T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROBİYOTİK TAŞIYICISI VİŞNE NEKTARI ÜRETİMİ VE FİZİKOKİMYASAL, FONKSİYONEL VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Perihan Kübra AKMAN

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK

Ağustos, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROBİYOTİK TAŞIYICISI VİŞNE NEKTARI ÜRETİMİ VE FİZİKOKİMYASAL, FONKSİYONEL VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Perihan Kübra AKMAN tarafından hazırlanan tez çalışması 03.08.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Hasan YETİM, Üye
İ. Sabahattin Zaim Üniversitesi _____

Prof. Dr. M. Zeki DURAK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Enes DERTLİ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Yonca YÜCEER, Üye
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Probiyotik Taşıyıcısı Vişne Nektarı Üretimi ve Fizikokimyasal,Fonksiyonel ve Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Perihan Kübra AKMAN

Biricik melek anneme (merhume)

ve

Kendini büyütmek zorunda kalmış bütün kız çocuklarına

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışması olarak sunmuş olduğum bu çalışmanın danışmanlığını üstlenen ve her aşamada benden desteklerini esirgemeyen, sonsuz sabır gösteren kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK'e, tez çalışmam boyunca laboratuvar alt yapısının bütün imkanlarını kullanmamı sağlayarak bana büyük kolaylık sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ'a ve Gıda Mühendisliği Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Muhammet ARICI'ya, tez çalışmam boyunca yapıcı eleştirileri ile beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi Üyeleri ve Jüri Üyeleri Sayın Prof. Dr. Hasan YETİM'e, Sayın Prof. Dr. M. Zeki DURAK'a, Sayın Prof. Dr. Enes DERTLİ'ye ve Sayın Prof. Dr. Yonca YÜCEER'e, tez çalışmamda özverili bir şekilde bana yardımcı olan değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Gülsüm UÇAK ÖZKAYA'ya, Dr. Öğretim Üyesi Görkem ÖZÜLKÜ'ye ve Öğr. Gör. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM'a, laboratuvar çalışmalarında bana destek olan kıymetli bursiyerlerimiz Sudenur ÜÇYILDIZ'a ve Beyzanur DEMİR'e teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmada kullanılan materyalleri kolaylıkla temin etmemizi sağlayan GÖKNUR GIDA A.Ş.'ne ve çalışmada proje desteği sağlayan TÜBİTAK'a (Proje No; TOVAG-120O203) teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak; manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme; sabrı, iyi niyeti ve koşulsuz sevgisi ile her zaman desteğini arkamda hissettiğim can yoldaşım eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Perihan Kübra AKMAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ ix

KISALTMA LİSTESİ x

ŞEKİL LİSTESİ xi

TABLO LİSTESİ xii

ÖZET xiv

ABSTRACT xvi

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti ... 1

1.2 Tezin Amacı ... 2

1.3 Hipotez ... 2

2 GENEL BİLGİLER 4

2.1 Giriş ... 4

2.2 Fermentasyon Teknolojisine Genel Bakış ... 4

2.2.1 Fermente Gıda Tüketiminin Sağlık Üzerine Etkileri ... 6

2.2.2 Fermente Meyve ve Sebze Ürünlerinde Mikrobiyota ... 8

2.3 Probiyotikler ... 10

2.3.1 Probiyotiklerin Sağlık Üzerindeki Etkileri ... 12

2.4 Probiyotik Taşıyıcısı Fermente İçecekler ... 15

3 MATERYAL VE METOT 23

3.1 Materyal ve Kimyasallar ... 23

3.2 Geleneksel şalgam ve gilaburu içeceklerinden laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu ve tanımlanması ... 23

3.2.1 LAB İzolasyonu ... 23

3.2.2 FTIR ve Cluster Analizi ... 24

3.2.3 İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu ve 16s rDNA Gen Analizi ... 24

3.3 LAB İzolatlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi ... 25

3.3.1 LAB İzolatlarının Caco-2 Bağırsak Epitel Hücrelerine Tutunma Kabiliyetlerinin İncelenmesi ... 25

3.3.2 Asit Tolerans Testi ... 26

3.3.3 Safra Tuzu Tolerans Testi ... 26

3.3.4 Taurodeoksikolat (TDC) Hidroliz Aktivitesi ... 26

3.3.5 Antimikrobiyal Aktivite ... 27

3.3.6 Antibiyotik Direnci 27
3.3.7 Pepsin ve Pankreatin Tolerans Testleri 27
3.3.8 Fruktoz ve Sakkaroz Kullanma Yetenekleri 28
3.4 Vişne Bazlı İçeceklerin Hazırlanması ve Fermentasyon Optimizasyonu .. 28
3.4.1 LAB'lerin Aktifleştirilmesi ve Vişne Bazlı İçeceklere İnokülasyonu 28
3.4.2 Fermentasyon İşlemleri ve Optimum Özelliklere Sahip Laktofermente Vişne Bazlı İçeceklerin Tespiti 30
3.5 Probiyotik Vişne Bazlı İçeceklerin Depolanması ve Karakterizasyonu 32
3.5.1 Probiyotik vişne bazlı içeceklerin hazırlanması ve fermentasyon işlemleri 32
3.5.2 Toplam LAB Sayısının Belirlenmesi 33
3.5.3 pH Değerinin ve Titrasyon Asitliğinin Belirlenmesi 33
3.5.4 Toplam Kuru Madde Tayini 33
3.5.5 Briks Tayini 33
3.5.6 Renk Analizi 33
3.5.7 Bulanıklık Tayini 34
3.6 Biyoaktif Özelliklerin Belirlenmesi 34
3.6.1 Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi 34
3.6.2 DPPH Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi 34
3.6.3 CUPRAC Yöntemi ile Toplam Antioksidan Kapasitenin (TAK) Belirlenmesi 34
3.7 Toplam Kalorinin Belirlenmesi 35
3.8 Sakkaroz ve Fruktoz Tayini 35
3.9 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi 35
3.10 Duyusal Analiz 35
3.11 Uçucu Bileşenlerin Belirlenmesi 36
3.12 Aroma Aktif Bileşenlerin Belirlenmesi 36
3.12.1 Gaz Kromatografisi Oflaktometri 37
3.12.2 Karakteristik Aroma Aktif Bileşenlerin GC-O Yöntemi ile Belirlenmesi 37
3.13 *in vitro* Sitotoksik Aktivite 38
3.14 Vişne bazlı içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının belirlenmesi 39
3.15 İstatistiksel Analizler 39

4 SONUÇLAR VE TARTIŞMA 41
4.1 FTIR, Kümeleme Analizi ve Tanımlama Sonuçları 41
4.2 LAB İzolatlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi 43
4.2.1 LAB İzolatlarının Caco-2 Bağırsak Epitel Hücrelerine Tutunma Kabiliyetleri 43
4.2.2 Asit Toleransı 45
4.2.3 Safra Tuzu Toleransı 46
4.2.4 TDC Hidroliz Aktivitesi 49
4.2.5 Antimikrobiyal Aktivite 50
4.2.6 Antibiyotik Direnci 51
4.2.7 Pepsin ve Pankreatin Toleransı 52
4.2.8 Fruktoz ve Sakkaroz Kullanabilme Yeteneği 54
4.3 Vişne Bazlı İçeceklerin Fermentasyon Optimizasyonu 55
4.3.1 Fermentasyon Süresi Optimizasyonu 55
4.3.2 Duyusal Özellikler 60
4.3.3 LAB Canlılığı 62
4.3.4 Kalori Değerleri 63
4.4 Vişne Bazlı Laktofermente İçeceklerin Depolanması 66
4.4.1 Briks 66
4.4.2 pH ve Titrasyon Asitliği 67
4.4.3 Kuru Madde 69
4.4.4 Renk 70
4.4.5 Bulanıklık 72
4.4.6 Biyoaktif Özellikler 73
4.4.7 Fenolik Bileşikler 76
4.4.8 Toplam Kalori Değeri 79
4.4.9 Fruktoz ve Sakkaroz İçeriği 81
4.4.10 Toplam LAB Sayısı 82
4.4.11 Antimikrobiyal Aktivite 83
4.4.12 Duyusal Özellikler 84
4.4.13 Aroma Profili 86
4.4.14 Aroma Aktif Bileşenler 89
4.4.15 Sitotoksik Aktivite 91
4.5 *in vitro* Biyoyararlılık 93

5 SONUÇ VE ÖNERİLER 100
KAYNAKÇA 103
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 119

SİMGE LİSTESİ

w	Ağırlık
kob	koloni oluşturma birimi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
g	Gram
v	Hacim
CO_2	Karbondioksit
L	Litre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molarite
nm	Nanometre
N	Normalite
sa	Saat
sn	Saniye
cm	Santimetre
dk	Dakika

KISALTMA LİSTESİ

LAB	Laktik asit bakterisi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
PCR	Polimer zincir reaksiyonu
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-SuSH10ophenyl)-2*H*-Tetrazolium-5-Carboxanilide
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
HCl	Hidroklorik asit
CHO	Karbonhidrat
CUPRAC	Bakır iyonu indirgeyici antioksidan güç
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle's ortamı
GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilebilir
CaCo2	İnsan kolorektal kanser hücre hattı
RNA	Ribonükleik asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
SOD	Süperoksit dismutaz
TAK	Toplam antioksidan kapasite
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
GCO	Gaz Kromatografi oflaktometri
TEAC	Troloks eşdeğer antioksidan kapasite
TE	Troloks eşdeğeri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Fermente gıdaların sağlık ile ilişkisi 7

Şekil 2.2 Probiyotik mikroorganizmaların bazı özellikleri 12

Şekil 4.1 Şalgam ve gilaburu örneklerinde izole edilen izolatların FTIR kümeleme analizi 42

Şekil 4.2 Ters mikroskop hücre görüntüleri (40x): (A) Caco-2 hücreleri; (B) Caco-2 hücrelerine tutunan bakteri hücreleri (a) ve tutunamayan bakteri hücreleri (b) 45

Şekil 4.3 LAB izolatlarının antibiyotik direnci 52

Şekil 4.5 LAB izolatlarının pepsin toleransı 53

Şekil 4.6 LAB izolatlarının pankreatin toleransı 53

Şekil 4.7 LAB izolatlarının fruktoz kullanım yeteneği (%) 54

Şekil 4.8 LAB izolatlarının sakkaroz kullanım yeteneği (%) 55

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Fermentasyon teknolojisinin tarihsel gelişimi..... 5
Tablo 2.2 Geleneksel fermente gıda türleri 6
Tablo 2.3 Çeşitli meyve ve meyve sularından izole edilen LAB türleri..... 9
Tablo 2.4 Probiyotik mikroorganizmalar 11
Tablo 2.5 Probiyotik taşıyıcı meyve/sebze bazlı içecek üretimi üzerine yapılmış çalışmalar 18
Tablo 3.1 Fermentasyon parametreleri 29
Tablo 3.2 Optimum özelliklere sahip olan vişne bazlı içecekler ve kodları..... 32
Tablo 4.1 PCR tanımlaması yapılan LAB izolatları 43
Tablo 4.2 LAB izolatları ve Caco-2 hücrelerine tutunma yetenekleri (%) 44
Tablo 4.3 LAB izolatlarının asit tolerans yetenekleri 46
Tablo 4.4 LAB izolatlarının safra tuzu (ST) tolerans yetenekleri..... 48
Tablo 4.5 LAB izolatlarının TDC hidroliz aktivitesi 49
Tablo 4.6 LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitesi 50
Tablo 4.7 SH5 izolatı (Lactiplantibacillus plantarum SH5) ile fermente edilen vişne bazlı içeceklerin LAB sayıları..... 56
Tablo 4.8 SH14 izolatı (Lactiplantibacillus pentosus SH14) ile fermente edilen vişne bazlı içeceklerin LAB sayıları..... 58
Tablo 4.9 SH10 izolatı (Limosilactobacillus fermentum SH10) ile fermente edilen vişne bazlı içeceklerin LAB sayıları..... 59
Tablo 4.10 Probiyotik vişne bazlı içecek örneklerinin genel beğeni değerleri.... 61
Tablo 4.11 Probiyotik vişne bazlı içeceklerdeki LAB sayısı (log kob/mL) 63
Tablo 4.12 Probiyotik vişne bazlı içeceklerin LAB sayıları ve duyusal özellikleri baz alınarak hesaplanan toplam skorları 64
Tablo 4.13 Fermente vişne nektarlarının toplam kalori değerleri ve % azalış oranı 65
Tablo 4.14 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin briks değerlerinin depolama boyunca değişimi..... 66
Tablo 4.15 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin pH değerlerinin depolama boyunca değişimi..... 67
Tablo 4.16 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin laktik asit cinsinden titrasyon asitlik değerleri 68
Tablo 4.17 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin kuru madde değerlerinin depolama boyunca değişimi 70

Tablo 4.18 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin renk değerlerinin depolama boyunca değişimi 71

