği ve en az 3 log kob/ml gelişime olduğunu fakat pH düşüşünün gelişme oranıyla direkt olarak bir ilişkisi olmadığını göstermişlerdir (2000).

Genellikle, bitkisel süt karışımlardaki soya sütü oranı arttıkça, her bir inokülüm için gelişme de artmıştır, bu sonuç pH değeriyle de orantılıdır. pH değeri karışımlardaki soya sütü oranıyla artarken, mikrobiyal gelişme de soya sütü oranıyla artmaktadır. Böylece soya sütünün bu tezde kullanılan probiyotik LAB suşlarının gelişimini desteklediği söylenebilmektedir. Mridula ve Sharma'nın yaptığı çalışmaya göre soya sütü probiyotik laktik asit bakterilerinin gelişimini desteklemektedir, soya sütündeki LAB gelişimini destekleyen faktörlerin ise içeriğindeki zengin oligosakkaritler, aminoasit ve peptit yapıları olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmanın amacı probiyotik bir içecek tasarımı olup, bu tez çalışmasıyla paralel sonuçlar bulmuşlardır. Soya ile birlikte filizlenmiş buğday, arpa, darı, ve yulafı ayrı ayrı farklı oranlarda şeker ve stabilizörler ile farklı içecekler tasarlanıp *Lactobacillus acidophilus-NCDC14* probiyotik suşunun aktivitesi incelenmiştir. Bütün içecek tasarımlarında fermentasyon sonunda, soya sütü miktarı arttıkça probiyotik suşun gelişimi artmış, içeceğin asitliği ve pH değeri ise kullanılan tahıl yapısına göre değişiklik göstermiştir (2015).



Şekil 4.10 : Bitkisel süt karışımlarının mikrobiyal gelişmeye etkisi

Literatür araştırmaları göz önüne alındığında, fermente soya sütüyle alakalı pek çok çalışma bulunmasına rağmen, fermente pirinç sütüyle alakalı çalışmalar sınırlıdır. Hassan ve diğ. yaptığı çalışmaya göre pirinç ve darı karışımından hazırlanan probiyotik içecek bal kabağı ve susam çekirdeği ile zenginleştirilip ticari probiyotik suşlar olan

S. thermophilus, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium BB-12* fermente ediliyor ve bu suşların gelişiminin bu karışım tarafından desteklendiği bildirilmiştir (2012). Ayrıca, Helland ve diğ. probiyotik puding üretimi üzerine çalışmışlardır, bu bağlamda pirinç ve mısır unlarının karışımına şeker ilavesi yapıp hem su hem süt bazlı puding üretmişlerdir, üretilen pudingler 4 farklı probiyotik LAB suşları ile fermente edilmiştir, bu suşlar *Lactobacillus acidophilus La5* ve 1748, *Bifidobacterium animalis Bb12*, ve *Lactobacillus rhamnosus GG* olup başlangıç olarak 7 log kob/ml olarak pudinglere inoküle edilmiştir, 37 °C, 12 saatlik fermantasyon sonucunda *Lb. rhamnosus GG* probiyotik suşu hem su bazlı hem süt bazlı iki pudingte de en çok gelişimi gösteren suş olmuştur, ayrıca *B. animalis Bb12* ve *L. acidophilus La5* suşları birlikte kullanıldığında birbirlerinin gelişimini destekledikleri gözlemlenmiştir, 21 günlük raf ömrünün sonunda ise yalnızca *L. acidophilus La5* suşu kullanılan pudinglerde probiyotik miktarı neredeyse sıfırken *B.animals Bb12* ile birlikte inoküle edildiğinde fermente pudinglerin raf ömrü sonunda 1-2 log kob/ml *L. acidophilus La5* suşu içerdiği gözlemlenmiştir (2004). Ayrıca Costa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sonucunda bulundan sonuçlar da bu tez çalışmasının sonuçları ile paralellik göstermektedir, soya-pirinç sütlerinin karışımıyla elde edilen süt karışımı 70:30 (v/v) *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium spp BB-12*, ve *Lactobacillus acidophilus La-5* suşları ile ayrı ayrı fermente edilmiştir, probiyotik suşlar bu süt karışımı içerisinde gelişme göstermişlerdir, 28 günlük raf ömrünün 14 gününde probiyotik aktivite gözlemlenmiştir (2017).

4.2.2 Bitkisel süt karışımlarının fermantasyondan önceki ve sonraki protein/peptit profilleri

Tarama kısmındaki gibi deneyin ikinci kısmında da bitkisel fermente sütlerin protein/peptit profilleri SDS-Jel ile incelenmiştir. Deneyin ilk aşamasında toplam suda çözümlenür-çözümlenür olmayan protein/peptit profili incelenmek istenmiş olup bu bağlamda çöktürme yöntemi kullanılmıştır, deneyin ikinci kısmında ise filtrasyon yöntemi kullanılmış olup suda çözümlenür protein/peptitler incelenmiştir.

Deneyin ikinci aşamasında örnekler 0,20 µm filtrasyondan geçirildiği için yalnızca süt karışımlarının çözümlenür protein/peptit içeriği gözlemlenmektedir ve bütün bitkisel süt karışımlarının fermantasyondan sonraki protein/peptit profilleri inkübe edilmemiş süt örnekleriyle karşılaştırıldığında büyük farklılıklar gözlemlenmiştir. Şekil 4.11, 4.12, 4.13' de SR25, SR50 ve SR75 bitkisel süt karışımlarının fermantasyondan önceki ve

sonraki protein/peptit profillerinin SDS-Jel elektroforezi ile incelenmesini gösterilmektedir.

Soya proteinlerinin su ile ekstrakte edilebilen 4 ana grubu vardır bunlar 2S, 7S, 11S ve 15S fraksiyonları olmakla birlikte β -konglisinin (7S) ve glisinin (11S) bu fraksiyonlar arasında major gruplardır (Riblett et al., 2001). Yapısal farklılıklarından dolayı 7S ve 11S proteinleri arasında fizikokimyasal birçok farklılık bulunmaktadır, örneğin; 11S glisinin proteini pH 6,4 suda çözünemiyorken, β -konglisinin pH 4,8 de suda çözünemiyordur (Barač, 2004). Tez çalışmasında kullanılan ve laboratuvarında karışım haline getirilen farklı oranlardaki pirinç ve soya bitkisel sütlerinin (SR25, SR50 ve SR75) pH değerleri 7,13; 7,07; 7,05 olarak ölçülmüştür, bu bağlamda majör protein grupları olan glisinin ve β -konglisinin fermantasyon başında süt karışımları içerisinde çözünür halde olduğu söylenilebilmektedir.

Jeller incelendiğinde, bu jellerin neredeyse tümünde 37 kDa büyük çözünür proteinlerin 24 saatlik fermantasyon sırasında kullanılan laktik asit bakterileri tarafından tüketildiği görülmektedir. Soya sütünün fermantasyonu boyunca, protein polipeptit zincirleri daha küçük polipeptit zincirleri (oligopeptit, dipeptit, tripeptit) oluşturmak üzere parçalanmaktadır ve iyi bir biyoaktif peptit kaynağı oluşturmaktadırlar (Agyei, 2011). Weng ve Chen'in raporladıkları çalışmaya göre soya fasülyesinin *Rhizopus oligosporus* ve *B. subtilis* ile fermantasyonu boyunca protein hidrolizinin arttığını ve fermantasyon sonucunda bazı aminoasitlerin örn. glutamik asit ve aspartik asit miktarında artış olduğunu gözlemlemişlerdir, ayrıca düşük molekül ağırlıklı peptit bağlarının (<20 kDa) miktarında artış olduğunu da raporlamışlardır (2011). Bir başka çalışmada, Hassan ve arkadaşları pirinç bazlı içeceğin kokteyl inokülüm fermantasyonunda *S. thermophiles* *Lb. acidophilus* ve *Bifidobacterium BB-12* kullanmış ve biyoaktif peptit bağlarında 37 °C, 16 saatlik fermantasyon sonucunda artış gözlemlemişlerdir bununla birlikte mineral içeriğinde de örn. Na, Fe, K, Zn, Ca, P, artış rapor edilmiştir (2012). Ayrıca Ai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tahıl karışımı bazlı içeceğin fermantasyonunda *Lactobacillus helveticus* ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmış olup serbest aminoasit miktarında azalma gözlemlenmiştir, bunun sebebinin ise yeni bir protein ya da peptit zincirinin yapımında bu aminoasitlerin kullanılmış olduğu bildirilmektedir, yine aynı çalışmada 12 saatlik fermantasyon sonucunda bazı protein yapılarının hidroliziyle glisin miktarında artış olduğu raporlanmıştır (2012).

SR25 süt karışımında tüketilmesine rağmen, SR50 ve SR75 süt karışımlarının *Lb.helveticus* CNBL ve *B.bifidum* 700795 ile 24 saatlik fermantasyonu sonucunda 75 kDa molekül ağırlığına sahip proteinlerin tüketilememiştir, dolayısıyla süt karışımlarındaki soya sütü miktarı arttıkça *Lb.helveticus* CNBL ve *B.bifidum* 700795 bu proteinleri tüketememeye başladığı anlaşılmaktadır, kullanılan bütün inokülümün proteaz aktivitelerinin bulunduğunu düşünmenin yanı sıra, bu iki inokülümün bulunduğu süt karışımlarının pH değeri düşünüldüğünde, aynı orandaki süt karışımlarının 24 saatlik fermantasyon sonucundaki en yüksek pH değerleri gözlenmiştir (pH~ 4,15). Mikroorganizmaların süt karışımındaki proteinleri tüketiminde doyuma ulaşmış olmasının yanı sıra, proteinlerin bozulmasında pH değerinin etkili olduğunda göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca aynı orandaki süt karışımlarının fermantasyonunda kullanılan inokülümde *Lb. rhamnosus* C243 kokteyl olarak *Lb.helveticus* CNBL ve *B.bifidum* 700795 ile kullanıldığında pH değerleri 24 saatlik fermantasyon sonunda 3,9'un altında düşmüştür ve 75 kDa bantları SR50 ve SR75 süt karışımlarında görülmemektedir.

Glisinin (m.w ~360 kDa), disülfid, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler yoluyla dengelenmiş kompakt kuaterner yapıya sahip bir proteindir ve 2 alt birimden oluşur, β -konglisinin ise 3 alt birimden oluşan bir protein olup ($-\alpha'$ -, $-\alpha$ -, $-\beta$ -) moleküler ağırlıkları ise sırasıyla 72 kDa, 68 kDa, ve 52 kDa'dır (Barac, 2004).

Süt örnekleri jel elektroforezi deneylerinde aynı miktarda yüklenmiştir, Şekil 4.10, 4.11, 4.12' den anlaşılacağı gibi süt karışımlarındaki soya miktarı arttıkça jel elektroforezlerinde ilk dört sırada bulunan T=0 örneklerine ait protein profillerinin 25 kDa'dan büyük molekül ağırlığına sahip protein bantlarında koyulaşma ve sıklaşma gözlemlenmiştir ve SR75 jel elektroforezinde de artışın en çok olduğu görülmektedir. Böylece süt karışımlarındaki molekül ağırlığı 25 kDa'dan büyük çözünür protein/peptit içeriği soya sütü içeriğinden geldiği anlaşılmakta ve 24 saatlik fermantasyon süresince tüketildiği gözlemlenmektedir. Riblett ve arkadaşları soya fasülyesinin protein içeriğini SDS-Jel elektrofizinde incelemiş ve 18 kDa ve 40 kDa molekül ağırlıklarında alt birimlerin glisinin proteinine, 51 kDa, 72 kDa, ve 84 kDa alt birimlerinin ise β -konglisinin proteinine ait olduğunu bildirmişlerdir (2001). Ayrıca, Gibbs ve arkadaşları glisinin proteinin, soya fasülyesi protein hidrolizinde ortaya çıkan peptitlerin 95% inden sorumlu olduğunu, diğer major grup β -konglisinin proteinin ise proteolitik bozunmalara karşı daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir

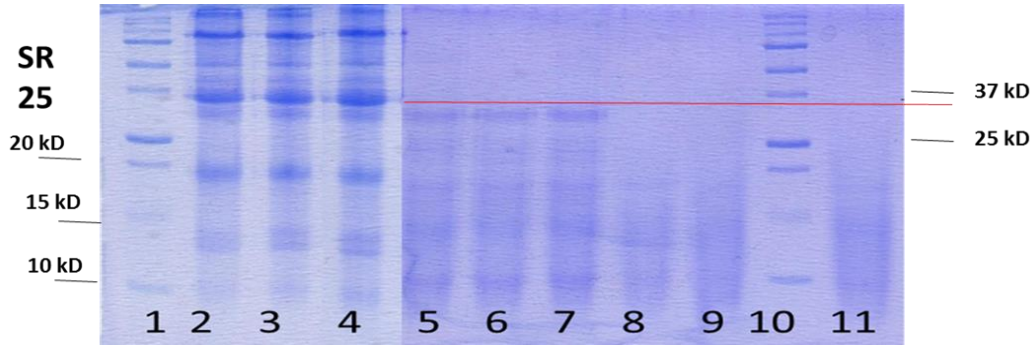
(2004). Bu bilgiler ışığında jeller incelendiğinde, *Lb. helveticus* CNBL ve *B. bifidum* 700795 yalnız başına β -konglisinin alt birimlerini denatüre edemiyorken, *Lb. rhamnosus* C243 ile yapılan kokteyl inokülümde bu protein alt birimlerinin hidrolizi gözlemlenmiştir.