Tablo 4.19 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin bulanıklık değerlerinin depolama boyunca değişimi 72

Tablo 4.20 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin biyoaktif özelliklerinin depolama boyunca değişimi 74

Tablo 4.20 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin biyoaktif özelliklerinin depolama boyunca değişimi (devamı) 75

Tablo 4.21 Laktofermente vişne bazlı içeceklerin depolama başlangıcındaki (0. gün) ve sonundaki (28. gün) fenolik profili 77

Tablo 4.21 (devamı) Laktofermente vişne bazlı içeceklerin depolama başlangıcındaki (0. gün) ve sonundaki (28. gün) fenolik profili..... 78

Tablo 4.22 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin toplam kalori değerlerinin depolama boyunca değişimi 80

Tablo 4.23 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin fruktoz ve sakkaroz içeriklerinin depolama boyunca değişimi 81

Tablo 4.24 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin LAB sayılarının depolama boyunca değişimi 82

Tablo 4.25 Probiyotik vişne bazlı içeceklerin B. cereus'a karşı antibakteriyel aktivitelerinin depolama boyunca değişimi (mm) 83

Tablo 4.26 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin duyusal özellikleri 85

Tablo 4.27 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin aroma profilleri..... 87

Tablo 4.27 (devamı) Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin aroma profilleri..... 88

Tablo 4.28 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin aroma aktif bileşenleri 90

Tablo 4.29 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi..... 92

Tablo 4.30 Vişne bazlı laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının depolama boyunca değişimi..... 94

Tablo 4.30 (devamı) Vişne bazlı laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının depolama boyunca değişimi..... 95

Tablo 4.30 (devamı) Vişne bazlı laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının depolama boyunca değişimi..... 96

Tablo 4.30(devamı) Vişne bazlı laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının depolama boyunca değişimi..... 97

Tablo 4.30 (devamı) Vişne bazlı laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının depolama boyunca değişimi..... 98

ÖZET

Probiyotik Taşıyıcısı Vişne Nektarı Üretimi ve Fizikokimyasal, Fonksiyonel ve Biyoaktif Özelliklerinin İncelenmesi

Perihan Kübra AKMAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK

Bu çalışmada, vişne bazlı probiyotik taşıyıcısı laktofermente içeceklerin üretimi amaçlanmıştır. Bu amaçla, geleneksel gilaburu ve şalgam içeceklerinden 41 adet laktik asit bakterisi (LAB) izolatı elde edilmiş ve FTIR tabanlı kümeleme analizi ve PCR tanımlaması sonucunda bunlardan 10 tanesi seçilerek probiyotik özellikleri belirlenmiştir. Aside dayanıklılık ve probiyotik özellikleri üstün olan 3 suş (*Lactiplantibacillus plantarum* SH5; *Limosilactobacillus fermentum* SH10; *Lactiplantibacillus pentosus* SH14) vişne bazlı içeceklerin fermentasyon optimizasyonunda kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında duyusal özellikler, LAB sayısı ve depolama süresince LAB canlılığı kriterleri esas alınarak optimum şeker oranı ve fermentasyon süre-sıcaklık koşulları belirlenmiştir. Bu aşamada optimum özelliklere sahip olan laktofermente vişne bazlı içecek örneklerinde %30'un üzerinde kalori düşüşü gerçekleşenler tespit edilmiş ve bunlar depolanarak bazı fizikokimyasal, biyoaktif, antioksidan, antimikrobiyal, antikanserojen ve duyusal özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca, fenolik ve aroma

profilleri ile aroma aktif bileşenleri analiz edilmiştir. Son olarak laktofermente vişne bazlı içecek örneklerinin biyoaktif ve antioksidan özelliklerinin *in vitro* sindirim sonrası stabiliteleri belirlenmiştir. Fermentasyonda görev alan LAB'leri vişne suyuna uyum sağlamış ancak fermentasyon ile popülasyonlarında büyük artışlar görülmemiştir. Vişne bazlı içeceklerde LAB sayısı, depolamanın başında yaklaşık 10^9 kob/mL iken 28 günlük depolamanın sonunda 10^6 kob/mL'nin altına düşmüştür. Fermentasyon ve depolama, örneklerin fizikokimyasal, biyoaktif, antimikrobiyal ve antikanserojen etkileri, aroma ve fenolik profilleri ile aroma aktif bileşenleri üzerinde önemli değişimlere ($P<0,05$) neden olmuştur. LAB fermentasyonu sonucunda vişne bazlı içeceklerin toplam fenolik madde değerlerinde istatistiki anlamda azalma ($P<0,05$) ve antioksidan kapasitelerinde ise artış ($P<0,05$) meydana gelmiştir. Yapılan deneylerde MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına karşı konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik aktivite gerçekleşmiş, ancak depolama sonucunda bu etkinin ortadan kalktığı görülmüştür. Laktofermente içecekler, soğukta depolama boyunca duyusal olarak kabul edilebilir nitelikte bulunmuş ve 8'lik skala ölçüsüne göre 6 ve üzeri skorlar elde etmiştir. Elde edilen bulgular, vişne nektarının alternatif probiyotik taşıyıcısı olma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Süt dışı probiyotik gıda, meyve bazlı içecek, laktofermente, vişne, düşük kalori

ABSTRACT

Production of a Probiotic Carrier Sour Cherry Nectar and Investigation of its Physicochemical, Functional and Bioactive Properties

Perihan Kubra AKMAN

Department of Food Engineering

Doctoral of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih TORNUK

In this study, sour cherry based a probiotic carrier lactofermented beverages were produced. For this purpose, 41 lactic acid bacteria (LAB) strains were isolated from traditional gilaburu and shalgam beverages, and as a result of FTIR-based clustering analysis and PCR identification, 10 of them were selected according to their probiotic properties. Three strains (*Lactiplantibacillus plantarum* SH5; *Limosilactobacillus fermentum* SH10; *Lactiplantibacillus pentosus* SH14) with favorable acid resistance and probiotic properties were used in the fermentation optimization of sour cherry-based beverages. In optimization studies, optimum sugar ratio and fermentation time-temperature conditions were determined based on sensory characteristics and LAB count and cell viability during the storage period. At this stage, lactofermented sour cherry-based beverage samples with optimum properties were found to have a calorie reduction of more than 30%, and their physicochemical, bioactive, antioxidant, antimicrobial, anticarcinogenic and sensory properties were determined during the storage. In addition, phenolic and aroma profiles and aroma active compounds were analyzed. Finally, *in vitro*

post-digestion stability of bioactive and antioxidant properties of lactofermented beverages were determined. LABs involved in fermentation were adapted to the sour cherry, but it was not observed significant increase in the population within fermentation. The LAB amount in cherry-based beverages was approximately 10^9 cfu/mL at the beginning of storage, but decreased below 10^6 cfu/mL at the end of 28 days of storage. Fermentation and storage caused statistically significant changes ($P<0.05$) on physicochemical, bioactive, antimicrobial and anticarcinogenic effects of the samples, and aroma and phenolic profiles, and aroma active compounds as well. As a result of LAB fermentation, a decrease in total phenolic content ($P<0.05$) and an increase in antioxidant capacity ($P<0.05$) occurred in sour cherry-based beverages. Concentration-dependent cytotoxic activity was acquired against the MCF-7 human breast cancer cell-line, but this effect disappeared at the end of the storage. Lactofermented beverages were sensoryally acceptable during the storage, and their achieved scores were 6 and/or above according to 8 of scale measures. The findings showed that cherry nectar has the potential to be an alternative probiotic carrier.

Keywords: Non-dairy probiotic food, fruit based drink, laktofermented, sour cherry, low calorie

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Dünya Sağlık Örgütü, yaşam kalitesini yükseltmek için günlük beslenmede taze sebze ve meyvelere mutlaka yer verilmesi gerektiğini ifade etmektedir. Meyve ve sebzeler içerdikleri yüksek oranlardaki mineraller, vitaminler, antioksidanlar, diyet lifler ve diğer fitokimyasallar ile oldukça değerli ve nispeten kolay ulaşılabilir gıda maddeleridir [1]. Meyveler taze tüketiminin yanı sıra kurutulmuş, konservelenmiş, meyve suyu, meyve nektarı, reçel veya marmelat gibi formlarda da yaygın olarak tüketilmektedir. Meyve bazlı içecekler her ne kadar vitaminler, mineraller ve diğer fitokimyasallar açısından zengin olsa da taze meyvelere kıyasla çok daha düşük oranda diyet lif içermesi, yüksek sakkaroz, fruktoz veya tatlandırıcı içermesi gibi faktörler nedeni ile tüketiciler için çok da sağlıklı olmayan ürünlerdir. Bunun yanında, bu tür içeceklerlerin aşırı tüketiminin, özellikle okul çağındaki çocuklarda obezite riskini artırdığına dair klinik çalışmalar da mevcuttur [2-4]. Günümüzde tüketici bilincinin artması, minimal işlenmiş ve daha sağlıklı olan gıda ürünlerine duyulan ihtiyacı da artırmıştır. Bu nedenle son yıllarda meyve sularını daha sağlıklı ve düşük kalorili hale getirmek için fermentasyon teknolojisinden yararlanılmaktadır. Fermentasyon ile meyve sularının şeker içeriği dolayısı ile kalorisi düşürülmekte, ayrıca yararlı mikrobiyal metabolitlerle zenginleştirilmektedir [5]. Fermentasyonda görev alan starter kültürlerin probiyotik özellikte olması; fermente edilen ürüne bakteriyosinlerden ve organik asitlerden kaynaklanan antimikrobiyal aktivitede artış, antioksidan aktivitede artış, biyoaktif peptitler, vitamin ve mineral gibi biyoaktif madde düzeylerinde yükselme ve antibesinsel öğelerin düzeyinde azalma gibi fonksiyonel özellikler kazandırmaktadır. Bunun yanında, meyve sularının iyi bir probiyotik taşıyıcısı olduklarına dair çeşitli çalışmalar da mevcuttur [6]. Dünyada ticari ölçekte üretimi yapılan çeşitli probiyotik taşıyıcısı meyve suları bulunmaktadır. Ülkemizde ise üretimi yapılan süt bazlı olmayan ticari fermente içeceklere örnek olarak şalgam,

boza, gilaburu ve hardaliye verilebilir. Bunlardan şalgam, fermentasyon sonrasında pastörize edildiği için probiyotik taşıyıcısı bir ürün olarak nitelendirilememektedir. Boza, laktik asit fermentasyonunun yanı sıra mayalar tarafından etanol fermentasyonunun da gerçekleştiği tahıl bazlı bir üründür. Hardaliye siyah üzüm ve hardalın fermentasyonu ile üretilen, özellikle Trakya bölgesinde lokal olarak ticari üretimi olan bir fermente içeceğimizdir. Gilaburu ise İç Anadolu Bölgesinde yetişen bir meyve türüdür ve fermente edilerek içecek olarak tüketilir. Bunların dışında ülkemizde meyve bazlı bir probiyotik taşıyıcısı içeceğimiz bulunmamaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada; vişne nektarı bazlı probiyotik taşıyıcısı laktofermente içeceklerin üretimi tasarlanmıştır. Bu amaçla hazırlanan meyve suları, asit tolerans ve fruktoz kullanma testlerine bağlı olarak seçilen probiyotik bakterilerle fermente edilmiş ve fermentasyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullara sahip laktofermente probiyotik taşıyıcısı içecekler soğukta muhafaza edilmiş ve bu süreçte ilgili bazı kalite parametreleri takip edilmiştir. Elde edilen vişne bazlı laktofermente içeceklerin raf ömrü süresince yüksek probiyotik bakteri sayısına sahip, duyusal olarak kabul edilebilir, biyoaktif özellikleri gelişmiş, kalorisi düşürülmüş ve *in vitro* biyoyararlılığının da yüksek olması hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Fonksiyonel gıda konsepti, son yıllarda sağlıklı yaşam ve sağlıklı beslenmenin önemli öğelerinden birisi haline gelmiştir. İnsanların bağırsak mikroflorasını olumlu yönde etkileyerek sağlığa faydalı olan mikroorganizmalar olarak tanımlanan probiyotiklerin taşıyıcısı olan gıda maddeleri, fonksiyonel gıda konsepti içerisindeki en önemli ve en popüler grubu oluşturmaktadır. Kefir ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin yanı sıra probiyotik taşıyıcısı olan meyve/sebzeler, tüm dünyada sağlıklı beslenmede önemli yer tutmaktadır. Vejetaryenlik, laktoz intoleransı, süt proteini alerjisi, sütteki kolesterol içeriği gibi çeşitli faktörler, süt bazlı fermente gıdalara karşı alternatif olarak meyve bazlı probiyotik taşıyıcısı ürünleri ön plana çıkarmaktadır. Bu nedenle, dünyada

duyusal olarak kabul edilebilirliği yüksek yeni probiyotik meyve/sebze bazlı içeceklerin geliştirilmesi için yaygın şekilde Ar&Ge çalışmaları yapılmaktadır.