Şekil 4.14' de yalnızca kokteyl inokülümünün fermantasyondan önce ve sonraki protein/peptit profilleri incelenmiştir, bu iki jel profili incelendiğinde kokteyl inokülümünün protein/peptit profilini tamamen değiştirdiği yine gözlemlenmektedir ve 24 saatlik fermantasyon sonucunda kontrol olarak kullanılan inoküle edilmiş T=0 sa. süt karışımlarıyla kıyaslandığında molekül ağırlığı 25 kDa fazla olan proteinler gözlemlenmemekte, çözümlü yapıda bulunan düşük molekül ağırlıklı peptit bantları gözlemlenmektedir. Fermantasyon sonucunda 25 <kDa T=0 ile kıyaslandığında bantlarında sıklaşma ve koyulaşma her bir kokteyl fermente süt karışımında gözlemlenmiştir. Şekil 4.14 SDS-Jel profilinden çıkarılacak yorum ise, düşük molekül ağırlıklı suda çözümlü peptit bağlarının kokteyl inokülüm fermantasyonla arttığıdır.

Ayrıca, 4.11, 4.12, 4.13 jelleri incelendiğinde 37 kDa molekül ağırlığından düşük peptitlerin bant sıklığı ve yoğunluğuna bakıldığında 24 saatlik fermantasyon sonucunda *Lb.rhamnosus* C243 ile fermente edilen süt SR25, SR50 ve SR75 karışımlarında bantların daha koyu ve sık olduğu gözlemlenmiştir. LAB türlerinin gıdaların fermantasyonu sırasında biyoaktif peptitlerin miktarını arttırdığı birçok çalışma ile kanıtlanmıştır, örneğin inek sütü fermantasyonunda *Lb. helveticus* CP790, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. bulgaricus* SSI ve *Lb. lactis* subsp. *cremoris* FT4 kullanıldığında süt kazeinlerinin parçalanıp biyoaktif peptit bağları oluşturduğu bildirilmiştir (Gobbetti, 2002). Ayrıca, *Lb. rhamnosus*'un fermantasyon sırasında antimikrobiyal biyoaktif peptitler ürettiği (molekül ağırlığı 4 kDa civarında) bir çok çalışma ile kanıtlanmıştır ve üretilen biyoaktif proteinlerin gelişimi üzerinde etkili olduğu patojenler ise; *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*, *Shigella sp.*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Micrococcus luteus* ve *Listeria monocytogenes* dir. Biyoaktif peptitlerin pH direnci pH 2-9 arasında olup termostabiliteyi 60 dk 100°C de gözlemlenmiştir (Pithva, 2011). Termofilik *Lb. helveticus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* türleri termostabiliteyi ve yüksek proteolitik aktiviteleri dolayısıyla biyoaktif peptit miktarındaki yüksek artış yüzünden diğer LAB türleri ile kıyaslandığında süt

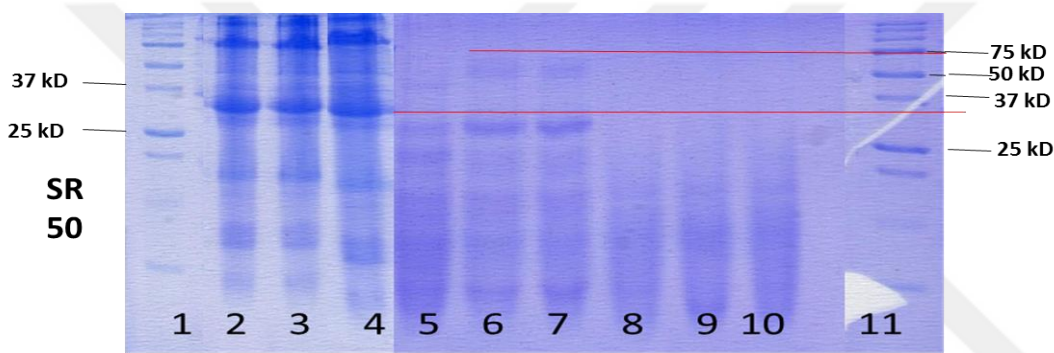
fermentasyonunda en çok çalışılan türler olduğu bildirilmektedir (Sadat-Mekmene et al., 2011).

Biyoaktif peptit tüketiminin sağlık üzerinde pozitif etkisi olduğuna dair literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. ACE inhibitör peptitleri proteince zengin gıdaların fermentasyonu sonucunda oluşup; hipertansiyon ve yüksek kan basıncı hastalıklarının tedavisinde doğal bir kaynak oluştururlar (Sanjukta, 2016). Tsai ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada soya sütünü 5 LAB türü ile 30 h, 40 °C fermente etmişlerdir, bu türler *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *St.thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *B. longum* olup fermentasyon sonunda serbest aminoasit, peptit miktarında ayrıca protein miktarında da artış gözlemlemişlerdir çalışmanın devamında ise ACE inhibitörü peptitlerin salındığını ve probiyotik fermente gıdaların tüketiminin insan sağlığı üzerinde pozitif etkisi olduğunu, probiyotiklerin proteolitik aktivitelerinin soya sütünün fermentasyonu ile peptit miktarındaki artışın in vitro çalışmalarda ACE inhibitörü olduğunu böylece kan basıncı düşürücü etkileri olduğunu gözlemlemişlerdir (2006). Bir başka çalışmada ise soya sütünden elde edilen protein fraksiyonlarının probiyotik *L. casei*, *L. acidophilus*, *L.bulgaricus*, *S. thermophilus* ve *B. longum* türleri ile fermentasyonu sonucunda oluşan peptitlerin kan basıncını düşüren (antihipertansif) özellikte olduklarını bildirmişlerdir (Chiang et al., 2006). Soya proteinlerinin hidroliziyle soya proteinin yapısı değişip, daha aktif bir aminoasit R grubu ortaya çıkmaktadır ve böylece ana proteinle kıyaslandığında daha yüksek bir antioksidan etki gözlemlenmiştir (Chen et al., 1998). Genellikle antioksidan peptitler 2-20 aminoasitle oluşmakta olup molekül ağırlıkları 6 kDa daha düşüktür (Coda et al., 2012). Yu ve arkadaşları yağsız soya fasüyesinin probiyotik *Bacillus subtilis* SHZ ile fermentasyonu sonucunda oluşan biyoaktif peptitlerin oluşumunu incelemiştir, yapılan çalışmada fermente olmuş soya fasüyesi peptitleri ultrafiltrasyonla saflaştırıldıktan sonra $O_2^- \cdot$ ve $\cdot OH$ radikallerini temizleyici aktivitesi artmış olup, fareler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda ise farenin yüzme süresinde artış, laktatın kandaki artışının gecikmesi ve karaciğerdeki hepatik glikojen depolanmasını arttırdığı gözlemlenmiştir (2008).



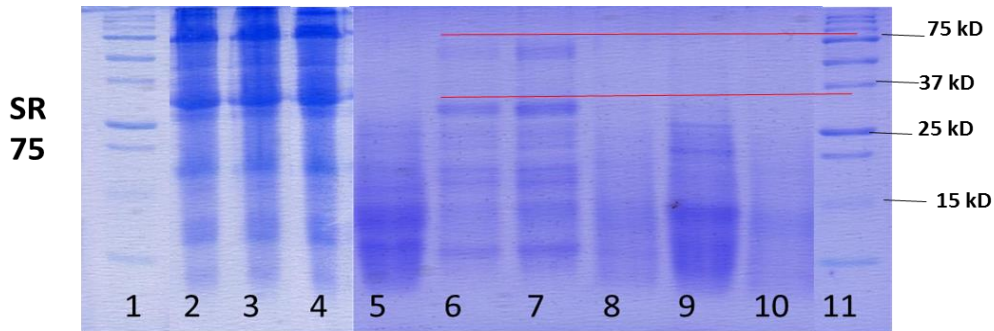
Şekil 4.11 : SR25 bitkisel süt karışımının fermantasyondan önceki ve sonraki protein/peptit profili.

1=Standart (St); 2= SR25(*Lb.rhamnosus* C243+*Lb.helveticus*CNBL+*B.bifidum*700795) T=0; 3=SR25(*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus*CNBL+*B.longum*12) T=0; 4=Kontrol SR25 T=0; 5=SR25(*Lb.rhamnosus*C243) T=24; 6=SR25(*Lb. helveticus*CNBL) T=24; 7=SR25(*B.bifidum* 700795) T=24; 8=SR25(*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus*CNBL+*B.bifidum* 700795) T=24; 9=SR25(*B.longum* 12) T=24; 10= St; 11= SR25(*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus* CNBL +*B.longum*12) T=24



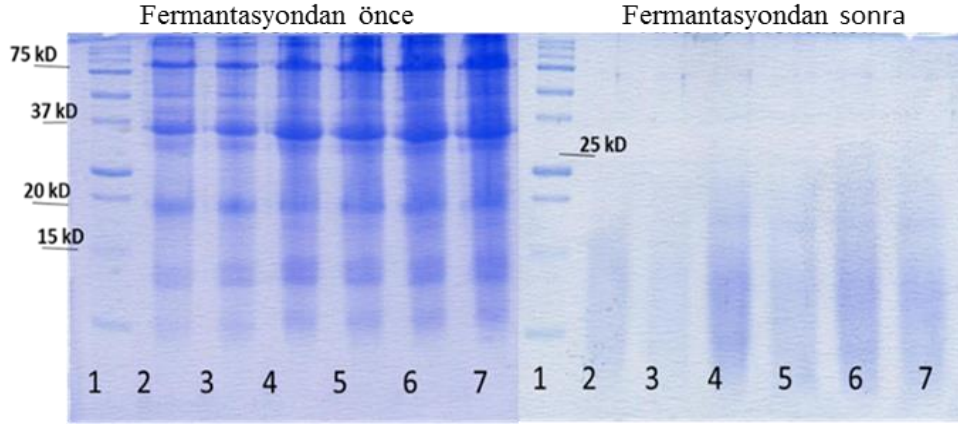
Şekil 4.12 : SR50 bitkisel süt karışımının fermantasyondan önceki ve sonraki protein/peptit profili:

50% pirinç sütü+ 50% soya sütü. 1=Standart(St); 2=SR50(*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus*CNBL+*B.bifidum*700795) T=0; 3=SR50 (*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus*CNBL +*B.longum*12) T=0; 4= kontrol SR50 T=0; 5=SR50 (*Lb.rhamnosus*C243) T=24; 6=SR50(*Lb.helveticus*CNBL) T=24; 7=SR50 (*B.bifidum*700795) T=24; 8=SR50(*Lb.rhamnosus*C243 +*Lb.helveticus*CNBL+*B.bifidum*) T=24; 9=SR50(*B.longum*12) T24; 10=SR50 (*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus*CNBL+*B.longum*12) T=24; 11= St



Şekil 4.13 : SR75 bitkisel süt karışımının fermantasyondan önceki ve sonraki protein/peptit profili:

SR75: 25% pirinç sütü+ 75% soya sütü. 1=St; 2=SR75 (*Lb.rhamnosus*C243+ *Lb.helveticus*CNBL +*B.bifidum*700795) T=0; 3=SR75(*Lb.rhamnosus*C243+ *Lb.helveticus*CNBL+*B.longum*12) T=0; 4= Kontrol SR75 T=0; 5=SR75(*Lb.rhamnosus*C243) T=24; 6=SR75(*Lb.helveticus*CNBL) T=24; 7=SR75(*B.bifidum* 700795) T=24; 8=SR75(*Lb.rhamnosus* C243+*Lb.helveticus*CNBL +*B.bifidum*700795) T=24; 9=SR75(*B.longum*12) T=24; 10=SR75(*Lb.rhamnosus*C243+ *Lb.helveticus*CNBL +*B.longum*12) T=24; 11= St



Şekil 4.14 : Süt karışımlarının kokteyl inokülümle fermentasyondan önce ve sonraki protein/peptit profilleri. **1=** St; **2=** SR25 (*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus* CNBL+*B.bifidum*700795); **3=**SR25 (*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus*CNBL+*B.longum*12);**4=**SR50(*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus*CNBL+*B.bifidum* 700795); **5=**SR50(*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus*CNBL+*B.longum*12); **6=**SR75(*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus*CNBL+*B.bifidum* 700795); **7=**SR75(*Lb.rhamnosus*C243+*Lb.helveticus*CNBL+*B.longum*12)

4.2.3 Süt karışımlarının fermentasyondan önce ve sonra antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

İnkübe ve inoküle edilmemiş süt karışımları (SR25, SR50, SR75) kontrol olarak kullanılmıştır antioksidan aktiviteleri ABTS+ metodu ile ölçülmüş ve aktivite gözlenmemiştir. 24 saatlik, 30 °C fermentasyon sonucunda bütün örneklerde antioksidan aktivite gözlemlenmiştir ve değerler Çizelge 4.2 de gösterilmiştir. Süt karışımlarının inokülüne göre antioksidan aktivitesi incelendiğinde, *Lb. rhamnosus* C243 ile fermente edilen sütler en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir $p < 0,05$, ve en yüksek antioksidan aktivite SR75 karışımının *Lb. rhamnosus* C243 ile fermentasyonu sonucunda elde edilmiştir.

Antioksidan aktivite her inkülüm için ayrı ayrı düşünüldüğünde, süt karışımındaki soya sütü oranı arttıkça antioksidan aktivitenin arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin soya fasülyesindeki yüksek polifenol içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir, soya yüksek seviyede izoflavon içermektedir, izoflavonlar soya fasülyesi içerisinde genellikle glukozit yapıda bulunurlar örn. daidzin ve genistin veya aglikon yapısındadırlar örn. daidzein ve genistein (McCue et al., 2004). Soya fasülyesindeki bu yüksek izoflavon miktarına rağmen, izoflavonların 83,9-98,4% 'u glukozit yapısında bulur ve inaktiflerdir bu yüzden fermente olmayan örn. soya sütü izoflavonları biyolojik olarak inaktiftir. Yapılan birçok çalışma soya fasülyesi veya ürünleri içerisindeki glukozit/aglikon oranının mikroorganizmalardaki β -glukosidaz aktiviteleriyle değişmesinin mümkün olduğunu göstermektedir. Marazza ve

arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre 63 farklı LAB suşunun β -glukosidaz aktivitesi incelenmiştir bu suşlar *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *B.longum* ve *B. bifidum* türlerine ait olup, *Lb. rhamnosus*'un bütün suşları β -glukosidaz aktivitesi göstermiştir. Çalışmada ayrıca β -glukosidaz aktivitesi arttıkça oluşan izoflavon aglikon miktarının arttığı da 12 saatlik fermantasyon boyunca gözlemlenmiştir ve maksimum izoflavon aglikon miktarı *Lb. rhamnosus CRL981* ile fermantasyon sonucunda bulunmuştur (2009). Ayrıca Desjardins ve arkadaşları bifidobakterilerin diğer kolonik LAB türleri ile kıyaslandığında daha fazla β -glukosidaz aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (1990). Fakat Marazza ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre *Lb. rhamnosus CRL981*, *B. longum-b* ile kıyaslandığında 4.9 kat daha fazla β -glukosidaz aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Marazza ve diğ. yaptığı bir sonraki çalışmada ise soya sütünün *Lb. rhamnosus CRL981* fermantasyonuyla (24 sa., 37 °C) β -glukosidaz aktivitesinin artışıyla izoflavon aglikon miktarının da arttığını böylece soya sütünün antioksidan miktarının arttığını bildirmişlerdir (Marazza ve diğ., 2012). Bu tez çalışmasının sonuçları ile Marazza ve ark. çalışmasının sonuçları paralellik göstermekte olup, en düşük antioksidan aktivite SR25 ve SR50 süt karışımlarının *B. longum 12* ile fermentasyonu sonucunda gözlemlenmiştir, en yüksek antioksidan aktivite ise bütün süt karışımlarının *Lb. rhamnosus C243* ile fermentasyonu sonucunda gözlemlenmiştir $p<0,05$. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, süt karışımlarındaki antioksidan aktivite soya sütü miktarı arttıkça artmakta bunun sebebinin ise soya sütü içerisindeki izoflavon miktarının artmasındandır. Fermantasyon sırasında kullanılan LAB suşlarının enzimatik aktiviteleriyle izoflavonlar, izoflavon aglikon formuna dönüşmekte ve böylece antioksidan aktiviteyi arttırmaktadır. Fermente edilmiş süt karışımlarının antioksidan değerleri kıyaslandığında ise önemli bir başka sonuç gözlemlenmektedir. *B. longum B12* ile fermente edilen süt karışımları en düşük antioksidan aktiviteye sahip olmasına rağmen, *Lactobacillus (Lb.rhamnosus C243 ve Lb. helveticus CNBL)* türleri ile kokteyl fermentasyonunda bu bitkisel süt karışımlarının antioksidan aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, SR75 bitkisel süt karışımlarının fermantasyondan sonraki antioksidan aktivitesine göre kıyaslandığında fermente SR25 ve SR50 bitkisel süt karışımlarının antioksidan değerlerinin düşük olmasının sebeplerinden birisi de fermantasyon sonunda SR25 ve SR50 deki düşük pH değerleri olabileceği düşünülmektedir. Zhao ve diğ. yaptığı bir çalışmaya göre soya sütünün

fermantasyonunda kullanılan *Lb. acidophilus* CSCC 2400, *Lb. paracasei* CSCC 279, *Lb. zae* ASCC 15820 and *Lb. rhamnosus* WQ2 suşlarının β -galaktosidaz aktivitesi ortam pH değerinden etkilenmekte ve maksimum enzim aktivitesinin pH 4,15 civarında gözlemlendiği bildirilmektedir. Fakat Zhao ve diğ. kullandığı *Lactobacillus* türleriyle kıyaslandığında Hsu ve ark. (2005) göre *B. longum* CCRC 15708 'un soya sütü içerisindeki β -galaktosidaz enzim aktivitesi daha fazladır, buradan yapılan çıkarımda ise; β -galaktosidaz aktivitesinin düşmesinin ortam pH değeri düştükçe enzim protein yapısının denatürasyona uğradığı ve aktivitesinin düştüğüdür. Yapılan pek çok çalışma β -galaktosidaz aktivitesinin optimum pH değerinin 7,00 civarında olduğunu bildirmektedir (2014). Bu çalışmada *B. longum* B12 ile fermente edilen süt karışımlarının daha düşük antioksidan değerine sahip olmasının sebebinin β -galaktosidaz aktivitesinin düşük pH dan etkilenmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir, fakat kokteyl inokülümelerde ortamda bulunan β -galaktosidaz veya β -glukosidaz aktivitesinin devam ettiği düşünülmektedir. Ayrıca Zhao ve ark.'nın yaptığı çalışmada da soya sütünün fermentasyonu en yüksek antioksidan değerini gösteren *Lb. rhamnosus* WQ2 suşu olmuştur (2014).

Ayrıca fermente bitkisel süt karışımlarının antioksidan aktivitesi inokülümelerin proteaz aktivitesine de bağlı olduğu düşünülmektedir. Soya proteinlerinin süt karışımlarının fermentasyonu boyunca probiyotik LAB suşları tarafından fenolik-peptit kompleks yapısının bozulmasıyla ortamdaki serbest fenolik ve peptit miktarı artmaktadır (Alu'datt et al., 2013). Babini ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre değişik tahıl unlarıyla hazırlanmış hamurun fermentasyonu farklı LAB türleri ile yapılmış bu suşlar ise *Lb. fermentum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. sanfranciscensis* türlerine aittir. Fermente edilen bütün hamurlar antioksidan aktivitesi göstermiş olup en yüksek antioksidan aktivite ise *Lb. rhamnosus* C249 ve *Lb. plantarum* 98a suşlarıyla fermente edilen hamurlardan elde edilmiştir. Ayrıca çalışmada biyoaktif peptitlerin oluşumunun antioksidan değeriyle olan ilişkisi incelenmiştir hamurun *Lb. rhamnosus* C249'un fermentasyonu sonucunda oluşan iki peptit türünün antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve moleküler ağırlığının 6,0 kDa civarında olduğu ve yapısında tirozin, metionin, histidin ve sistein içerdiği bildirilmiştir (2017). Bu tez çalışmasının önceki basamağı olan SDS-Jel profilinde protein bozulması tüm fermente süt karışımlarında gözlemlenmişti, böylece antioksidan aktivitesinin protein bozulmasıyla aktif peptitlerin oluşumu yüzünden

kaynaklandığı da düşünülmektedir. Proteoliz sürecinde antioksidan peptit oluşabileceği gibi antioksidan özellikteki aminoasitlerde oluşabilmektedir örn. valin, lösin, fenilalanin ve triptofan (Virtanen ve ark., 2007). Ayrıca, Wang ve ark. yaptığı çalışmayla pirinç proteinlerinin örn. glutelin ve prolamin'in in vitro sindirim sisteminde sindiriminden sonra antioksidan aktivitesine sahip olduklarını bildirmişlerdir, çalışmanın devamında ise radikal temizleyici, metal şelatlama aktivitelerinin pirinç proteinlerinin hidroliziyle arttığını bildirmişlerdir (2016).

Çizelge 4.2 : Süt karışımlarının fermantasyondan sonraki antioksidan aktiviteleri. †

	SR25	SR50	SR75
<i>Lb. rhamnosus C243</i>	45,44 ± 1,78 ^{bcd}	47,19 ± 3,60 ^{bc}	50,59 ± 0,47 ^a
<i>Lb. helveticus CNBL</i>	42,71 ± 2,78 ^{ef}	47,84 ± 1,92 ^{abc}	48,05 ± 0,75 ^{abc}
<i>B. bifidum B700795</i>	43,13 ± 2,58 ^{ef}	47,38 ± 1,12 ^{bc}	48,40 ± 1,48 ^{ab}
Kokteyl 1*	40,68 ± 0,58 ^{fg}	47,49 ± 0,35 ^{bc}	46,75 ± 0,99 ^{bc}
<i>B. longum B12</i>	37,46 ± 0,19 ^h	39,47 ± 1,31 ^{gh}	46,16 ± 0,48 ^{bcd}
Kokteyl 2**	45,14 ± 1,56 ^{cde}	46,45 ± 1,28 ^{bc}	43,40 ± 1,49 ^{def}

†Antioksidan aktiviteleri ABTS metoduyla ölçülmüştür ve sonuçlar µg AA eq/ml olarak belirtilmiştir. İstatistiksel farklılıklar Duncan Multiple Range Test ile ölçülmüştür p<0,005. * Kokteyl 1: *Lb. rhamnosus C243+Lb. helveticus CNBL+B. bifidum 700795* **Kokteyl 2: *Lb. rhamnosus C243+Lb. helveticus CNBL+B. longum 12*. SR25: 25% soya sütü + 75% pirinç sütü (v/v); SR50: 50% soya sütü+ 50% pirinç sütü (v/v); SR75: 75% soya sütü+ 25% pirinç sütü (v/v).