Bu çalışmada, vişne bazlı probiyotik taşıyıcısı laktofermente içeceklerin üretimi amaçlanmıştır. Çalışma başarılı olursa; probiyotik içeriği yüksek, düşük kalorili ve biyoaktif özellikleri geliştirilmiş yeni bir laktofermente içecek türü tasarlanmış ve geliştirilmiş olacaktır.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Giriş

Meyve ve sebzeler; günlük diyette bulunması gereken vitaminler (suda eriyen vitaminler), mineraller, provitamin A, fitosteroller, diyet lifler ve fitokimyasalların temel kaynaklarıdır [1]. Buna ek olarak, tahıllarla birlikte meyve ve sebzelerin tüketimi kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet, Alzheimer, katarakt ve yaşlılığa bağlı olarak fonksiyon kaybı, hipertansiyon ve kaSH5 krizi gibi hastalık ve sağlık problemi risklerinin azalması ile ilişkilendirilmektedir [2, 3, 5, 7]. İnsanlar tarafından meyve ve sebzeler genellikle taze tüketilmekte olup bunun dışında endüstriyel olarak konserve, kuru meyve, meyve suyu, turşu, salça ve sos gibi formlara dönüştürülerek de insanların tüketimine sunulmaktadır. Taze ya da minimal işlem görmüş meyve ve sebzelerin tüketimi, sağlıklı bir yaşam için ulusal ve uluslararası sağlık kuruluşları tarafından özellikle taVNiye edilmektedir. Yine son yıllarda tüketici talepleri yüksek besin değerine sahip, sağlığı geliştirici ve aroması kuvvetli olan meyve/sebze kökenli yiyecek ve içeceklere yönelik artış göstermektedir. Bu ürünlerin hazırlanmasında fermentasyon teknolojisi de önemli yer tutmaktadır [6].

2.2 Fermentasyon Teknolojisine Genel Bakış

Fermentasyon; başta karbonhidratlar olmak üzere, büyük molekül yapısına sahip bileşenlerin mikroorganizmalar aracılığı ile daha küçük molekül yapılı bileşiklere dönüştürülmesini ve bu esnada gıdaların besinsel ve duyusal özelliklerinin geliştirilmesini kapsayan bir prosestir [8]. Fermente gıdalar, kontrollü şartlar altında mikrobiyal faaliyet ile çeşitli gıda bileşenlerinin enzimatik olarak farklılaşmaları sonucu ortaya çıkan gıda ürünleri olarak tanımlanabilir [9]. Fermentasyon prosesinin tarihçesi insanlık kadar eskidir. Antik çağa ait yazılı ve görsel bulgular, fermente gıdaların o dönemlerde dahi üretilip tüketildiğini göstermektedir [8]. Tablo 2.1'de fermentasyon teknolojisinin tarihçesi verilmiştir [10, 11].

Tablo 2.1 Fermentasyon teknolojisinin tarihsel gelişimi [10, 11]

Zaman	Proses/Ürün/Keşif	Ülke/Medeniyet
M.Ö. 3560-3530	Ekşi hamur ekmeği	İsviçre, Mezopotamya, Mısır
M.Ö. 3300-3200	Fermente süt ürünleri (Peynir, Tereyağı, Yoğurt)	Sümerler, Babil, Irak
M.Ö. 3000	Bira ve Laktik asit fermentasyonuyla elde edilmiş ürünler (Süt, Et, Balık, Sebze, Tahıl)	Akdeniz ülkeleri, Avrupa
M. Ö. 1500	Şarap	Fransa
0	Sirke (Şaraptan)	Hollanda
14. Yüzyıl	Endüstriyel Sirke üretimi (Orleans)	İsveç
1680	Mikroorganizmaların görüntülenmesi	İsveç
1780	Fermente sütten laktik asidin kimyasal olarak tanımlanması	Almanya
1818	Mayaların fermentasyon özellikleri	Fransa
1857	Laktik asit fermentasyonunu tanımlanması (Louis Pasteur)	İngiltere
1873	İlk bakteriyel saf kültür: *Bacterium lactis* (*Lactococcus lactis*) (Lister)	İngiltere
1879	Asetik asit bakterilerinin keşfi (Hansen)	Danimarka, Almanya
1881	Mikrobiyal yolla laktik asitin üretimi	Almanya
1890	Peynir ve Sauermilch için starter kültür izolasyonu ve çoğaltılması (Storch, Kopenhag/ Weigman, Kiel)	Almanya
1897	Mayalardaki fermentasyon enzimlerinin belirlenmesi (Buchner)	Almanya
19. Yüzyıl sonu	Atık su tesisi (Berlin)	Almanya
1914-1916	Endüstriyel gıda ve yem maksatlı maya üretimi	Almanya
1950-1960	Mikrobiyal fermentasyon yolu ile antibiyotik ve enzim üretimi	Amerika-İngiltere
1970-1980	Mikrobiyal fermentasyon yolu ile etanol ve sitrik asit üretimi	
2000-günümüz	Mikroalgal vb. biyokütle kaynaklarından enerji üretimi İnsan tüketimine uygun biyoaktif maddelerin ve nutrasötiklerin üretimi	Amerika

Fermentasyon, süreçte yer alan mikroorganizmaların enerjilerini sağlamak için gerçekleştirdiği bir dizi metabolik faaliyet olarak da tanımlanabilir. Fermentasyonda laktik asit bakterileri (LAB), asetik asit bakterileri, propiyonik asit bakterileri, mayalar ve küfler yer alabilir. Bu mikroorganizmalar insan

sağlığına riske atacak herhangi bir özellik taşımamalıdır. Bu açıdan fermentasyon prosesinde yer alan mikroorganizmalar GRAS (Generally Recognized as Safe) kategorisindedir ve kullanılması güvenilir kabul edilir [12, 13]. Fermentasyon teknolojisinde yer alan mikroorganizma türleri ve çeşitli fermente gıda örnekleri Tablo 2.2'de özetlenmiştir [14-19].

Tablo 2.2 Geleneksel fermente gıda türleri [14-19]

Ürün Grubu	Örnekler	Mikroorganizmalar
Süt ürünleri	Taze peynir, olgunlaşmış peynir, yoğurt, kefir, kımız, kurut	*Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Penicillium* spp., *Propionibacterium* spp., *Brevibacterium* spp., *Debaryomyces* spp.
Et ürünleri	Sucuk, jambon, ançüez	*Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus varians Vibrio costicola, Staphylococcus* spp. *Vibrio costicola*
Tahıl ürünleri	Ekmek, tarhana, boza, Kahamak, Jalebi, Dosa	*Saccharomyces cerevisiae, Brettanomyces bruxellensis, Lactobacillus* spp.
Meyve ve sebze ürünleri	Turşu, Sauerkraut, zeytin, kimchi, şalgam, hardaliye, gilaburu, sirke	*Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae, Brettanomyces bruxellensis*
Alkollü içecekler	Bira, şarap, viski, votka	*Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces marxianus, Lactobacillus* spp.
Diğer ürünler	Soya sosu, miso, tempeh, tofu	*Aspergillus oryzae, Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Zygosaccharomyces rouxii, Torulopsis* spp.

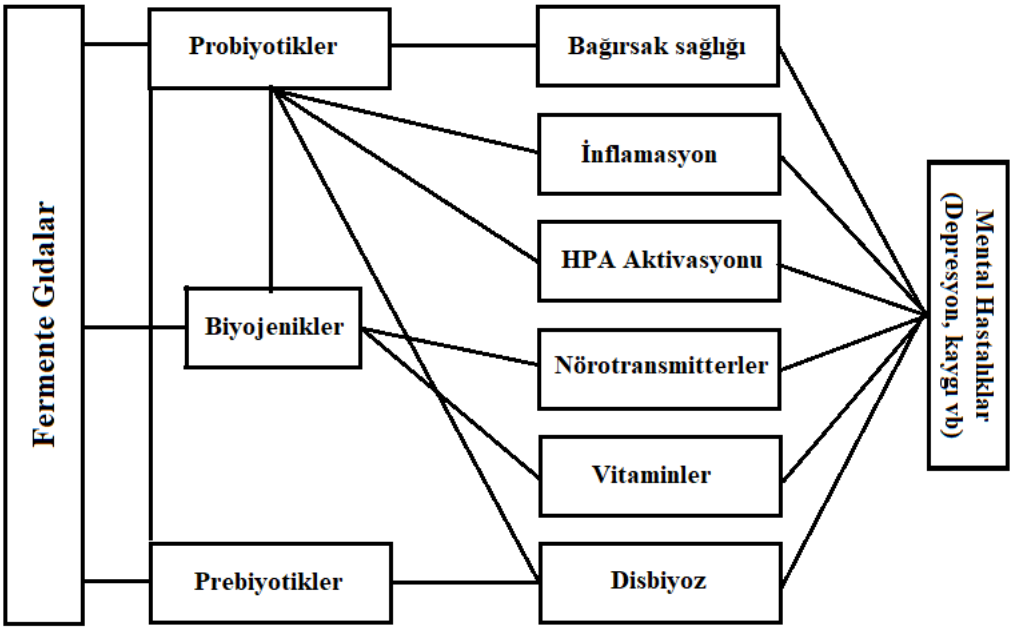
Tabloda verilen fermente gıda örneklerinden bazıları sadece bir coğrafyaya özgü iken (şalgam, tarhana, miso gibi), bazıları da bütün dünyada üretilmekte ve tüketilmektedir.

2.2.1 Fermente Gıda Tüketiminin Sağlık Üzerine Etkileri

Günümüzde sağlıklı beslenme bilincinin artması ile fermente gıda üretim ve tüketimine olan ilgi de artmaya başlamıştır. Dünyanın farklı bölgelerinde üretilen ve tüketilen fermente gıda çeşidi yaklaşık 3500'e kadar ulaşmıştır ve bu gıdaların günlük tüketim oranı %5-40 arasındadır [8]. Bugüne kadar yapılan bilimsel araştırmalar, düzenli olarak fermente gıda tüketiminin insan bağışıklığını desteklediğini ve metabolizma üzerinde iyileştirici etkilerinin olduğunu

göstermektedir. İnflamasyonların azalması, bağırsak mikrobiyotasının iyileştirilmesi, vücut kitle indeksinin ve kan basıncının iyileştirilmesi bu sağlık faydalarından bir kaçıdır [9]. Fermente gıdaların sağlık üzerindeki olumlu etkileri, içerdikleri çeşitli fonksiyonel bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Bu bileşenlerin sağlık ile ilişkisi Şekil 2.1'de verilmiştir [8]. Fermentasyon ile;

- Yağ, protein ve karbonhidrat gibi makro besinler yapıtaşlarına kadar parçalanabilmekte ve böylece sindirilebilirliği kolaylaşmaktadır.
- Vitamin ve minerallerin miktarı ve vücuttaki emilimi artmaktadır.
- Mikroorganizmalar bazı vitaminleri sentezleyebilmektedirler.
- Antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik ve antikanserojen gibi pek çok etkisi bulunan fenolik bileşenlerin biyoyararlanımı artmaktadır.
- Antibesinsel bileşenlerin, toksik maddelerin ve mikotoksinlerin olumsuz etkileri bertaraf edilmektedir.
- Ɣ-amino bütirik asit (GABA), seratonin ve biyoaktif peptitler gibi biyojenik bileşikler ve oligosakkaritler gibi prebiyotik bileşikler oluşmaktadır [13, 20-22].



Şekil 2.1 Fermente gıdaların sağlık ile ilişkisi [8]

Fermente ürünlerin sağlık üzerindeki yararlı etkileri besinsel bileşenlerin yanı sıra içerdikleri faydalı mikroorganizmalar ile de ilişkilidir. Fermente ürünlerin hepsi

üretildikten sonra fermentasyon mikroorganizmalarını içermeyebilir. Örneğin şarap, bira, ekmek, soya sosu, salam ve sucuk gibi bazı fermente ürünlere fermentasyon sonrasında ürünün raf ömrünü, kalitesini ve güvenilirliğini artırmak için ısıl işlem ve filtrasyon gibi prosesler uygulanır ve bu prosesler mikroorganizmaların inhibe olmasına neden olur. Bu tarz ürünlerde mikroorganizma aktivitesinin devam etmesi asitlik artışına, özellikle yağ ve proteinlerin ileri derecede parçalanarak istenmeyen duyusal özelliklerin ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu nedenle ısıl işlem gereklidir [16, 23, 24]. Diğer yandan, fermente ürünlerin tüketime kadarki süreçte faydalı mikroorganizmaları içermesi de önemli bir husustur. Dünyanın birçok yerinde üretilen ve tüketilen fermente ürünlerin mikroflorası ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu ürünlerin içerdikleri bazı mikroorganizma türlerinin probiyotik potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bazı bilim adamları ise bir mikroorganizma grubunun probiyotik olabilmesi için kaynağının hayvan veya insan olması gerektiğini söylemektedir [8]. Fermente gıdalarda bulunan faydalı mikroorganizmaların son üründe yüksek miktarda bulunması, sindirim sonrası gastrointestinal sistemde kolonize olması ve fayda göstermesi açısından önemlidir [24].