Antioksidanların sağlık üzerine pozitif etkileri bulunmaktadır. Marazza ve ark. yaptığı bir başka çalışmada ise fermente soya sütünün diyabet hayvan modeli ile sağlık üzerine etkileri incelenmiştir, çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular ise; fermente soya sütünün önemli derecede kandaki glikoz seviyesini, toplam kolesterol ve trigliserol değerlerini düşürdüğünü ve antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığını bildirmişlerdir (2013). Torino ve ark. LAB ile fermente mercimek üretimi üzerinde çalışmış, peptitler ile konjuge formda bulunan fenolik bileşenlerin fermantasyon sonunda serbest halde bulduklarını ve fermente ürünün antioksidan değerinin arttığını belirtmişlerdir; antioksidan aktivitesiyle orantılı olarak serbest aminoasit ve peptitlerin arttığı aynı zamanda ACE inhibitör peptitlerinin de miktarının artmasıyla hipertansiyon tedavisinde ve önlenmesinde fermente ürün tüketiminin sağlık üzerine olumlu etkilerinden bahsetmişlerdir (2013).

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, çalışma 2 bölüme ayrılmıştır. İlk bölüm, tarama kısmında 12 tane *Lactobacillus*, 2 tane *Bifidobacterium* cinslerine ait probiyotik suşlar kullanılmış olup ayrı ayrı soya sütü ve pirinç bitkisel sütleri içerisindeki fermantasyon yeteneklerine göre (mikrobiyal gelişme ve pH düşürme) değerlendirilmiş ve fermente bitkisel sütlerin protein/peptit profilleri incelenmiştir. Deneyin ikinci kısmı için 2 *Lactobacillus* seçilmiştir ve probiyotik fermente bitkisel içecek tasarımı hedeflenmiştir. Seçilen *Lactobacillus* probiyotik suşları ile probiyotik *Bifidobacterium* suşları kokteyl veya tekli olarak bitkisel süt karışımları (SR25: 75% pirinç sütü+ 25% soya sütü, SR50: 50% pirinç sütü+ 50% soya sütü, SR75: 25% pirinç sütü+ 75% soya sütü) olan içecekler içerisindeki fermantasyon yetenekleri, fermente içeceklerin protein/peptit profilleri ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Deneyin ilk kısmında soya sütü ve pirinç sütüne ayrı ayrı inoküle edilen bütün probiyotik suşlar 24 saatlik inkübasyon sonucunda gelişme göstermiş oluş ortamın pH değerlerini düşürmüşlerdir. Fakat fermantasyonun erken döneminde (6 saat) ve geç döneminde (24 saat) hem pirinç sütü hem de soya sütü içerisindeki aktiviteleri göz önüne alındığında *Lb. rhamnosus C243* ve *Lb. helveticus CNBL* deneyin ikinci kısmında kullanılacak probiyotik suşlar olarak belirlenmiştir, yine deneyin ikinci kısmında hem kokteyl inokülüm olarak hem de tekli inokülüm olarak probiyotik *B.longum B12* ve *B. bifidum 700795* suşları da kullanılmıştır. İkinci kısım olan içecek tasarımı da kullanılan kokteyl ve tekli tüm inokülümler içecekler içerisinde 24 saatlik 37° C inkübasyon sonucunda gelişme ve pH değerini düşürme etkileri göstermişlerdir. Fermantasyon sonunda içeceklerin pH değerleri 3,71-4,64 arasında olup mikrobiyal gelişim 9,46 log kob/ml üzerindedir. Tasarımı yapılan tüm probiyotik fermente içeceklerin antioksidan aktiviteye sahip olmasına rağmen kontrol içeceklerde antioksidan aktivitesine rastlanılmamıştır. Ayrıca, fermente bitkisel probiyotik içeceklerin tamamında fermantasyon sonucunda protein/peptit profillerinin kontrole kıyasla tamamen değiştiği SDS-Jel profili ile gözlemlenmiştir, fermente içeceklerin neredeyse tamamında 37 kDa molekül ağırlığından büyük proteinler fermantasyon

sonunda gözlemlenmemiştir. Tasarlanan probiyotik fermente bitkisel içeceklerin hem antioksidan aktiviteleri ve protein/peptit profilleri incelendiğinde hem de inokülümün fermentasyon yetenekleri incelendiğinde *Lb. rhamnosus* C243 probiyotik suşu her 3 tasarım içekte de diğer kokteyl ve tekli inokülümünden ayrıldığı ve en iyi performans gösteren inokülüm olduğu belirlenmiştir. Tasarlanan her içecek oranında en az 9,72 log kob/ml mikrobiyal gelişme gösterip probiyotik içecek gerekliliğini sağlamıştır. Ayrıca kokteyl inokülümünde *Lb. rhamnosus* C243 kullanımının da içeceklerde protein hidrolizini ve antioksidan aktiviteyi arttırdığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında kullanılan suşların tamamının probiyotik fermente bitkisel içecek tasarımında kullanılabileceği; biyoteknolojik açıdan suşların zamana göre pH ve büyüme değerlerinin incelenmesinin yanısıra, içeceğin fonksiyonel özelliklerinin geliştirilebileceği; örn. düşük molekül ağırlıklı aktif peptit içeriğinin ve antioksidan değerinin arttırabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, kullanılan *Bifidobacterium* ve *Lactobacilli* suşlarının kokteyl inokülümle gelişimlerinin teşvik ediliği ve antioksidan değerinin artmasıyla birlikte tasarımı yapılan içeceklerin protein profillerinin değiştiği gözlemlenmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucunda da tasarlanan probiyotik fermente bitkisel içeceğin fonksiyonel özelliklerin tüketici sağlığı üzerinde pozitif yönde etkileri olduğu bildirilmiştir. Böylece, bu tez çalışmasında; probiyotik laktik asit bakterileri tarafından yeni bitkisel fermente içeceklerin geliştirilmesi için içecek endüstrisinde yeni pazarlar ve/veya mevcut pazarların genişletilmesinde kullanılabilecek önemli bulgular ve yorumlar içermektedir.

Gelecekteki çalışmalara yönelik öneriler ise, tasarımı yapılan probiyotik, fermente bitkisel içeceklerin raf ömrü çalışmaları ile duyu analizi ve aroma gelişimi üzerinde çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca, probiyotik starter kültürlerinin canlılığını ve sağlık etkilerini belirlemek için de kapsamlı in situ / in vivo çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Agyei, D., Danquah, K.** (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29, 272–7.
- Ai, J., Li, A.L., Su, B.X. Meng, X.C.** (2015). Multi-Cereal Beverage Fermented by *Lactobacillus Helveticus* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Food Science*, 80, 178-185.
- Alu'datt, M.H., Rababah, T., Ereifej, K., Brewer, S., Alli, I.** (2013). Phenolic-protein interactions in oilseed protein isolates. *Food Research International*, 52, 178-184.
- Babini, E., Tagliazucchi, D., Martini, S., Più, L.D., Gianotti, A.** (2017). LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins. *Food Chemistry*, 228, 186–196.
- Barać, M.B., Stanojević, S.P., Jovanović, S.T., Pešić, M.B.** (2004). Soy Protein Modification. *Acta Periodica Technologica*, 35, 3-16.
- Bech-Larsen, T. ve Scholderer, J.** (2007). Functional foods in Europe: Consumer research, market experiences ve regulatory aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 231–234.
- Bekes, F., Wrigley, C.V.** (2016). The protein chemistry of cereal grains. In: C., Wrigley, H., Corke, K., Seetharaman, J., Faubion (Eds.), *Encyclopedia of Food Grains*, (Vol. 2, pp. 98-108). Oxford, UK: Elsevier.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M.,** (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278–285.
- Bernat, N., Chafer, M., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C.** (2014). Vegetable milks and their fermented derivative products. *International Journal of Food Studies*, 3, 93-124.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., Webb, C.** (2003). Cereal-based fermented foods and beverages, *Food Research International*, 36, 527–543.
- Blveino, A., Al-Aseeri, M. E., Pveiella, S. S., Cantero, D., Webb, C.** (2003). Cereal-based fermented foods ve beverages, *Food Research International*, 36, 527–543
- Bressani, R. ve Elias, L.G.,** (1968). Processed vegetable protein mixtures for human consumption in developing countries. In: Chichester, C.O., Mark, E.M., Stewart, G.F. (Eds.), *Advances in Food Research* (vol. 16, pp. 1–103). New York: Academic Press

- Chamlagain, B., Edelmann, M., Kariluoto, S., Ollilainen, V., Piironen V.** (2015). Ultra-high performance liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of active vitamin B12 in cells of *Propionibacterium* and fermented cereal matrices. *Food Chemistry*, 166, 630–638.
- Champagne, C.P., Green-Johnson, J., Raymond, Y., Barrette, J., Buckley, N.** (2009). Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Research International*, 42, 612–621.
- Champagne, C.P., Tompkins, T.A., Buckley, N.D., Green-Johnson, J.M.** (2010). Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiology*, 27, 968–972.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pveiella, S.S., Webb, C.** (2002). Application of cereals ve cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 131– 141.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K.** (1998). Antioxidativeproperties of histidine-containing peptides designed from peptide fragmentsfound in the digests of a soybean protein. *Journal of Food Science and Agricultural Chemistry*, 46, 49–53.
- Chiang, W., Tsou, M., Tsai, Z., Tsai, T.** (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chemistry*, 98,725–32.
- Chien, H. L., Huang H. Y. ve Chou, C. C.** (2006). Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria ve bifidobacteria, *Food Microbiology*, 23, 772–778.
- Chou, C.C. and Hou, J.W.** (2000). Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. *International Journal of Food Microbiology*, 56 113–121.
- Chu, S.C. Chen, C.** (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98, 502–507.
- Coda, R., Lanera, A., Trani, A., Gobbetti, M., Cagno, R.D.** (2012). Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: microbiology, texture, nutritional and sensory properties. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 120–127.
- Coda, R., Rizzello, C.G., Pinto, D., Gobbetti, M.** (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1087–1096.
- Corbo, M.R. Bevilacqua, A. Petruzzi, L. Casanova, F.P., Sinigaglia, M.** (2014). Functional beverages: the emerging side of functional foods. Commercial trends, research and health implications. *Comprehensive Reviews in Food Science ve Food Safety*, 13, 1192- 1206.
- Costa, K.K.F.D., Júnior, M.S.S., Rosa, S.I.R., Caliari, M., Pimentel, T.C.** (2017). Changes of probiotic fermented drink obtained from soy and rice byproducts during cold storage. *LWT - Food Science and Technology*, 78, 23–30.

- Dai, F.J., Chau, C.F.** (2017) Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. *Journal of food and drug analysis* 25, 37- 42.
- Delgado, G.T.C. Tamashiro, W.M.S.C., Pastore, G.M.** (2010). Immunomodulatory effects of fructans. *Food Research International*, 43, 1231–1236.
- Delzenne, N.M., Neyrinck, A.M., Cani, P.D.** (2011). Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome, *10th Symposium on Lactic Acid Bacterium*. Egmond aan Zee, Netherlands: 28 August - 1 September 2011.
- Desjardins, M., Roy, D., Goulet G.** (1990), Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *Journal of Dairy Science*, 73, 299–307.
- Dorđević, T.M., Šiler-Marinković, S.S., Dimitrijević-Branković, S.I.** (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 119, 957–963.
- Ehrmann, M.A. ve Vogel, R.F.** (2005). Molecular taxonomy ve genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Science ve Technology*, 16, 31–42.
- Fernández, J., Redondo-Blanco, S., Gutiérrez-del-Río, I., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombó, Colon, F.** (2016). Microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *Journal of Functional Foods*, 25, 511–522.
- Foschia, M., Peressini, D., Sensidoni, A.** (2013). Charles Stephen Brennan. The effects of dietary fibre addition on the quality of common cereal products. *Journal of Cereal Science*, 58, 216- 227.
- Franz, M.A.P., Huch M., Mathara, J.M., Abriouel, H. Benomar, N., Reid, G., Galvez, A., Holzappel, W.H.** (2014). African fermented foods ve probiotics, *International Journal of Food Microbiology*, 190, 84-96.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R., Omar, N.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 51-70.
- García, M.C., Puchalska, P., Marina M.L., Esteve, C.** (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328–349.
- Gibbs, B. F., Zoygman, A., Masse, R., Mulligan, C.** (2004). Production and characterization of bioactive 643 peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37, 123-131.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B.** (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401–12.
- Gibson, G.R., Wang, X.** (1994). Bifidogenic properties of different active than *B. infantis* under the storage condition types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiology*, 11, 491–498.

- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R.** (2002). Latent Bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Food Science and Nutrition*, *42*, 223–239.
- Grosch, W.** (2011). Aroma Compounds. In: L.M.L., Nollet (Eds.), *Handbook of food analysis*, (Vol. 1, pp. 717-746). New York, USA: Marcel Dekker.
- Guo, W., Beta, T.** (2013). Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals. *Food Research International*, *51*, 518–525.
- Hassan, A.A., Aly, M.M.A., El-Hadidie, S.T.** (2012). Production of Cereal-Based Probiotic Beverages. *World Applied Sciences Journal*, *10*, 1367-1380.
- Hsu, C.A., Yu, R.C., Chou, C.C.** (2005). Production of b-galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *104*, 197-206.
- Hugenholtz, J.** (2013). Traditional biotechnology for new foods ve beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, *24* (2), 155-159.
- Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K.** (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster ve in higher amounts than their glucosides in humans, *Journal of Nutrition*, *130*, 1695–1699.
- Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K.H., Kariluoto, S., Piironen, V.** (2007). Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiology*, *24*, 175–186.
- Kohajdova, Z.** (2014) Fermented cereal products. In: R.C. Ray, D. Montet (Eds.), *Microorganisms ve Fermentation of Traditional Foods* (pp. 78-107). Boca, Raton: CRC Press.
- Laatikainen, R., Koskenpato, J., Hongisto, S.M., Loponen, J., Poussa, T., Hillilä, M., Korpela, R.** (2016). Randomised clinical trial: low-FODMAP rye bread vs. regular rye bread to relieve the symptoms of irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, *44*, 460–470.
- Lafivera, D., Riccardi, G., Shewry, P. R.** (2014). Improving cereal grain carbohydrates for diet ve health. *Journal of Cereal Science*, *59*, 312-326.
- Lamsal, B. P. and Faubion J. M.** (2009). The beneficial use of cereal and cereal components in probiotic foods, *Food Reviews International*, *25*, 103–114.
- Lee, I. H., Hung, Y.-H., Chou, C.C.** (2008). Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic ve anthocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology*, *121*, 150–156.
- Leroy, F. ve Vuyst, L.C.** (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, *15*, 67–78.
- Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., Plumed-Ferrer, C.** (2016). Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, *66*, 275-283.

- Marazza, J.A., Garro, M.S., Giori, G.S.** (2009). Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. *Food Microbiology*, 26, 333–339.
- Marazza, J.A., LeBlanc, J.G. Giori, G.S., Garro, M.S.** (2013). Soymilk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 ameliorates hyperglycemia, lipid profiles and increases antioxidant enzyme activities in diabetic mice. *Journal of Functional Foods*, 5, 1848–1853.
- Marazza, J.A., Nazareno, M.A., Giori, G.S., Garro, M.S.** (2012). Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Functional Foods*, 4, 594–601.
- Marco, M., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligne, Kort, M.G.R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E.J., Hutkins, R.,** (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102.
- Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligne, B., Ganzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., Hutkins, R.** (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota ve beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102.
- Marecek, V., Mikyska, A., Hampel, D., Cejka P., Neuwirthov, J., Malachov, A., Cerkal, R.** (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, 73, 40-45.
- Margolles, A., Madiedo, P.R., Gavilán, C. R, Sánchez, B., Gueimonde, M.** (2011). *Bifidobacterium*. In: D. Lui (Eds), *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*. (pp. 45-58). Boca Raton, FL: CRC Press
- Marsh, A.J., Hill, C., Ross, P.R., Cotter, P.D.** (2014) Fermented beverages with health-promoting potential: Past ve future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38, 113-124.
- Matejcekova, Z., Liptakova, D., Valík, L.** (2017). Functional probiotic products based on fermented buckwheat with *Lactobacillus rhamnosus*. *LWT - Food Science and Technology*, 81, 35-41.
- McCue, P. Horii A., Shetty, K.** (2004). Mobilization of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by *Lentinus edobes* during solid-state bioprocessing is associated with enhanced production of laccase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 385–392.
- Mendis, M., Simsek S.** (2014). Arabinoxylans and human health. *Food Hydrocolloids*, 42, 239–243.
- Messens, W., De Vuyst, L.** (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 31– 43.
- Miremadi, F. and Shah, N.P.** (2012). Applications of inulin and probiotics in health and nutrition. *International Food Research Journal*, 19, 1337–1350.
- Mridula D., and Sharma, M.** (2015). Development of non-dairy probiotic drink utilizing sprouted cereals, legume and soymilk. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 482-487.

- Ng, C.C., Wang, C.-Y., Wang, Y.-P., Tzeng, W.-S., Shyu, Y.T.** (2011). Lactic acid bacterial fermentation on the production of functional antioxidant herbal *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, 289–293.
- Niki E.** (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503–515.
- Nyanzi, R. ve Jooste, P.J.** (2012). Cereal based functional foods. In: E.C. Rigobelo (Eds.), *Probiotics* (pp. 161-197) Rijek: InTech.
- O'Bryan, C.A., Crandall, P.G., Ricke, S.C., Ndahetuye, J.B.** (2015). Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Types and mechanisms of action. In: M. Taylor (Eds.) *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, (pp. 117-136). New York: Woodhead Publishing.
- Ogunremi, O. R., Banwo, K., Sanni, A.I.** (2017). Starter-culture to improve the quality of cereal-based fermented foods: trends in selection and application. *Current Opinion in Food Science*, 13, 38–43.
- Otles, S. and Cagindi, O.** (2012). Safety considerations of nutraceuticals and functional foods. In: M. Elhatton, P.J.A. Sobral (Eds.) *Novel technologies in food science* (pp. 121–36). New York, N.Y.: Springer.
- Peshev, D., Ende, W.V.** (2014). Fructans: Prebiotics and immunomodulators. *Journal of Functional Foods*, 8, 348–357.
- Petrova, P., Emanuilova, M., Petrov, K.** (2010). Amylolytic *Lactobacillus* strains from Bulgarian fermented beverage boza, *Zeitschrift fur Naturschung*. 65, 218-224.
- Petrova, P.M. ve Petrov, K.K.** (2011). Antimicrobial activity of starch-degrading *Lactobacillus* strains isolated from boza, *Biotechnology ve Biotechnological Equipment*, 25, 14-116.
- Peyer, L.C., Zannini, E., Arendt, E.K.** (2016). Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cerealbased beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 54, 17-25.
- Phillips, G.O., Cui, S.W.** (2011). An introduction: Evolution and finalisation of the regulatory definition of dietary fibre. *Food Hydrocolloids*, 25, 139–143.
- Pithva, S. Ambalam, P. Dave, J. M. Vyas, B.R.M.** (2011). Antimicrobial Peptides of Probiotic *Lactobacillus* strains. In: A.M. Vilas (Eds.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, (Vol. 1, pp. 987-991). Badajoz, Spain: Formatex Research Center.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pveey, A., Soccol, C.R.** (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41, 111–123
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B., Venkateshwar, M., Kumar, V.** (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation. *Biotechnology Advances*, 26, 22–34.

- Riblett, A.L., Herald, T.J., Schmid, K.A., Tilley, K.A.** (2001). Characterization of b-Conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. *Journal of Food Science and Agricultural Chemistry*, 49, 4983-4989.
- Rivera-Espinoza, Y. and Gallardo-Navarro Y.** (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27, 1–11.
- Roberfroid, M.B.** (2007). Prebiotics: The concept revisited. *Journal of Nutrition*, 137, 830–837.
- Ross, R. P., Morgan, S., Hill C.** (2002). Preservation ve fermentation: past, present ve future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3 – 16.
- Ruiz, J.C., Ancona, D.A.B., Camp, M.R.S.,** (2014). Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential. *Nutricion Hospitalaria*, 29, 776-784.
- Russell, D.A., Rossa, R.P., Fitzgerald., Stanton, G.F.C.** (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 88–105.
- Sadat-Mekmene, L., Genay, M., Atlan, D., Lortal, S., Gagnaire, V.** (2011). Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 1-13.
- Salmerón, I., Thomas, K., Pveiella, S. S.** (2015). Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition ve acceptance of fermented cereal beverages. *Journal of Functional Foods*, 15, 106–115
- Sanchez, J.I., Marzorati, M., Grootaert, C., Baran, M., Craeyveld, V.V. Courtin, C.M.** (2009). Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) affect the protein/carbohydrate fermentation balance and microbial population dynamics of the simulator of human intestinal microbial ecosystem. *Microbial Biotechnology*, 2, 101–113.
- Sanjukta, S. and Rai, A.K.** (2016). Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits, *Trends in Food Science and Technology*, 50, 1-10.
- Santos, C.C.A.A., Libeck, B.S., Schwan, R.F.** (2014). Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 186, 32–41.
- Senger, D.R., Li, D., Jaminet, S.C., Cao, S.** (2016). Activation of the Nrf2 cell defense pathway by ancient foods: disease prevention by important molecules and microbes lost from the modern western diet. *PLOS ONE* 11 (2): e0148042. doi:10.1371/journal.pone.0148042
http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0148042
- Sharma, S. Agrawal, N. Verma, P.** (2012). Miraculous health benefits of prebiotics *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3, 1544–1553.
- Silve N., Taniwaki M.H., Junqueira V., Silveria N., Nascimento M., Gomes R.** (2013). *Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual* (pp.151-167). New York: CRC Press.

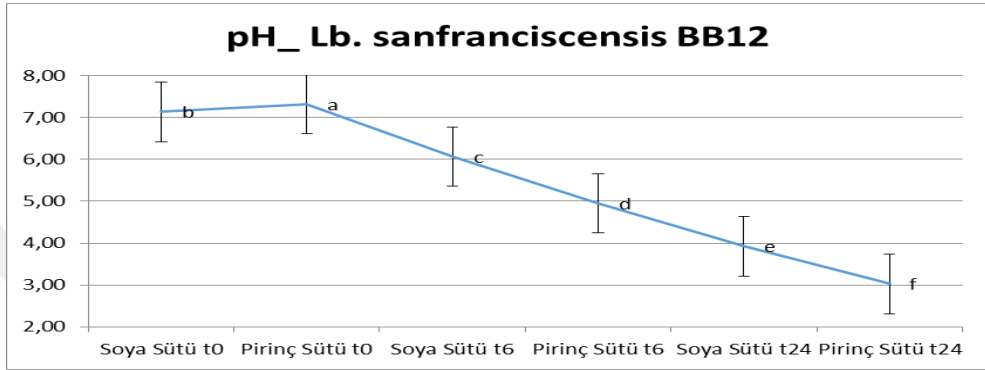
- Slavin J.** (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, *5*, 1417–1435.
- Solieri, L., Rutella, G.S., Tagliazucchi, D.** (2015). Impact of non-starter lactobacilli on release of peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities during bovine milk fermentation. *Food Microbiology*, *51*, 108-116.
- Songre, L.T., Mouquet-River, C. Icard-Verniere, C., Rochette, I., Diawara, B., Guyot, J.P.** (2009). Potential of amyolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut. *International Journal of Food Microbiology*, *130*, 258–264
- Songré-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Diawara, B., Guyot J.P.** (2009). Potential of amyolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut. *International Journal of Food Microbiology*, *130*, 258–264.
- Torino, M.I., Limón, R.I, Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde C., Frias, J.** (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, *136*, 1030–1037.
- Tosh, S.M., Miller, S.S.,** (2016). Health Effects of β -Glucans Found in Cereals. In: C., Wringley, H., Corke, K., Seetharaman, J. Faubion (Eds.), *Encyclopedia of World Grains*, (Vol. 2, pp. 236-241). Oxford, UK: Elseiver.
- Tripathi, M.K. and Giri, S.K.** (2014). Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, *9*, 225–241.
- Tsai, J.S., Lin, Y.S., Pan, B.S., Chen, T.J.** (2006). Antihypertensive peptides and aminobutyric acid from prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Process Biochemistry*, *41*, 1282–1288.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos, P., Kersters K, Swings J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Review*, *60*, 407–38.
- Vasudha, S. ve Mishra, H. N.** (2013) Non dairy probiotic beverages. *International Food Research Journal*, *20*, 7-15.
- Vattem, D. A. and Shetty, K.** (2003). Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry*, *39*, 367–379.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., Korhonen, H.** (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *102*, 106-115.
- Vos, A.P., Esch, B.C., Stahl, B., M'Rabet, Folkerts, L.G., Nijkamp, F.P., Garssen, J.** (2007). Dietary supplementation with specific oligosaccharide mixtures decreases parameters of allergic asthma in mice. *International Immunopharmacology*, *7*, 1582–1587.