2.2.2 Fermente Meyve ve Sebze Ürünlerinde Mikrobiyota

Laktik asit fermentasyonu, meyve ve sebzelerin güvenilirliğini, raf ömrünü, duyusal ve besinsel özelliklerini artırmak amacıyla kullanılan, geçmişi çok eskilere dayanan geleneksel bir biyoteknolojik yöntemdir [25, 26]. Geleneksel şekilde üretilen ve tüketilen pek çok yiyecek ve içecekte, laktik asit fermentasyonundan yararlanılmaktadır ve fermentasyon sürecinde laktik ast bakterileri baş rolde yer almaktadır [27].

Çiğ meyve ve sebzelerin mikrobiyal popülasyonu genellikle 5-7 log kob/g düzeyindedir [28]. Sebzeler, karbonhidratça zengin proteince fakir ortamlar olup sebzelerin pH değerleri nötr - hafif asidik arasında değişmektedir [29, 30]. Bu durum, sebzeleri bakteri, maya ve küfler için uygun besin ortamı haline getirmektedir. Sebzelerin mikroflorasını büyük ölçüde bakteriler, özellikle de aerobik olanlar oluşturmaktadır [31]. Sebzelerin aksine meyveler kendilerine has

bir savunma mekanizmasına sahiptir. Meyvelerin sahip olduğu organik asitler, pH değerini 4,6 ve daha da altına indirmek için yeterli düzeydedir. Meyvelerin sahip oldukları pH değerleri, onların predominant mikrofloralarının oluşması üzerindeki başlıca etmendir. Aside toleranslı funguslar ve LAB'ler, meyvelerin doğal mikroflorasını oluşturmaktadır [32]. Çiğ ya da spontan fermentasyona uğramış meyve ve sebzelerden izole edilen LAB'ler; *Lactobacillus, Leuconostoc, Weissella, Lactococcus* ve *Pediococcus* gibi cinsler içerisinde yer almaktadır. Tablo 2.3'te çeşitli taze/fermente meyvelerden ve meyve sularından izole edilen LAB'ler ile ilgili örnek çalışmalardan alıntılar görülmektedir. Gıda kaynaklı patojen bakteriler, pH 4 ve altındaki değerlere sahip meyvelerde gelişme imkânı bulamamaktadır.

Tablo 2.3 Çeşitli meyve ve meyve sularından izole edilen LAB türleri

LAB Türü	Kaynak	Referans
Lactobacillus agilis	Hünnap	Nyanga vd. [33]; Di Cagno vd. [34]
Lactiplantibacillus plantarum	Hünnap, kiraz, konsantre kayısı suyu, havuç, ananas	Di Cagno vd. [31], Nyanga vd. [33], Di Cagno vd. [35], Campbell-Platt [36]
Lactococcus lactis	76 perakende sebze ve meyve	Kelly vd. [37]
Leuconostoc mesenteroides	Kiraz	Di Cagno vd. [34]
Pediococcus acidilactici	Kiraz	Di Cagno vd. [34]
Pediococcus pentosaceus	Kiraz	Di Cagno vd. [34]
Lactiplantibacillus fermentum	Konsantre kayısı suyu	Campbell-Platt [36]
Weissella soli	Havuç	Di Cagno vd. [31]
Lactobacillus rossiae	Ananas	Di Cagno vd. [31]

Karbonhidratlar, mineraller ve azotlu bileşikler gibi maddelerce zengin besin bileşimi ve düşük pH değerleri, meyvelerde LAB'lerin gelişimi için gerekli ortamı sağlarlar. Bu yüzden meyve suları, LAB'lerin gelişimi için çok uygun substratlar olarak değerlendirilirler [32].

2.3 Probiyotikler

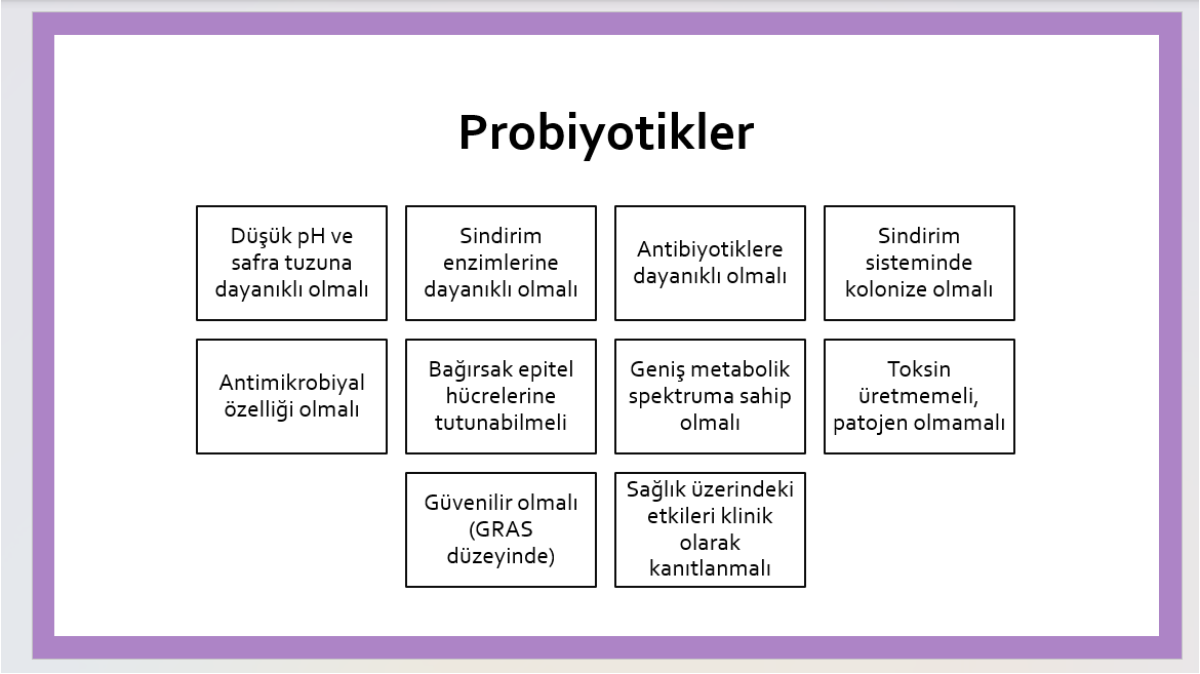
Probiyotikler, bağırsak sisteminin mikrobiyal florasını iyileştirerek insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler meydana getiren canlı mikrobiyal katkı olarak tanımlanmaktadır [38]. Probiyotik mikroorganizmaların çoğu *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsleri içerisinde yer alsa da probiyotikler bunlarla sınırlı değildir. Tablo 2.4'te probiyotik mikroorganizmalar görülmektedir. Günümüzde bu mikroorganizmalar çeşitli gıda ürünlerinde ve farmasötik alanda kullanılmaktadır [8, 39-41].

Tablo 2.4 Probiyotik mikroorganizmalar [8, 39-41]

Laktik asit bakterileri	*Bifidobacterium* spp.	Diğerleri
Lactobacillus acidophilus	*Bifidobacterium adolescentis*	*Bacillus cereus* var. *Toyoi*
Lb. amylovorus, Lb. johnsonii	*Bif. animalis*	*B. clausii, B. subtilis, B. coagulans*
Lb. helveticus, Lb. gallinarum	*Bif. breve*	*B. pumilus, B. licheniformis, B. alcolophilus*
Lb. delbrueckii spp. *bulgaricus*	*Bif. bifidum*	*B. laterosporus, B. polyfermenticus*
Lb. gasseri, Lb. crispatus	*Bif. infantis*	*Propionibacterium shermanii*
Lacticaseibacillus casei	*Bif. lactis*	*Prop. freundenreichii*
Lcb. paracasei, Lcb. rhamnosus	*Bif. longum*	*Prop. acidipropionici*
Lactiplantibacillus plantarum	*Bif. essensis*	*Prop. thoneii*
Latilactobacillus curvatus	*Bif. laterosporum*	*Prop. jensenii*
Levilactobacillus brevis	*Bif. thermophilum*	*Bacterioides amylophilus*
Limosilactobacillus fermentum	*Bif. Catenulatum*	*Bac. capillus, Bac. suis, Bac. uniformis*
Lilb. reuteri		*Bac. ruminicola, Bac. xylanisolvens*
Ligilactobacillus salivarus		*Escherichia coli Nissle*
Lactococcus lactis subsp. *lactis*		*Sporolactobacillus inulinus*
Lac. Lactis subsp. *cremoris*		*Akkermansia muciniphila*
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*		*Peptostreptococcus productus*
Pediococcus pentosaceus		*Clostridium butyricum*
P. acidilactici		*Faecalibacterium prausnitzii*
P. cerevisiae		*Saccharomyces boulardii*
Enterococcus faecalis		*Sacc. cerevisiae*
E. faecium		*Candida torulopsis*
Streptococcus thermophilus		

Lb: Lactobacillus, Lcb: Lacticaseibacillus, Lilb: Limosilactobacillus, Lac: Lactococcus, P: Pediococcus, E: Enterococcus, Bif: Bifidobacterium, B: Bacillus, Prop: Propionibacterium, Bac: Bacterioides, Sacc: Saccharomyces

Bir suşun probiyotik olarak nitelendirilebilmesi için bazı şartları taşıması gerekmektedir; örneğin insan sağlığına faydalı olması, aside ve safra tuzuna dirençli olması, insan epitel hücrelerine tutunabilmesi, bağırsaklarda kolonize olabilmesi, bakteriyosin denilen antimikrobiyal maddeleri üretebilmesi gibi. Bununla birlikte, probiyotik mikroorganizmaların tüketimi sonrası gastrointestinal sistemde canlı kalarak kolonize olması en önemli özelliktir [42]. Probiyotiklere ait çeşitli özellikler Şekil 2.2'de özetlenmiştir [43]. Probiyotikler için en önemli koşullardan bir tanesi de GRAS statüsünde yer almasıdır. Bu koşulların yanı sıra probiyotikler; düşük maliyetli olma, gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında canlı kalabilme, ürünlere uygulanabilme, fizikokimyasal proseslere karşı dirençli olma gibi arzu edilen özelliklere sahip olmalıdır [44].



Şekil 2.2 Probiyotik mikroorganizmaların bazı özellikleri [43]

Probiyotikler, günümüzde gıda endüstrisinde önemli bir ekonomik büyüklüğe sahip olup insanların sağlıklı yaşama konusunda bilincinin artması ile probiyotiklere olan ilgi de gittikçe artmaktadır.

2.3.1 Probiyotiklerin Sağlık Üzerindeki Etkileri

Son yıllarda probiyotiklere olan ilginin artması sonucu bu mikroorganizma grubunun sağlık üzerindeki etkileri de daha detaylı incelenmeye başlanmıştır. Sindirim sisteminin ve karaciğer işlevlerinin düzenlenmesinin yanı sıra mental

sağlık, diyabet, kolesterol, kanser ve inflamasyonlar üzerindeki olumlu etkileri probiyotik tüketiminin önemini göstermektedir [8].

2.3.1.1 Antidiyabetik Etki

Diyabet, günümüzdeki en büyük sağlık problemlerinden birisi olup, Tip 1 (insüline bağlı) ve Tip 2 (insüline bağlı olmayan) şeklinde sınıflandırılmaktadır. Yapılan hayvan deneyleri ve klinik deneyler, düzenli probiyotik kullanımının oksidatif stres, kan şekeri ve insülin direnci seviyelerini düşürerek, Tip 2 diyabetin geciktirilebileceğini ispatlamıştır. Ayrıca, probiyotiklerin şekerleri parçalama kabiliyetlerinin yüksek olması ve kısa zincirli yağ asitleri üretmesi de diyabetle savaşmada etkili rol oynamaktadır [45, 46].

2.3.1.2 Antikolesterol Etki

Kolesterol, hayvanların vücut dokularındaki hücre zarlarında bulunan ve kan plazmasında taşınan bir sterol, yani bir steroid ve alkol birleşimidir. Çoğunluğu vücutta sentezlenir. Bununla birlikte gıdalar yolu ile de vücuda alınır [47]. Kolesterol seviyesinin yükselmesi damar tıkanıklıklarına ve kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Probiyotik bakteriler, vücutta safra tuzunu hidrolize ederek serbest asitlere dönüştürür ve konjuge safra tuzlarının da sindirim sisteminden uzaklaştırılması ile kolesterol seviyesinin düşürülmesine yardımcı olur. Yapılan bilimsel çalışmalar ile, probiyotik bakterilerin safra tuzu hidrolaz enzimine ve genine sahip olmadığı ve böylelikle kolesterol düşürücü etkisinin olup olmadığı tespit edilebilmektedir [40].