- Vrese, M. and Marteau, P.R.** (2007) Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. *The Journal of Nutrition*, 137, 803-811.
- Wang, Y.C., Yu, R.C. and Chou, C.C.** (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 23, 128–135.
- Wang, Y.C., Yu, R.C., Chou, C.C.** (2002). Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiology*, 19, 501-508.
- Wang, Z., Li, H., Liang, M., Yang, L.** (2016). Glutelin and prolamin, different components of rice protein, exert differently in vitro antioxidant activities. *Journal of Cereal Science*, 72, 108-116.
- Weng, T. M., and Chen, M. T.** (2011). Effect of two-steps fermentation by *Rhizopus oligosporus* and *Bacillus subtilis* on protein of fermented soybean. *Food Science and Technology Research*, 17, 393-400.
- Wilburn, J.R. and Ryan, E.P.** (2017). Fermented foods in health promotion and disease prevention: An Overview. In U. Frías, C. M. Villaluenga, E. Peñas, (Eds.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 3-19). Colorado, Co: Academic Press.
- Wood, B. J. B.** (2003). Fermented Foods, Origins and Applications. In L. Trugo, and P. M. Finglas, (Eds.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 2330–2338) Glasgow, UK: Academic Press.
- Yu, B., Lu, Z.X., Bie, X.M., Lu, F.X., Huang, X.Q.** (2008). Scavenging and anti-fatigue activity of fermented defatted soybean peptides. *European Food Research and Technology*, 226, 415–421.
- Zhao, D. and Shah, N.P.** (2014). Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 58, 454-462.
- Zhoua, S. Liuc, X., Guob, Y., Wanga, Q., Pengc, D., Caob, L.** (2010). Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. *Carbohydrate Polymers*, 81, 784–789.
- Zubaidah, E., Nurcholisa, M., Wulan, S.N., Kusuma, A.** (2012). Comparative Study on Synbiotic Effect of Fermented Rice Bran by Probiotic Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus casei* ve Newly Isolated *Lactobacillus plantarum* B2 in Wistar Rats. *APCBEE Procedia*, 2, 170 – 177.

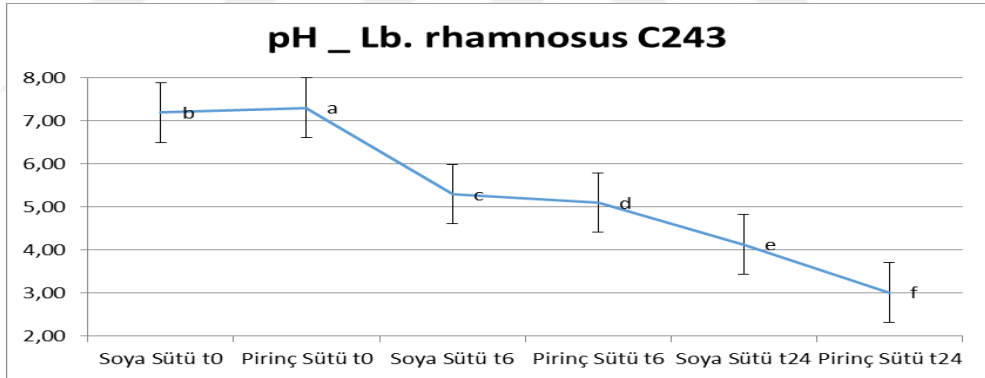


EKLER

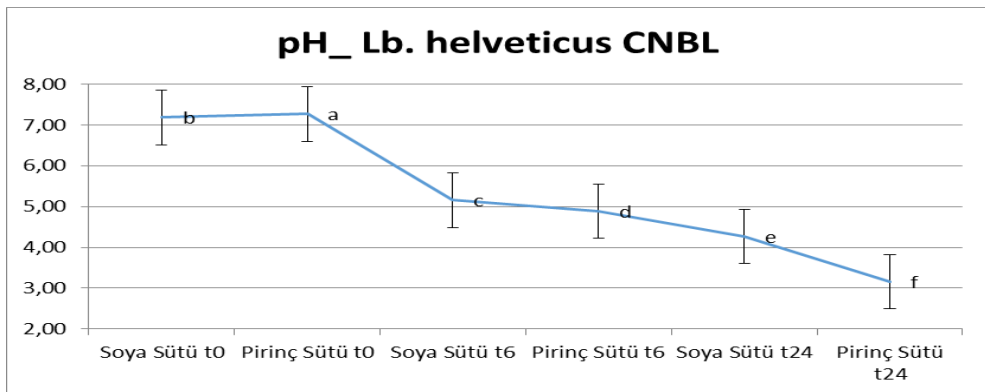
EK A: Her bir LAB Türünün Zamana ve Bitkisel Süt Çeşidine göre pH Değerleri Grafikleri



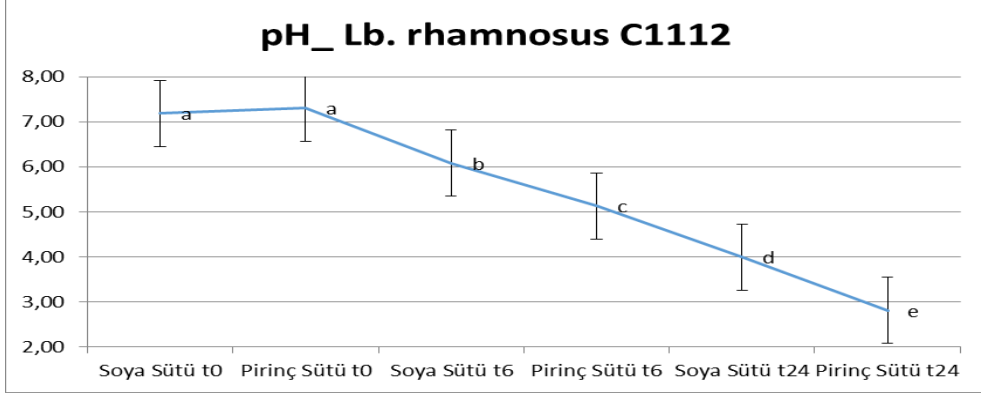
Şekil A. 1: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. sanfranciscensis* BB12'nin pH düşürme etkisi $p < 0,05$.



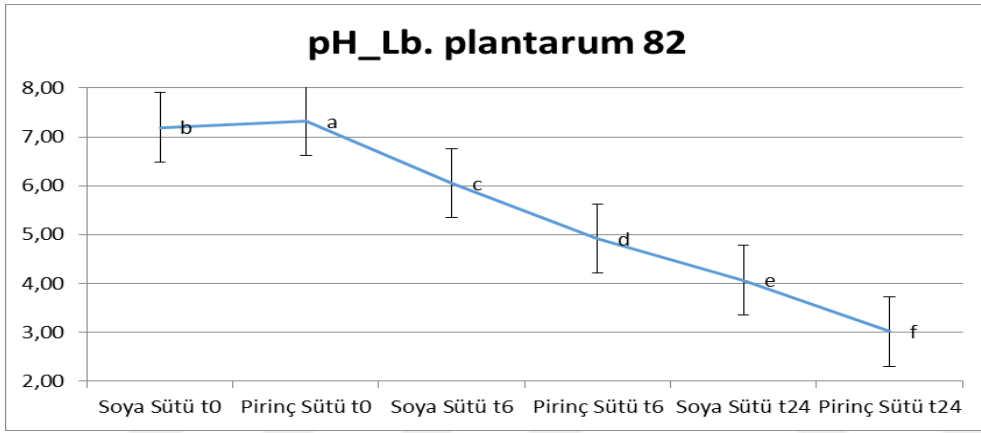
Şekil A. 2: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. rhamnosus* C243'ün pH düşürme etkisi $p < 0,05$.



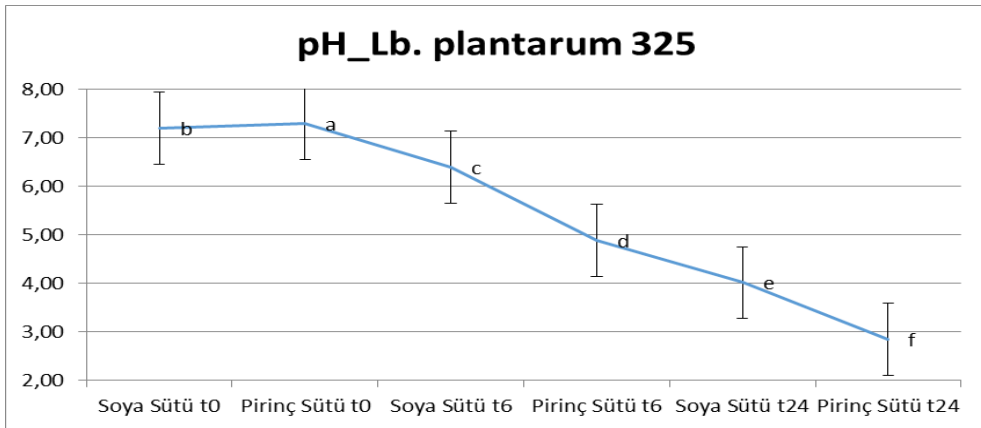
Şekil A. 3: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. helveticus* CNBL'in pH düşürme etkisi $p < 0,05$.



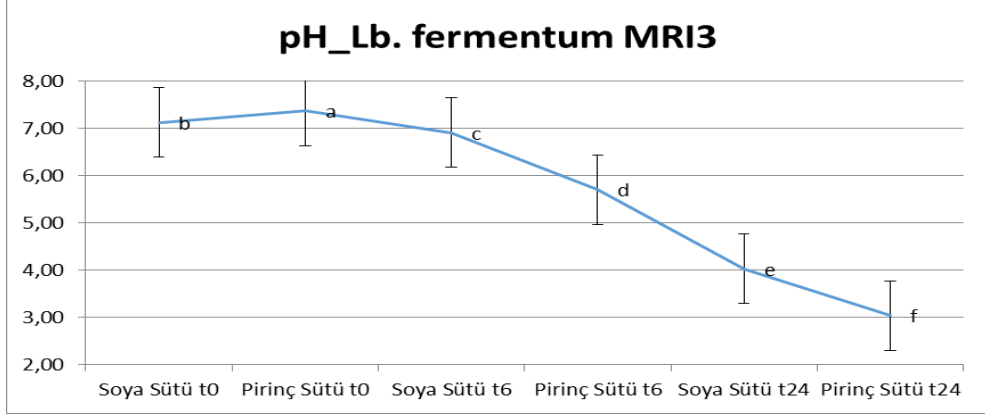
Şekil A. 4: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. rhamnosus C112*' in pH düşürme etkisi $p<0,05$.



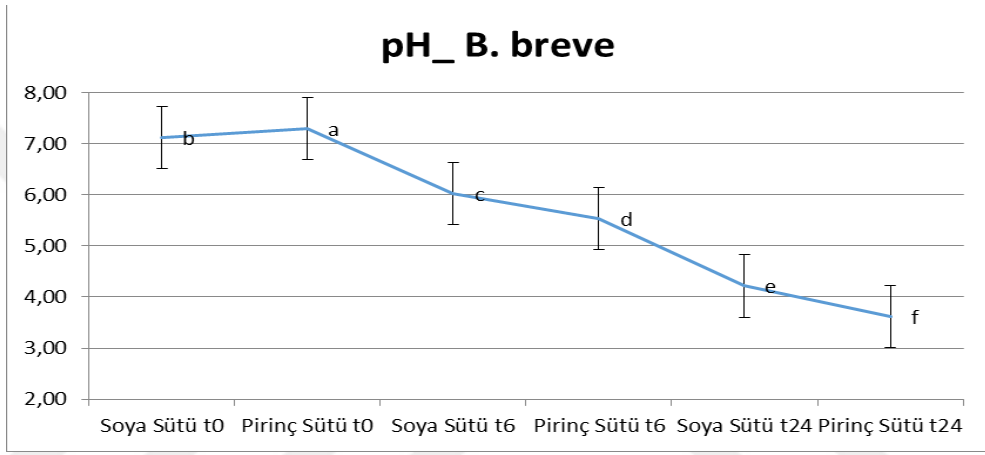
Şekil A. 5: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. plantarum 82*' in pH düşürme etkisi $p<0,05$.