2.3.1.3 Antioksidan Etki

Hücre içi serbest oksijen radikalleri bertaraf edilmezse lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verir ve bu durum "oksidatif stres" olarak ifade edilir. Probiyotik mikroorganizmaların süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GP) ve katalaz gibi antioksidan enzimleri üretebilmesinden dolayı serbest radikallerin azaltılması üzerinde etkisi vardır. Ayrıca glutatyon, bütirik asit ve folik asit gibi antioksidan bileşikler probiyotikler tarafından sentezlenebilmektedir. Bununla birlikte probiyotikler, çeşitli metabolik olayların işleyişinde aktif görev alarak serbest radikal oluşumuna engel olabilmektedir [48, 49].

2.3.1.4 Antikanserojen Etki

Kanser günümüzdeki en büyük sağlık problemlerinden biridir ve tedavi edilmesi oldukça zor bir hastalık türüdür. Pek çok kanser türü bağırsak mikrobiyotası ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasında kolonize olarak disbiyozu iyileştirmesi başta mide ve kolon kanseri olmak üzere, bazı kanser türlerinin iyileşmesine yardımcı olmaktadır [50]. Probiyotikler antikanserojen bileşikler üretmelerinin yanı sıra heterosiklik aromatik aminler, nitrozaminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve mikotoksinler gibi mutajen bileşenlere bağlanarak kanserojen etkilerini azaltır veya ortadan kaldırırlar [51, 52]. Bununla birlikte probiyotikler, kemoterapi ve cerrahi müdahaleler sonucu tahrip olabilen bağırsaktaki mukozal bariyerin onarılmasına yardımcı olur [53].

2.3.1.5 Antiinflamatuar Etki ve Bağırsak Sağlığı

İnflamatuar hastalıklar bağırsak sisteminin iltihaplanması ile ortaya çıkan kronik hastalıklardır ve karın ağrısı, sulu ve kanlı ishal gibi semptomları vardır. Chron hastalığı (CD) ve ülseratif kolit (UC) en bilinen inflamasyonlardır ve tamamen geçmelerini sağlayan bir tedavi çeşidi henüz yoktur [54]. Yapılan çalışmalarda probiyotiklerin bu tür hastalıklar üzerindeki etki mekanizması tam anlamıyla açıklanamasa da bağırsak mikrobiyotasını iyileştirmesi ve antimikrobiyal bileşenler üretmesi ile inflamasyona karşı terapötik etki gösterdikleri düşünülmektedir. Ayrıca, ürettikleri kısa zincirli yağ asitleri sayesinde kolon homeostazının korumasına katkıda bulunurlar [55, 56].

2.3.1.6 Bağışıklık Sistemi ve Mental Sağlık

Bağışıklık sistemi direncinin kaybolması sonucu Multipl skleroz (MS), Tip-1 diyabet, Lupus, romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklar ortaya çıkar [55]. Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek immün hücrelerinin uyarılmasına ve gerekli yanıtların oluşturulmasına; böylelikle bağışıklık sisteminin korunmasına katkıda bulunurlar [57].

Diğer yandan, tüm dünyada insanlar depresyon, kaygı, stres ve dikkat bozukluğu gibi mental rahatsızlıklarla mücadele etmektedir. Son yıllarda gerçekleştirilen bilimsel çalışmalar, merkezi sinir sistemi ve bağırsak mikrobiyotası arasında bir

ilişki olduğunu ve buna bağlı olarak mental rahatsızlıkların ortaya çıkabildiğini göstermiştir. Bağırsak mikrobiyotasında yer alan probiyotikler, nörotransmitterlerin sentezini etkiler ve bağırsak-beyin arasındaki çift yönlü iletişime katkıda bulunur. Bu şekilde nöral reaksiyonlarda rol oynayarak konakçının ruh hali üzerinde etkili olur [58]. Bununla birlikte probiyotikler, hormonlar ve bağışıklık reseptörlerinin stimüle edilmesinde de rol oynayarak konakçıda beyinsel aktivite ve bilişsel gelişime de etki ederler. Probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasını iyileştirmesi ile antiinflamatuar maddelerin, nörotransmitterlerin (GABA, serotonin, dopamin gibi) salgılanması artar ve kortizol gibi stres hormonlarının aktivitesi azalır. Böylece depresyon, kaygı, stres bozukluğu gibi durumlarda iyileşme görülür [59, 60]. Ayrıca Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda düzenli probiyotik kullanımı, motor sistemi işlev bozukluklarını önemli ölçüde azaltabilmektedir [55].

2.4 Probiyotik Taşıyıcısı Fermente İçecekler

Ticari olarak mevcut probiyotik taşıyıcısı fermente gıdaların önemli bir bölümünü yoğurt ve kefir gibi süt bazlı ürünler meydana getirmektedir. Bununla birlikte, vejetaryenlik, laktoz intoleransı, süt proteini alerjisi, sütteki kolesterol içeriği gibi çeşitli faktörlerden dolayı süt bazlı olmayan probiyotik taşıyıcısı gıdalara doğru bir talep artışı oluşmuştur [61]. Fermentasyonun gıdaları koruyucu, onların besin değerini iyileştirici ve duyusal özelliklerini geliştirici ucuz bir yöntem olması nedeniyle süt bazlı olmayan fermente içecekler insanların diyetinde önemli yer tutmaktadır [62]. Dünyada çok sayıda süt bazlı olmayan geleneksel fermente içecek bulunmaktadır. Bunların önemli bir kısmı ise hammadde olarak tahılların kullanıldığı alkolsüz içeceklerdir.

Ülkemiz, fermente meyve ve sebzeler bakımından oldukça zengin bir coğrafya olarak kabul edilebilir. Ülkemizde üretilen laktofermente içecekler arasında en yaygın olanları boza ve şalgam olup bunların endüstriyel olarak da üretimi söz konusudur. Bunların dışında, diğer meyve bazlı fermente içecekler hardaliye ve gilaburu da ülkemizin belli bölgelerinde ticari olarak üretilmekte ve tüketilmektedir.

Boza; Türkiye, Bulgaristan, Arnavutluk ve Romanya gibi ülkelerde üretilmekte ve tüketilmekte olan, hammadde olarak buğday, arpa, mısır vb. tahılların şeker ile karıştırılıp fermente edilmesi ile üretilen tatlı-ekşimsi bir fermente içecektir [63]. Bozada fermentasyon doğal olarak bulunan LAB ve mayalar tarafından sağlanmaktadır. Hancioğlu ve Karapinar [64], bozada 2 *Saccharomyces* suşuna ek olarak 70'i heterofermentatif 7'si homofermentatif olmak üzere toplam 77 LAB izole etmiştir. Çalışmalar, bozadan izole edilen LAB'lerin genellikle *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* cinslerine dahil olduğunu ortaya koymuştur [65].

Gilaburu, Türkiye'de başta Kayseri olmak üzere, Konya, Bursa, Sakarya, Ankara, Tokat, Sivas, Trabzon, Çorum, Maraş, Kırşehir, İstanbul, İzmir, Erzurum ve Samsun illerinde doğal olarak yetişen bir çalı bitkisinin meyvesidir. İçerdiği yüksek düzeydeki fenolik maddelerden dolayı buruk bir tada sahip olan gilaburu, bu dezavantajına rağmen İç Anadolu'da geleneksel olarak fermente edilerek içecek üretiminde kullanılmaktadır. Gilaburu suyu hakkında yapılan çalışmalar sınırlıdır. Yapar [66] tarafından yapılan çalışmada, geleneksel olarak fermente edilen gilaburu meyvesinin suyundan izole edilen LAB'lerin endüstriyel standart fermente gilaburu suyu üretiminde kullanım olanakları araştırılmıştır. Çalışmada toplanan ve doğal yolla fermente edilen gilaburu örneklerinden 6 farklı türde toplam 21 adet izolat elde edilmiş olup bu izolatların %47,62 ile büyük çoğunluğunu *Lb. plantarum* oluşturmuştur. Yapılan testler sonucu seçilen izolatlardan 7 farklı kültür ya da kültür kombinasyonu belirlenmiş, bunlar laboratuvar şartlarında ticari pastörize gilaburu suyuna inoküle edilerek standart fermente meyve suyu üretim denemeleri yapılmıştır. Üretim süreci sonunda 10 gün süreyle buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir. Deneme meyve suyu numunelerinde soğukta muhafaza sonrası canlı logaritmik LAB sayıları 6,39 ile 7,65 kob/mL arasında tespit edilmiştir. Duyusal testler sonucunda, genel beğeni olarak en yüksek puanı *Lb. plantarum* izolatı içeren test numunesi almıştır ve bunu *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* ve *Lb. brevis* izolatı içeren test numuneleri izlemiştir.

Şalgam; anavatanı Türkiye, özellikle Adana, Mersin, Hatay ve Kahramanmaraş illeri olan, hammadde olarak kara havuç, turp, ekşi hamur, bulgur unu ve sudan laktik asit fermentasyonu ile üretilen kırmızı renkli, bulanık ve ekşi bir içecektir

[67]. Geleneksel yöntemle üretilen şalgamların fermentasyonunda rol oynayan dominant LAB'lerin *Lb. plantarum, Lb. arabinosus, Lb. brevis* ve *Lb. paracasei* spp. *paracasei* olduğu ifade edilmiştir [68]. Geleneksel şalgamların fermentasyon aşamasında rol oynayan LAB'ler üzerinde yapılan bir çalışmada, fermentasyonun birinci ve ikinci aşamasında dominant LAB'nin *Lb. plantarum* olduğu, ondan sonra *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* geldiği belirlenmiştir. Bazı fermentasyonlarda *Lb. brevis* ve *Lb. fermentum* da izole edilmiştir. *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides, Pediococcus pentosaceaceus* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* fermentasyonun başında tespit edilmiş, fermentasyonun sonraki aşamalarında canlılığını kaybetmiştir [69].

Hardaliye, ülkemizin özellikle Trakya bölgesinde yüzyıllardır bilinen ve üretilen, hammadde olarak ezilmiş siyah hardal ile karıştırılmış siyah üzümün kullanıldığı bir fermente içecektir. Geleneksel hardaliye üretiminde, üzümler yıkanır ve preslenir. Daha sonra üzüm suyuna % 0,2 oranında ezilmiş siyah hardal ve/veya % 0,1 benzoik asit karıştırılır ve karışım 5-10 gün oda sıcaklığında spontan fermentasyona tabi tutulur. Elde edilen ürün 4 °C'de muhafaza edilir. Ürünün son pH'sı 3,21-3,97 arasındadır [70]. Hardaliyenin LAB yükü 1×10^{2}-4×10^{4} kob/mL arasında değişmekte olup hardaliye örneklerinden *Lb. paracasei* subsp. *paracasei, Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum, Lb. pontis, Lb. brevis, Lb. acetotolerans, Lb. sanfrancisco* ve *Lb. vaccinostercus* izole edilmiştir [71].

Ülkemizdeki meyve-sebze bazlı ticari laktofermente içecek olarak ilk akla gelenler yukarıda kısaca bilgileri verilen ürünler lokal olarak üretilip tüketilmekte olup bunların ticari hacimleri ile ilgili yeterli bilimsel veri mevcut değildir.