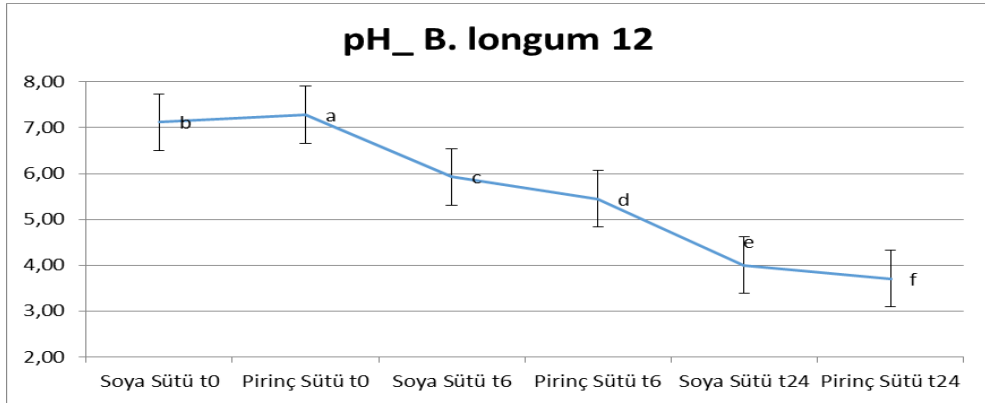
Şekil A. 6: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. plantarum 325*' in pH düşürme etkisi $p<0,05$.



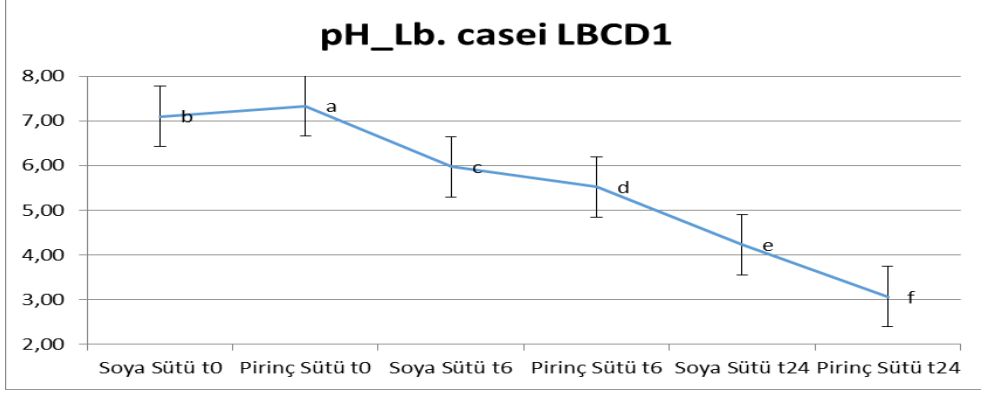
Şekil A. 7: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. fermentum MRI3*' in pH düşürme etkisi $p < 0,05$.



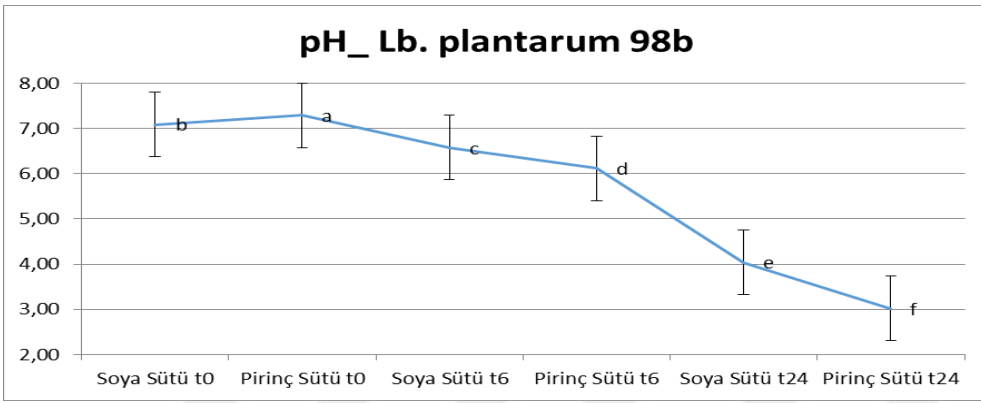
Şekil A. 8: Süt çeşidine ve zamana göre, *B. bifidum 700795*' in pH düşürme etkisi $p < 0,05$.



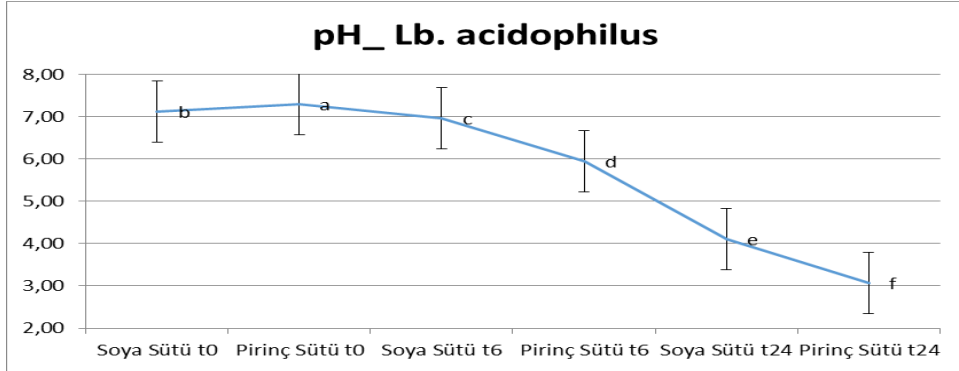
Şekil A. 9: Süt çeşidine ve zamana göre, *B. longum 12*' in pH düşürme etkisi $p < 0,05$.



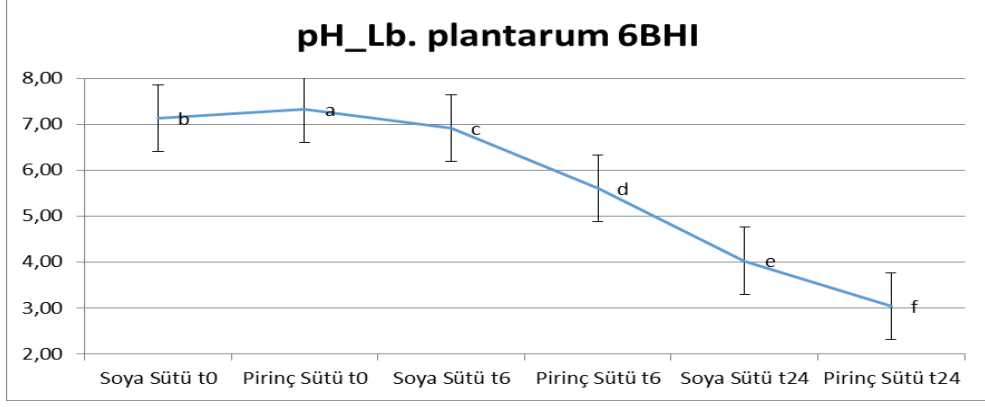
Şekil A. 10: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. casei* LBCD1 pH düşürme etkisi $p < 0,05$.



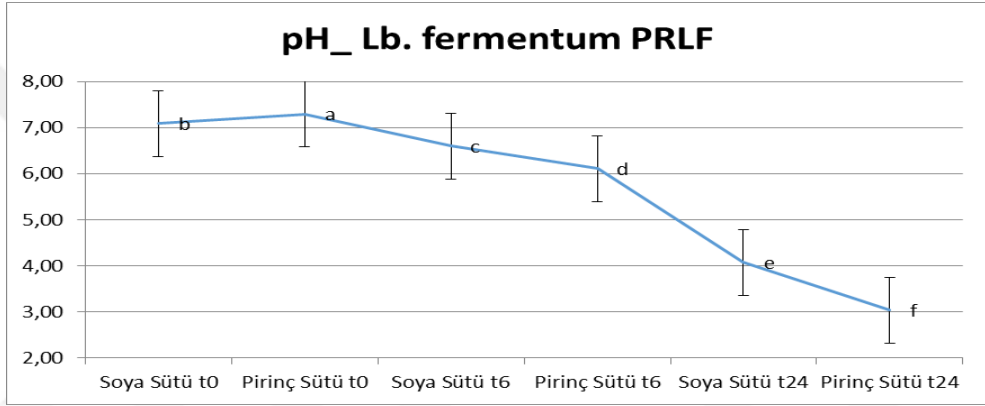
Şekil A. 11: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. plantarum* 98b' in pH düşürme etkisi $p < 0,05$.



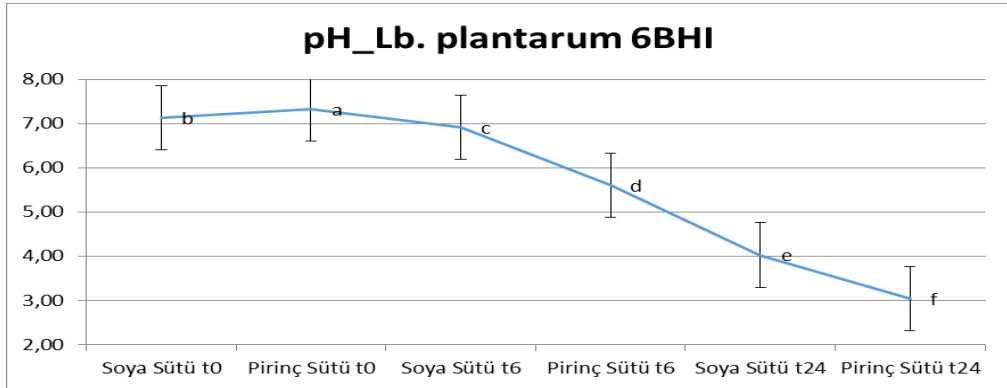
Şekil A. 12: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. acidophilus*' un pH düşürme etkisi $p < 0,05$.



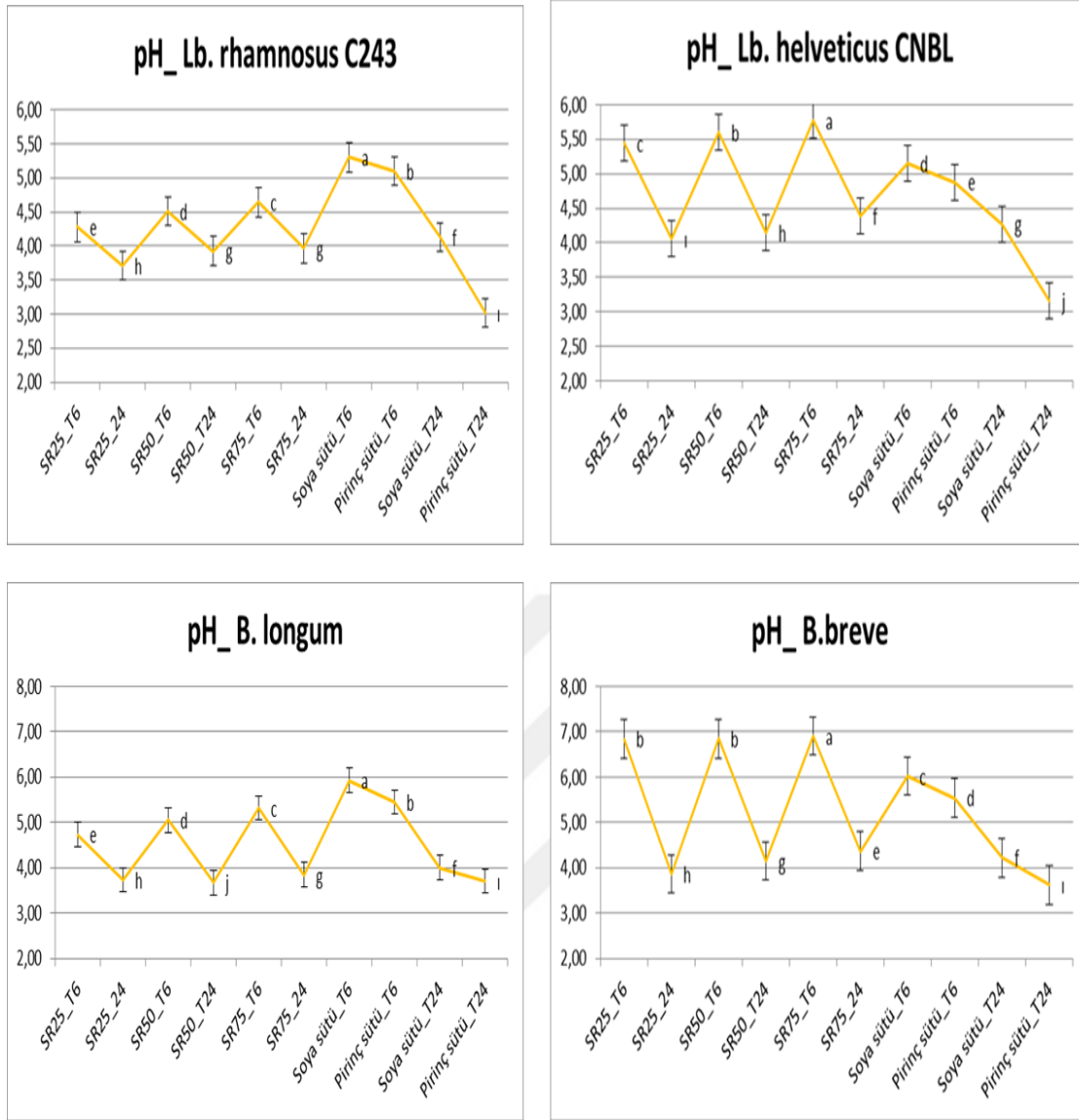
Şekil A. 13: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. plantarum* 6BHI'in pH düşürme etkisi $p < 0,05$