Ülkemizde ve dünyada laktofermente ve/veya probiyotik taşıyıcısı meyve-sebze bazlı içecek üretimine yönelik çeşitli bilimsel araştırmalar ve denemeler yapılmıştır. Bunlar ile ilgili özet bilgiler Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.5 Probiyotik taşıyıcı meyve/sebze bazlı içecek üretimi üzerine yapılmış çalışmalar

Ürün	Probiyotik mikroorganizma	Bakteri sayısı	Referans
Kaju elması suyu	*Lacticaseibacillus casei*	~8 log	Pereira vd. [72]
Havuç suyu	*B. lactis* Bb-12, *B. bifidum* B7.1 ve B3.2	~8 log	Kun vd. [73]
Şeker kamışı suyu	*Lactobacillus acidophilus, Lcb. casei, Lb. delbrueckii, Lactiplantibacillus plantarum*	10^6 - 10^8 kob/mL	Yoon vd. [74]
Lahana suyu	*SH5b. plantarum* C3, *Lcb. casei* A4, *Lb. delbrueckii* D7	10^7 - 10^8 kob/mL	Yoon vd. [74]
Havuç suyu	*SH5b. plantarum*	$3x10^5$ kob/mL	Demir vd. [26]
Malt bazlı içecek	*Bifidobacterium* sp.	-	Rozada-Sánchez vd. [75]
Havuç ve salatalık suyu	*SH5b. plantarum*	-	Kurtar [76]
Karpuz suyu	*Lb. helveticus* NRRL B-4526, *Lb. acidophilus* KPb4b, *SH5b. plantarum*	~10 log kob/mL	Öztürk [77]

Dünyada ticarileşmiş probiyotik meyve/sebze bazlı içeceklere çeşitli örnekler verilebilir:

1. Tropicana® probiyotik şeftali, çilek ve ananas suyu: Ürün açıklamasında, her porsiyonda 1 milyar canlı *Bifidobacterium lactis* bulunduğu belirtilmektedir. Ürüne şeker ya da herhangi bir yapay tatlandırıcı ilave edilmemektedir. pH bilgisi yoktur, 26-29 g şeker, % 4 diyet lif (sadece şeftali), 130-140 kcal kalori içermektedir. (http://www.tropicana.com/products)
2. Suja® preslenmiş probiyotik ahududu, çilek, portakal/zencefil, ananas/limon/arnavutbiberi, zencefil/ıhlamur suyu: Ürün açıklamasında, 2 milyar kob düzeyinde probiyotik bulunduğu ve üründe herhangi bir katkı maddesinin bulunmadığı ifade edilmektedir. pH bilgisi yoktur, 1 g şeker, %

0 diyet lif, 5 kcal kalori değerine sahiptir. (https://www.sujajuice.com/product-category/pressed-probiotic-waters/)

3. GoodBelly® probiyotik içeren mango, yabanmersini/acai çileği, nar/böğürtlen, kızılcık/karpuz, limon/ıhlamur, portakal, Hindistan cevizi, suyu: Ürünler probiyotik bakteri olarak *Lactobacillus plantarum* içermektedir. Ürünlerin aroma ve tekstürünü ayarlamak amacıyla sitrik asit, doğal tatlandırıcılar ve guar gam gibi çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ürünler diyet lif içermemektedir. pH bilgisi yoktur, % 13-26 g şeker, 60-120 kcal kalori içermektedir. (http://goodbelly.com/by-the-glass/)

4. Kevita® *root beer* (alkolsüz bira) adı ile piyasaya sunulan, zencefil, tarçın, astragalus, saparna gibi bitki ekstraktları, pancar şekeri, elma sirkesi ve saf su gibi çeşitli hammaddelerden üretilen probiyotik içecek: Daha önceki örneklerden ve bu projede tasarlanan probiyotik içeceklerden farklı olarak bitkisel ekstraktların su içerisinde çözündürülmesi ve şeker ilavesi ile üretilen ticari içecektir. *Bacillus coagulans, Lb. rhamnosus, Lb. plantarum* ve *Lb. paracasei* içermektedir. Üründe 4 milyar kob/mL koloni olduğu ifade edilmektedir. % 0 meyve suyu içermektedir. pH değeri belirtilmemiştir, 15-25 kcal enerji değeri vardır. (http://kevita.com/products/sparkling-probiotic-drink/)

5. Kevita® *Hibiscus berry* adı ile piyasaya sunulan, amberçiçeği konsantresi, ahududu suyu konsantresi, kurt üzümü, amberçiçeği, kuşburnu, stevya ve sardunya ekstraktları, elma sirkesi ve saf su gibi çeşitli hammaddelerden üretilen probiyotik içecek: Daha önceki örneklerden ve bu projede tasarlanan probiyotik içeceklerden farklı olarak bitkisel ekstraktların su içerisinde çözündürülmesi ile üretilen ticari içecektir. Şeker ilavesi yoktur. *Bacillus coagulans, Lb. rhamnosus, Lb. plantarum* ve *Lb. paracasei* içermektedir. Üründe 4 milyar kob/mL koloni olduğu ifade edilmektedir. % 0 meyve suyu içermektedir. pH değeri belirtilmemiştir, 5 kcal enerji değeri vardır. (http://kevita.com/products/sparkling-probiotic-drink/)

6. Kevita® nar: Nar suyu konsantresi, meyve-sebze suyu (renk için), nar aroması, stevya ekstraktı, saf su ve elma sirkesi ile üretilen probiyotik içecektir. Şeker ilavesi yoktur. *Bacillus coagulans, Lb. rhamnosus, Lb. plantarum* ve *Lb. paracasei* içermektedir. Üründe 4 milyar kob/mL koloni olduğu ifade edilmektedir. % 17 meyve suyu içermektedir. pH değeri belirtilmemiştir, 25 kcal enerji değeri vardır. (http://kevita.com/products/sparkling-probiotic-drink/)

7. Farmhouse gut shot® *classic caraway*: Yeşil lahana ve topraksı kimyona su ve deniz tuzu ilavesi ile üretilen probiyotik içecek. Bir şişelik porsiyonda (44 mL) 110 milyar canlı bakteri (*Lb. pentosus/plantarum, Lb. paraplantarum, Lb. koreensis, Lb. brevis, Lb. hammesii*) olduğu ifade edilmektedir. pH değeri belirtilmemiştir, <%1 şeker ve 5 kcal enerji değerine sahiptir. (https://www.farmhouseculture.com/gut-shots)

8. Farmhouse gut shot® *garlic dill pickle*: Yeşil lahana, salatalık ve dereotuna su ve deniz tuzu ilavesi ile üretilen probiyotik içecek. Bir şişelik porsiyonda (44 mL) 110 milyar canlı bakteri (*Lb. pentosus/plantarum, Lb. paraplantarum, Lb. koreensis, Lb. brevis, Lb. hammesii*) olduğu ifade edilmektedir. pH değeri belirtilmemiştir, <%1 şeker ve 10 kcal enerji değerine sahiptir. (https://www.farmhouseculture.com/gut-shots)

9. Farmhouse gut shot® *ginger beet*: Yeşil lahana, kırmızı pancar ve zencefile su ve deniz tuzu ilavesi ile üretilen probiyotik içecek. Bir şişelik porsiyonda (44 mL) 110 milyar canlı bakteri (*Lb. pentosus/plantarum, Lb. paraplantarum, Lb. koreensis, Lb. brevis, Lb. hammesii*) olduğu ifade edilmektedir. pH değeri belirtilmemiştir, <%1 şeker ve 10 kcal enerji değerine sahiptir. (https://www.farmhouseculture.com/gut-shots)

10. Health-ade combucha®: Kuşüzümü, kuşkirazı, alıç, buğday çimi, reishi mantarı ve maca turpu gibi bitkisel hammaddelerin bakteri ve maya fermentasyonuna tabi tutulması ile üretilen, tanıtımı süper çay olarak yapılan probiyotik taşıyıcısı içeceklerdir. pH ve besin değerleri ile ilgili bilgi mevcut değildir. (http://health-ade.com/#ZjuHWdBI2199LoFO.97)

Sıralanan örneklerde görüldüğü gibi, dünyada sağlıklı beslenmeyi önemseyen bireylerin temel tüketici hedef kitlesi olarak belirlendiği, çeşitli bitkisel kaynaklardan üretilen farklı formatlarda probiyotik içecekler piyasaya sunulmuştur. Daha derin bir araştırma ile bu örneklerin sayısı artırılabilir.

Obezite, Tip 2 diyabet, hipertansiyon ve kardiyovasküler rahatsızlıklar; yaş, cinsiyet, sosyoekonomik durumun yanı sıra özellikle insanların tüketim alışkanlıkları ile doğrudan ilişkili olan modern çağ hastalıklarıdır [78]. Sağlıklı beslenme ve tüketim alışkanlıkları, bu hastalıkların önlenmesi için kritik önem taşımaktadır. Amerikan Diyabet Cemiyeti, Amerikan KaSH5 Birliği ve Amerikan Kanser Cemiyetinin 2004 yılında yayınladıkları ortak bildiride, söz konusu modern çağ hastalıklarından korunmak için ortak bir diyet stratejisinin geliştirilmesini, tam tahıllar, baklagiller ile sebze ve meyvelerin diyette daha fazla yer almasını, buna karşılık şeker eklenmiş gıdaların, kırmızı etin ve tam yağlı sütün miktarının azaltılmasını önermişlerdir. Bu bildiride ayrıca diyetteki kalori miktarının bireylerin günlük ihtiyaçlarına göre düzenlenmesi gerektiği ifade edilmiştir [79]. Epidemiyolojik çalışmalar, meyve/sebze tüketiminin obezite, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalık vakalarından kaynaklanan ölümlerin azalmasında etkili olabileceğini göstermiştir [4, 80]. Bununla birlikte, meyve sularında durum farklıdır. Meyve suları yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmasına rağmen lifçe fakirlerdir ve yüksek şeker içeriğine sahiplerdir. Yapılan bir araştırmada, herhangi bir diyabet, kanser ya da kardiyovasküler hastalığı bulunmayan 38-63 yaş arası 71.346 hemşireye 1984 yılından sonra 18 yıl boyunca düzenli olarak tam meyve/sebze, yeşil yapraklı sebze veya meyve suyu verilerek diyabet gelişimi takip edilmiştir. Günde 1 porsiyon yeşil sebze tüketenlerde diyabet riskinin azaldığı, günde 1 porsiyon meyve/sebze tüketiminin diyabet gelişiminde herhangi bir etkisinin olmadığı, buna karşılık günde 1 porsiyon meyve suyu alan kişilerde diyabet riskinde artış görüldüğü sonucuna varılmıştır [81].

Meyve suyunun sahip olduğu bu dezavantaja karşılık insanların tam meyve-sebze tüketmeleri ya da fruktoz içeriği düşük meyve ürünlerini tüketmeleri daha doğru bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Diğer yandan, fonksiyonel gıda konsepti, son yıllarda sağlıklı yaşam ve sağlıklı beslenmenin önemli öğelerinden

birisi haline gelmiştir. İnsanların bağırsak mikroflorasını olumlu yönde etkileyerek sağlığa faydalı olan mikroorganizmalar olarak tanımlanan probiyotiklerin taşıyıcısı olan gıda maddeleri, fonksiyonel gıda konsepti içerisindeki en önemli ve en popüler grubu oluşturmaktadır. Kefir ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin yanı sıra probiyotik taşıyıcısı olan meyve/sebzeler, tüm dünyada sağlıklı beslenmede önemli yer tutmaktadır. Vejetaryenlik, laktoz intoleransı, süt proteini alerjisi, sütteki kolesterol içeriği gibi çeşitli faktörler, süt bazlı fermente gıdalara karşı meyve bazlı probiyotik taşıyıcısı ürünleri ön plana çıkarmaktadır. Probiyotik taşıyıcısı fermente meyve/sebze bazlı içecekler, ürün çeşitliliği açısından tam meyve/sebzelere kıyasla daha az yer kaplamaktadır ve dünyada duyusal olarak kabul edilebilirliği yüksek yeni probiyotik meyve/sebze bazlı içeceklerin geliştirilmesi için Ar&Ge çalışmaları yapılmaktadır. Bu tez çalışmasının çıkış noktası da burası olmuş ve probiyotik taşıyıcısı kalorisi düşük (en az % 30 daha az) vişne bazlı fermente içeceklerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

3
MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal ve Kimyasallar

Vişne suyu konsantreleri, Göknur Gıda A.Ş.'den (Niğde, Türkiye) 250 g'lık aseptik ambalajlar halinde temin edilmiştir.

Tez çalışmasında vişne bazlı içeceklerin fermentasyonu için seçilecek olan potansiyel probiyotik laktik asit bakterilerinin izolasyonu için Adana ve Kayseri'de yer alan yerel üreticilerden sırasıyla 4 şalgam ve 4 gilaburu örneği temin edilmiştir. Şalgam örneklerinin koruyucu içermemesine ve pastörize edilmemiş olmasına özen gösterilmiştir. Gilaburu örnekleri geleneksel üretim yapan ailelerden temin edildiği için bunların üretiminde ısıl işlem ya da koruyucu ilavesi yer almamaktadır. Orijinal ambalajları içerisinde temin edilen örnekler, soğuk koşullarda hızlı bir şekilde laboratuvara transfer edilmiş ve laktik asit bakterisi (LAB) izolasyon çalışmalarına başlanmıştır.

Diğer tüm kimyasallar ve çözeltiler analitik saflıktadır ve Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2 Geleneksel şalgam ve gilaburu içeceklerinden laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu ve tanımlanması

3.2.1 LAB İzolasyonu

LAB izolasyonu için, şalgam ve gilaburu örneklerinden aseptik koşullarda 10 g tartılarak steril borosilikat cam şişelere alınmış ve 90 mL peptonlu su ile karıştırılmıştır. Sonrasında seri dilüsyonlar hazırlanarak uygun dilüsyonlardan yayma yöntemi ile Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) Agar (Merck, Almanya) üzerine ekim yapılmıştır. Bütün petriler anaerobik olarak 35 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, petrilerdeki farklı morfolojik yapı gösteren tipik kolonilerden rastgele seçilmiş ve MRS agar üzerinde saflaştırılmıştır. Gram pozitif, katalaz negatif izolatlar olası LAB olarak kabul edilmiş ve bu saf koloniler ileri analizler için -80°C'de %50 gliserol içinde saklanmıştır [82].

3.2.2 FTIR ve Cluster Analizi

Olası LAB türlerinin ön tanısı ve kümeleme analizi için gerçekleştirilen FTIR ölçümleri, Yildirim ve Arici [83] tarafından açıklanan yöntem baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle LAB izolatları APT (All Purpose Tween) Agarda 34 ˚C'de 24 saat süreyle anaerobik koşullarda inkübe edilmiş, ardından her örnekten yarım öze dolusu alınarak 100 μL steril saf su içerisinde süspanse edilmiştir. Elde edilen süspansiyonlardan 25 μL alınarak FTIR cihazının 96 kuyucuklu ZnSe plakasına aktarılmıştır. Plaka 40 ºC'de 45 dk bekletilerek izolatların plaka yüzeyine tamamen tutunması sağlanmıştır. Ardından, FTIR/HTS-XT birim donanımlı Tensor 27 spektrometre (Bruker Optic GmbH, Almanya) cihazı ile 600–4000 cm^{-1} dalgaboyu aralığında ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Cihazın kümeleme analizindeki çalışma şartları ise şu şekildedir:

Ön işleme: ikinci türev+vektör normalizasyonu

Yumuşatma noktası: 9

Tarama bölgesi: 700-1500 cm^{-1}

Sonuçlar OPUS (versiyon 7.2) ile değerlendirilmiştir.

3.2.3 İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu ve 16s rDNA Gen Analizi

İzole edilen bakterilerin tanımlanması amacıyla LAB izolatlarından DNA esktraksiyonunda GF-1 nükleik asit ekstraksiyon kiti (Vivantis, Malezya) kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi, üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiş ve 16S rDNA geninin amplifikasyonu için, PEU7 (5´-GCA AAC AGG ATT AGA TAC CC-3´), DG74 (5´-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3´) primer çifti kullanılmıştır. PCR döngüsü, bir ısı döngüleyici (Bio-Rad, ABD) kullanılarak 95°C'de 5 dk, 94°C'de 15 sn, 52°C'de 30 sn, 72°C'de 2dk, 72°C'de 5dk. (30 döngü) uygulanmıştır. PCR ürünü, GF-1 PCR yıkama kiti (Vivantis) ile üretici protokollerine uygun olarak saflaştırılmıştır. Daha sonra PCR ürününe %1'lik agaroz jelde 120V'ta 1,5 saat elektoroforez işlemi uygulandıktan sonra görüntü alınmıştır. Jel görüntüsü alınan örneklerin DNA'ları saflaştırılarak sekans analizine (Medsantek, İstanbul, Türkiye) yollanmıştır. Dizi analizi sonuçları, BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak veritabanları ile

karşılaştırılmış ve tarama sonucunda dizinin hangi mikroorganizmaya ait olduğu benzerlik yüzdesiyle belirlenmiştir.

3.3 LAB İzolatlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.3.1 LAB İzolatlarının Caco-2 Bağırsak Epitel Hücrelerine Tutunma Kabiliyetlerinin İncelenmesi

LAB'nin bağırsak epitel hücrelerine tutunabilme özellikleri Piatek vd. [84] tarafından açıklanan yönteme göre belirlenmiştir.

Caco-2 hücre kültürlerinin hazırlanması: Öncelikle Caco-2 hücreleri %10 fetal bovine serum, %1 esansiyel olmayan amino asit çözeltisi ve gentamisin içeren DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) besiyerinde geliştirilmiştir (37 ^{o}C, %5 CO_2 ve %95 nispi nem koşullarında). Daha sonra hücreler tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak flasktan kaldırılmış ve yeni bir kültür flaskına (25 cm^2) aktarılmıştır. Bu işlem 7 gün içinde peş peşe 2 kez gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan Caco-2 hücreleri daha sonra 75 cm^2'lik flaska aktarılmış ve flask yüzeyi yaklaşık %80-90 oranında kaplanana kadar yukarıda belirtildiği gibi kültürleme işlemine devam edilmiştir. Kültürleme işleminden sonra trypan blue boyama yöntemi ile canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Elde edilen canlı hücreler 17 günlük inkübasyona bırakılarak her 24 saatte bir besiyeri tazelenmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanıp analiz için hazır hale getirilmiştir.

LAB'nin tutunma testi için hazırlanması ve tutunma kabiliyetlerinin belirlenmesi: Teste tabi tutulan LAB'ler, 10 mL MRS broth içinde anaerobik şartlarda 37°C'de 20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültür 4.500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek 2 kere %0,9 NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. Bakteri hücreleri $5{,}5\times10^{10}$ kob/mL olacak şekilde antibiyotik ve fetal bovine serum içermeyen 1 mL DMEM besiyerine aktarılarak standart koşullarda Caco-2 hücreleri ile birlikte 90 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tutunamayan bakteriler PBS ile yıkanarak Caco-2 epitel hücrelerden uzaklaştırılmıştır. Tutunan bakteriler ise Caco-2 hücrelerinin yüzeyinden %1 Triton X-100 ve PBS karışımı kullanılarak ayrılmıştır. Elde edilen bakteri hücreleri 4.500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra

hücreler PBS ile 2 kere yıkanmıştır. Daha sonra elde edilen bakteri hücreleri 1 mL %0,9 NaCl çözeltisinde süspanse edilmiştir. Seri dilüsyonlar hazırlandıktan sonra klasik yayma yöntemi ile MRS Agar besiyerine ekim yapılarak petriler 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiş ve bakteri sayımı yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre inokülasyonda tutunan bakteri sayısı (%) olarak hesaplanmıştır.

3.3.2 Asit Tolerans Testi

LAB izolatlarının asit tolerans yetenekleri Nagpal vd. [85] tarafından açıklanan metoda göre belirlenmiştir. Bunun için, MRS Broth besiyerlerinin pH değerleri 1 N HCl kullanılarak 2,5 ve 6,5 olarak ayarlanmış ve içerisine %1 oranında bakteriyel kültür inoküle edilip 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından seri dilüsyonlar hazırlanarak uygun dilüsyonlardan MRS agar üzerine yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve petriler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası petrilerdeki koloniler sayılarak sonuçlar log10 kob/mL olarak hesaplanmıştır.

3.3.3 Safra Tuzu Tolerans Testi

LAB izolatlarının farklı safra tuzu konsantrasyonlarına karşı dirençlerini belirlemek amacıyla %0,3; %0,5; %1 ve %1,5 oranlarında ox-bile içeren MRS broth besiyerine %1 oranında 18 saatlik genç LAB kültürleri eklenmiş ve besiyerleri 37 °C'de 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından seri dilüsyonlar hazırlanarak uygun olan dilüsyonlardan yayma yöntemi ile MRS agar üzerine ekim yapılmış ve petriler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası petrilerdeki koloniler sayılarak sonuçlar log10 kob/mL olarak hesaplanmıştır [86].

3.3.4 Taurodeoksikolat (TDC) Hidroliz Aktivitesi

LAB izolatlarının TDC hidroliz kabiliyetleri, Kumar vd. [87] tarafından açıklanan yöntem esas alınarak tespit edilmiştir. Bunun için, MRS Agar içerisine % 0,5 kolik asit (taurodeoksikolik asit sodyum tuzu) ve 0,37 g/L $CaCl_2$ ilave edilerek modifiye bir besiyeri hazırlanmış ve steril edilmiştir. Ardından besiyeri petrilere dökülüp katılaştıktan sonra üzerine 18 saatlik genç LAB kültüründen 10 μL damlatılmış ve anaerobik şartlarda 37 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kolonilerin

etrafında oluşan presipite olmuş safra asidi (opak halka) veya gümüşsü parlaklıktaki opak granüler beyaz koloniler, pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

3.3.5 Antimikrobiyal Aktivite

LAB'lerin antimikrobiyal aktiviteleri Çakır [88] tarafından açıklanan agar yüzeyine nokta ekim (spot on lawn) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu analizlerde test patojenleri olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213*, Escherichia coli* O157:H7 ATCC 25150*, Bacillus cereus* ATCC 11778 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 kullanılmıştır. Öncelikle, MRS Broth içerisinde 37 ºC'de 18 saat aktifleştirilen LAB izolatlarından 5 μL alınarak katı MRS Agar içeren petrilerin üzerine damlatılmıştır ve örnekler besiyerinde tamamen emilene kadar bekletilmiştir. Bu esnada, aktifleştirilmiş genç indikatör patojen mikroorganizma kültürleri % 0,7 oranında agar içeren yumuşak besiyerleri (Nutrient Broth) içerisine %1 oranında inoküle edilmiş ve homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Ardından bu yumuşak besiyerleri ikinci tabaka olarak MRS Agar petrileri üzerine dökülmüştür. Oda sıcaklığında katılaşması için bir süre bekletildikten sonra, 37 ºC'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında petrilerdeki LAB damlatılan noktaların etrafında oluşan berrak zonlar cetvel yardımıyla ölçülerek sonuçlar mm olarak kaydedilmiştir.

3.3.6 Antibiyotik Direnci

LAB'lerin antibiyotik direncini belirlemek için Ucak Ozkaya vd. [89] tarafından açıklanan metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla, 37 ºC'de 18 saat süreyle aktifleştirilen kültürler %1 oranında farklı konsantrasyonlarda 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/mL) antibiyotik (vancomisin) içeren MRS broth içine transfer edilmiştir. 37 ºC'de 24 saatlik inkübasyonun ardından seri dilüsyonlar hazırlanarak yayma yöntemi ile LAB sayısı belirlenmiştir.

3.3.7 Pepsin ve Pankreatin Tolerans Testleri

LAB izolatlarının pepsin ve pankreatin enzimlerine karşı toleranslarını belirlemek için Musikasang vd. [90] tarafından uygulanan metot kullanılmıştır. Bunun için, MRS Broth içerisinde 37 ºC'de 18 saat aktifleştirilen kültürler 10.000 *g*'de 5 dk

santrifüj edilerek iki kere fosfat tampon çözeltisi (pH 7,2) ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından izolatlar ayrı ayrı pepsin (3 mg/mL) ve pankreatin (1 mg/mL) çözeltilerinde tekrar süspanse edilmiştir. Pepsin çözeltisindeki kültürler 37 ºC'de 1 ve 3 saat, pankreatin çözeltisindeki kültürler ise 4 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası seri dilüsyonlar hazırlanıp yayma yöntemi ile ekim yapılarak LAB sayısı belirlenmiştir.

3.3.8 Fruktoz ve Sakkaroz Kullanma Yetenekleri

LAB izolatlarının sakkaroz ve fruktoz kullanabilme yeteneklerini belirlemek amacıyla, modifiye (şeker içermeyen) MRS broth besiyerine daha önceden hazırlanmış %2'lik fruktoz veya sakkaroz çözeltisi 1:1 oranında karıştırılmıştır. Karışım steril edildikten sonra içerisine %1 oranında 18 saat süreyle aktifleştirilmiş genç LAB izolatları inoküle edilmiştir. 37 ºC'de 72 saatlik anaerobik şartlarda gerçekleştirilen inkübasyonun 24, 48 ve 72 saatlerinde besiyeri içerisindeki sakkaroz ve fruktoz miktarı RID dedektörlü ve Agilent Zorbax karbonhidrat kolonlu (5 μm ve 4,6 mm $\times$ 150 mm) HPLC (Agilent 1100 HPLC system, Agilent Technologies, Palo Alto, ABD) sistemi kullanılarak tespit edilmiştir. Sıvı besiyeri, 0,45 μm filtreden geçirilerek HPLC'ye enjekte edilmiştir. Analiz şartları şu şekilde ayarlanmıştır: mobil faz % 80 asetonitril - % 20 su; akış hızı 1,4 mL/dk., enjeksiyon hacmi 20 μL, kolon sıcaklığı 25 ºC. Şekerlerin miktarları, şeker standartları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılarak alıkonma zamanlarına göre belirlenmiştir [91].

3.4 Vişne Bazlı İçeceklerin Hazırlanması ve Fermentasyon Optimizasyonu

3.4.1 LAB'lerin Aktifleştirilmesi ve Vişne Bazlı İçeceklere İnokülasyonu

LAB izolatlarının karakterizasyonunun ardından, en iyi probiyotik özellikler sergileyen, en yüksek sakkaroz ve fruktoz kullanma kabiliyeti ile en iyi asitlik toleransına sahip olan 3 suş seçilmiş ve vişne bazlı laktofermente içecek üretiminde kullanılmıştır. Bu suşlar aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

- SH5- *Lactiplantibacillus plantarum* SH5
- SH10- *Limosilactobacillus fermentum* SH10

- SH14- *Lactiplantibacillus pentosus* SH14

Seçilen starter kültürler 37 ºC'de aktifleştirilmiş ve spektrofotometrik olarak 590 nm'de yapılan absorbans ölçümü ile konsantrasyonu ayarlanmıştır [72]. İnoküle edilecek başlangıç yükü ~9 log kob/mL olacak şekilde ayarlanan starter kültür süspansiyonu, pastörize edilmiş meyve sularına aseptik şartlarda inoküle edilmiştir. Vişne bazlı içecekler, Tablo 3.1'de belirtilen sıcaklık değerlerinde ve ilave edilen şeker konsantrasyonlarında (en çok) 48 saat fermente edilmiştir.