Şekil A. 14: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. fermentum* PRLF'in in pH düşürme etkisi $p < 0,05$.

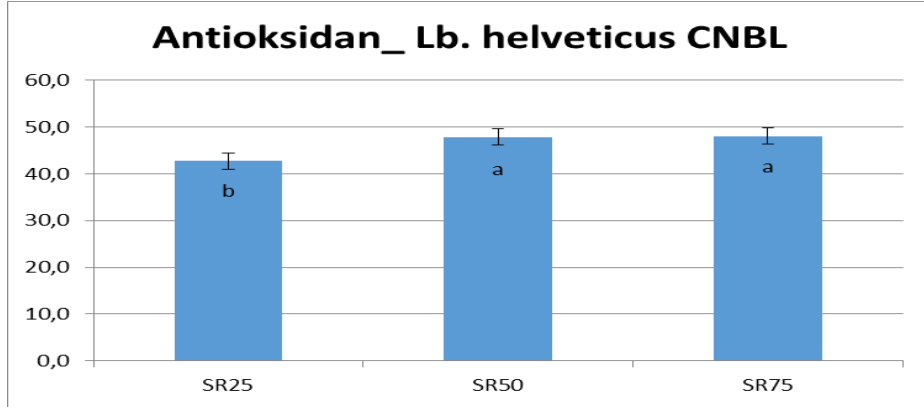


Şekil A. 15: Süt çeşidine ve zamana göre, *Lb. plantarum* 6BHI'in pH düşürme etkisi $p < 0,05$.

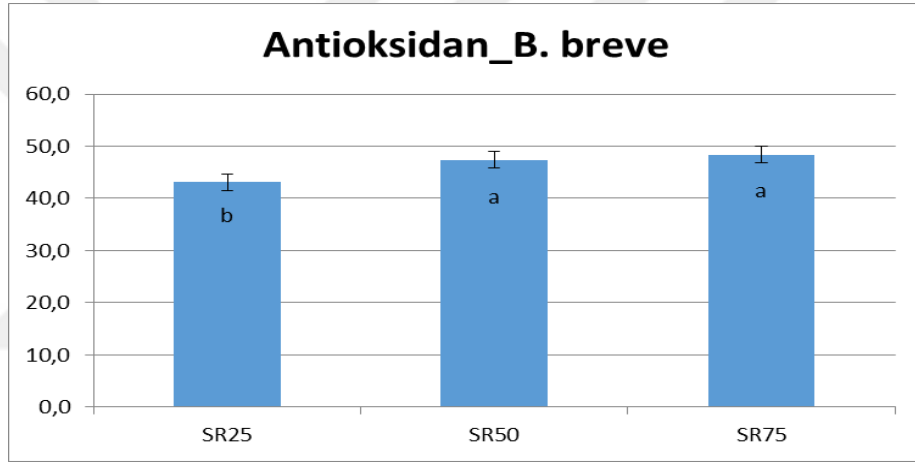


Şekil A. 16: Deneyin ikinci kısmında kullanılan inokülasyonların zamana ve süt karışımına göre pH değerine etkileri $p < 0,05$.

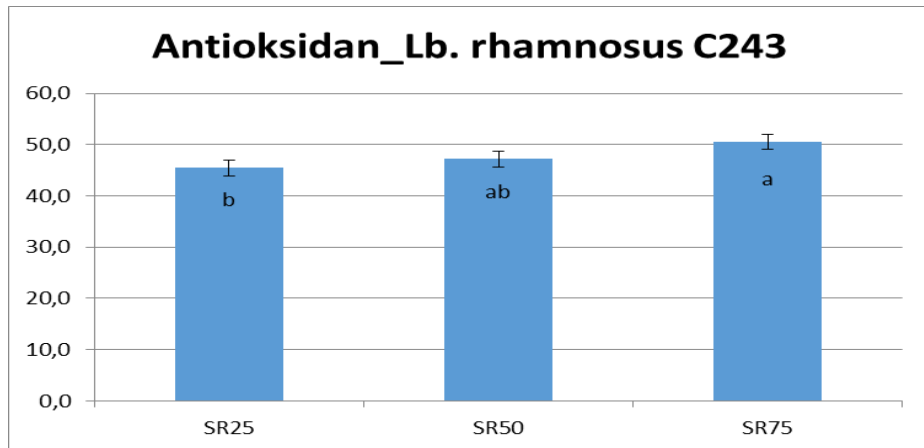
EK B : Bitkisel Süt Karışımlarının Oranın Fermantasyon Sonucundaki Antioksidan Aktiviteye Etkisi



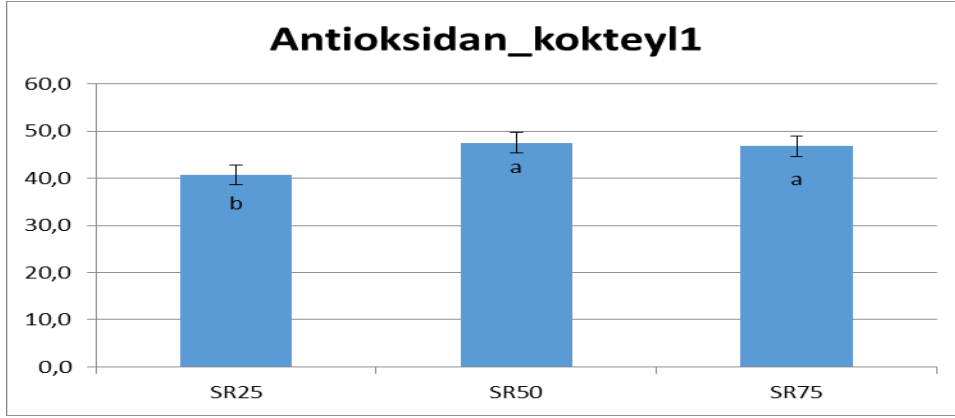
Şekil B. 1: *Lb. helveticus* CNBL ile fermente edilen süt karışımlarının antioksidan aktivitesi değerleri $p<0,05$.



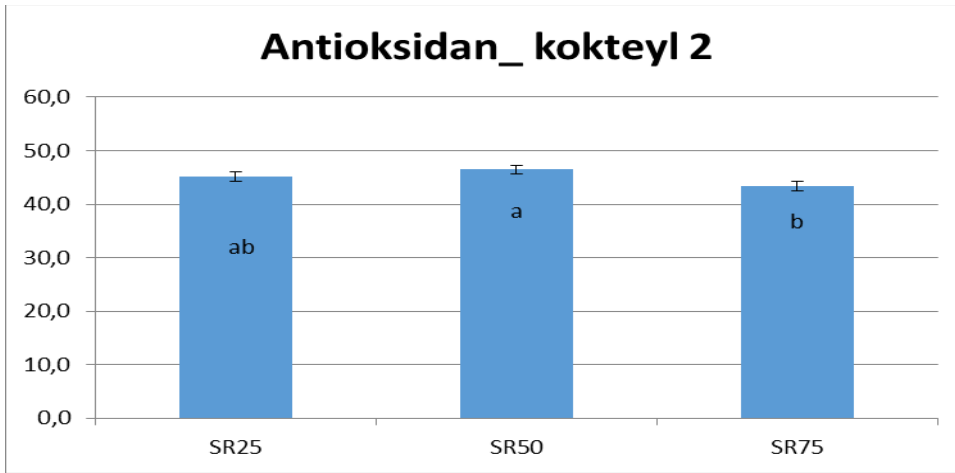
Şekil B. 2: *B. bifidum* 700795 ile fermente edilen süt karışımlarının antioksidan aktivitesi değerleri $p<0,05$.



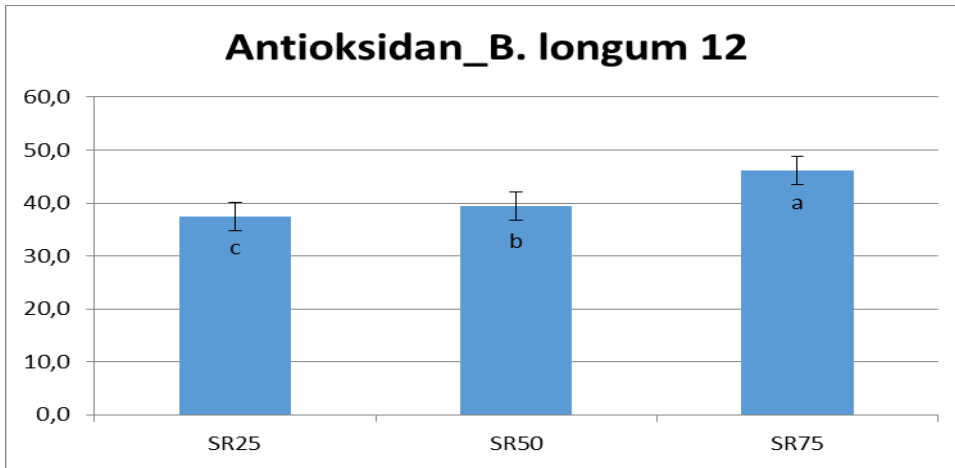
Şekil B. 3: *Lb. rhamnosus* C243 ile fermente edilen süt karışımlarının antioksidan aktivitesi değerleri $p<0,05$.



Şekil B. 4: *Lb. rhamnosus* C243+*Lb. helveticus* CNBL+ *B.bifidum* 700795 ile fermente edilen süt karışımlarının antioksidan aktivitesi değerleri $p<0,05$.



Şekil B. 5: *Lb. rhamnosus* C243+*Lb. helveticus* CNBL+*B. longum* 12 ile fermente edilen süt karışımlarının antioksidan aktivitesi değerleri $p<0,05$.



Şekil B. 6: *B. longum* 12 ile fermente edilen süt karışımlarının antioksidan aktivitesi değerleri $p<0,05$.

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad : Büşra Demircan
Doğum Tarihi ve Yeri : 01/09/1991, İstanbul
E-posta : demircan.busra@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, İTÜ, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği
- **Yükseklisans** : 2017, İTÜ, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM VE BAŞARILAR:

- Foodİnnova 2017 Konresi'nde poster yayını, konu "Plant milk substitute as potential prebiotic fermented and not fermented drink" Cesena, İtalya
- Polen Gıda, Gıda Mühendisi (Ekim 2015-Ocak 2016)
- SBS Bilimsel Bio Çözümler, Stajyer (Ağustos 2014-Eylül 2014)
- Melodi Çikolata, Stajyer (Haziran 2014-Ağustos 2014)
- Sanovel İlaç, Stajyer (Ağustos 2012- Eylül 2012)