Tablo 3.1 Fermentasyon parametreleri

Parametreler	
Şeker oranı (g/100 mL)	**Sıcaklık (ºC)**
9,0	20,0
12,0	20,0
15,0	20,0
9,0	28,5
12,0	28,5
15,0	28,5
9,0	37,0
12,0	37,0
15,0	37,0

Fermentasyon sıcaklıkları, *Lactobacillus* cinsi bakterilerin mezofilik olmaları ve 20 ºC'nin altında laktik asit üretimlerinin yok ya da çok az olmasından dolayı [92] seçilmiştir. Şeker oranları ise Türk Gıda Kodeksi Meyve Suyu ve Benzeri Ürünler Tebliği ve piyasada mevcut meyve nektarlarının şeker miktarları baz alınarak oluşturulmuştur. TGK'da; "*Meyve nektarına şekerler ve/veya bal ve/veya tatlandırıcılar eklenebilir. Ancak ilave edilen şeker ve/veya bal son ürünün toplam ağırlığının en fazla %20'si kadar olur*" denilmektedir. Şeker optimizasyonundaki minimum (9 g/100 mL) ve maksimum (15 g/100 mL) noktalar, piyasadaki nektarların şeker oranlarının orta noktası olan yaklaşık 12 g/100 mL olduğu düşünülerek esas alınmıştır.

3.4.2 Fermentasyon İşlemleri ve Optimum Özelliklere Sahip Laktofermente Vişne Bazlı İçeceklerin Tespiti

İlk olarak, vişne bazlı içeceklerin meyve oranı, içme suyu kullanılarak %30 (w/v) olarak ayarlanmıştır. Daha sonra bu meyve nektarlarına Tablo 3.1'de belirtilen (%9, %12 veya %15) (w/v) oranlarda şeker ilave edilmiştir. Ardından laboratuvar tipi plakalı ısı değiştiriciden (ASH10a Laval, model T2-BFG, İsveç) geçirilerek 90 ^{o}C'de 30 sn süreyle pastörize edilmiştir. Pastörizasyonun ardından steril amber cam şişelere aseptik olarak doldurulmuştur.

Diğer yandan, MRS broth kullanılarak aktifleştirilen LAB kültürlerinden vişne bazlı içeceklere % 4 (v/v) oranında (yaklaşık 10^{9} kob/mL) inoküle edilmiş ve örnekler 20 $^{\circ}$C; 28,5 $^{\circ}$C veya 37 $^{\circ}$C'de fermentasyona bırakılmıştır (Tablo 3.1). 48 saatlik fermentasyon süresi boyunca 4'er saat aralıklarla örnek alınarak besiyerine ekim yapılmış ve canlı bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar log10 kob/mL olarak hesaplanmıştır. Fermentasyon optimizasyonu 3 aşamada gerçekleştirilmiştir:

1. Birinci aşamada her bir vişne nektarı için ayrı ayrı Tablo 3.1'de belirtilen koşullarda örnekler hazırlanmış (toplam 27 örnek) ve 4'er saat aralıklarla LAB sayısı ölçümü yapılmıştır.
2. İkinci aşamada, her bir LAB suşu için en yüksek LAB sayısının belirlendiği süre koşullarında fermente vişne bazlı içecek üretilerek (27 örnek) duyusal özellikleri belirlenmiş ve 10 günlük depolama sonrasında LAB sayılarında meydana gelen değişim belirlenmiştir.
3. Birinci ve ikinci aşamalarda elde edilen LAB sayıları, duyusal beğeni ve depolama sonrası LAB sayıları baz alınarak aşağıdaki formüle göre toplam skor hesaplanmış ve toplam skorları 8 ve üzeri olan 9 örnekte kalori analizi yapılmıştır.

$$\boldsymbol{Toplam\ skor} = (A \times 0{,}4) + (B \times 0{,}2) + (C \times 0{,}4) \qquad (3.1)$$

Burada A, fermentasyon sonu bakteri sayısını; B, 10 günlük depolama sonundaki bakteri sayısını; C ise, genel beğeni değerini ifade etmektedir.

Bu hesaplama sonucuna göre 8 ve üzeri puan alan örnekler seçilmiş ve ileri karakterizasyon analizlerine tabi tutulmuştur.

3.4.2.1 LAB Sayılarının Belirlenmesi

Yukarıda verilen optimizasyonun 1. aşaması ile depolama öncesi ve sonrasında LAB sayılarının tespitinde yayma ekim yöntemi kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan MRS Agara ekim yapılmış ve petriler 35 ºC'de 48 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir [93].

3.4.2.2 Duyusal Analiz

Fermente vişne bazlı içeceklerin duyusal olarak kabul edilebilir olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla Di Cagno vd. [34] tarafından smoothie (içilebilir meyve püresi) için kullanılan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Duyusal analizlerde değerlendirme yapmak üzere 9 kişilik panelist grubu oluşturulmuştur. Numuneler panelistlere 4 ºC'de ve yaklaşık 20 mL olarak kokusuz küçük şeffaf bardaklarda 2 haneli sayılarla rastgele kodlanmış olarak verilmiştir. Panelistler örnekleri "genel kabul edilebilirlik" açısından 8 noktalı bir skala kullanarak değerlendirmiş ve 8 "çok beğendim", 1 ise "hiç beğenmedim" olarak kabul edilmiştir.

3.4.2.3 Toplam Kalori Analizi

Bu amaçla öncelikle toplam karbonhidrat (CHO) belirlenmiştir. Toplam karbonhidrat numunenin nem, kül, protein ve yağ içeriğine göre hesaplanmıştır.

Toplam CHO=100-(nem+kül+protein+yağ)

Sindirilebilir karbonhidratın (CHO) belirlenmesi:

Sindirilebilir karbonhidratın numunenin, nem, kül, protein, yağ ve diyet lif içeriğine göre belirlenmiştir [94].

Sindirilebilir karbonhidratın (CHO)=100-(nem+kül+yağ+diyet lif)

Örneğin toplam kalori düzeyi ise Atwater metoduna göre, (protein × 4) + (yağ × 9) + (sindirilebilir CHO × 4) + (diyet lif × 2) şeklinde hesaplanmıştır [95].

3.5 Probiyotik Vişne Bazlı İçeceklerin Depolanması ve Karakterizasyonu

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda vişne bazlı laktofermente içeceklerde en yüksek kalori düşüşü, en iyi duyusal özellikler ve en yüksek LAB canlılığı sergileyen 4'er örnek seçilmiş ve bu örneklerin soğukta (4˚C) depolanmaları sırasında fizikokimyasal, mikrobiyolojik, biyoaktif ve duyusal özelliklerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Optimum özelliklere sahip olan örnekler Tablo 3.2'de belirtilen kodlarla kodlanmıştır. Bu örnekler, fermente olmamış içecekler (kontrol örnekleri) ile kıyaslanmıştır.

Tablo 3.2 Optimum özelliklere sahip olan vişne bazlı içecekler ve kodları

Örnek kodu	Örnek özellikleri
VN9-SH10	%9 sakkaroz ilaveli ve *Limosilactobacillus fermentum* SH10 ile fermente edilerek üretilmiş vişne bazlı içecek
VN12-SH5	%12 sakkaroz ilaveli ve *Lactiplantibacillus plantarum* SH5 ile fermente edilerek üretilmiş vişne bazlı içecek
VN12-SH14	%12 sakkaroz ilaveli ve *Lactiplantibacillus pentosus* SH14 ile fermente edilerek üretilmiş vişne bazlı içecek
VN9-Miks	%9 sakkaroz ilaveli ve SH5, SH10 ve SH14 ile fermente edilerek üretilmiş vişne bazlı içecek

3.5.1 Probiyotik vişne bazlı içeceklerin hazırlanması ve fermentasyon işlemleri

Bakteri kültürleri çift aktifleştirme işlemine tabi tutularak popülasyonun yeterli sayıya ulaştığının tespiti, spektrofotometrik olarak 590 nm'de absorbans ölçümü ile belirlenmiştir [72]. MRS Broth'dan santrifüjle ayrılan LAB pelletleri, MRS Broth'un ¼ hacminde steril peptonlu su ile birleştirilmiş ve 100 mL'lik cam şişeler içerisinde hazırlanan meyve sularına % 4 oranında (v:v) ilave edilerek inokülasyon gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon işleminin ardından vişne suları 20 saat fermentasyona tabi tutulmuştur. Fermentasyon sonrasında 0. gün analizi için kullanılacak örnekler ayrıldıktan sonra geri kalan örnekler 4 °C'de 28 günlük süreyle depolamaya bırakılmıştır. Fermente olmamış meyve suları, kontrol olarak analize alınmıştır.

3.5.2 Toplam LAB Sayısının Belirlenmesi

Laktofermente örneklerdeki toplam LAB sayısı yayma ekim yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, 10 mL örnek alınarak 90 mL steril peptonlu su ile seyreltilmiş ve ardından seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan MRS Agara ekim yapılmış ve petriler 35 ºC'de 48 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Sonuçlar log kob/mL cinsinden verilmiştir [93]. LAB sayısı analizi, depolama süresince belli aralıklarla gerçekleştirilmiştir.

3.5.3 pH Değerinin ve Titrasyon Asitliğinin Belirlenmesi

Numunelerin pH değeri, standart tampon çözeltileri ile kalibre edilmiş pHmetrenin probunun 20±2°C'ye getirilmiş numune içerisine direkt daldırılmasıyla ölçülmüştür [74].

Numunelerin titrasyon asitliklerini belirlemek için ise, 0,02N NaOH kullanılarak pH 8,2'ye ulaşıncaya kadar numunenin titrasyonu ile % laktik asit cinsinden belirlenmiştir [74].

3.5.4 Toplam Kuru Madde Tayini

Probiyotik meyve sularının toplam kuru madde düzeyleri, meyve sularının vakumlu etüvde 70 ºC'de kurutulmaları ile gravimetrik olarak belirlenmiştir [94].

3.5.5 Briks Tayini

Meyve bazlı içecek örneklerinin toplam çözünür kuru madde değerleri, el refraktometresi kullanılarak 20 ºC'de gerçekleştirilmiştir.

3.5.6 Renk Analizi

Probiyotik meyve sularının renk analizi, Minolta (CR-400, kolorimetre (Minolta CR-400, Konica Minolta Sensing, Osaka, Japonya) kolorimetre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. L^* (beyazlık-siyahlık), a^* (kırmızılık-yeşillik) ve b^* (sarılık-mavilik) olmak üzere 3 renk parametresinin ölçümü yapılmış ve bu değerlerden aşağıdaki formül kullanılarak toplam renk farklılığı (ΔE) hesaplanmıştır.

$$\Delta E = \{(\Delta L^2) + (\Delta a^2) + (\Delta b^2\}^{1/2} \quad (3.2)$$

3.5.7 Bulanıklık Tayini

Elde edilen probiyotik meyve bazlı içeceklerin bulanıklık değerleri 540 nm'de UV-vis spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1800) absorbanslarının ölçümü ile analiz edilmiştir [96]. Bulanıklık tayini öncesinde örnekler 1:10 oranında seyreltilmiştir.

3.6 Biyoaktif Özelliklerin Belirlenmesi

3.6.1 Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi

Numunelerin toplam fenolik miktarlarını tespit etmek için, Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır. Folin-Ciocalteu reaktifi ile muamele edilen numuneler oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda çözeltilerin absorbansı UV-vis spektrofotometre (Shimadzu, UV-1800) 765 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sonuçlar, spektrofotometrede oluşturulan standart gallik asit eğrisinden elde edilen denklem yardımıyla hesaplanarak mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 mL numune olarak kaydedilmiştir [97].

3.6.2 DPPH Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi

1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) metoduyla 0,1 mL örneğe 4,9 mL etanollü DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. 20 dk. süreyle oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda gerçekleştirilen inkübasyondan sonra karışımın absorbansı 517 nm'de ölçülmüştür [98].

3.6.3 CUPRAC Yöntemi ile Toplam Antioksidan Kapasitenin (TAK) Belirlenmesi

CUPRAC (Bakır(II) iyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite) yöntemi ile probiyotik meyve bazlı içeceklerin antioksidan aktivitesi belirlenmiş olup bu yöntem Apak vd. [99] tarafından geliştirilmiştir. Bu amaçla, 0,01 M bakır (II) klorür çözeltisi, 0,075 M neokuproin ve 1 M amonyum asetat çözeltilerinden 1'er mL alınarak cam tüpte bir araya getirilmiştir. Üzerine 0,1 mL örnek ve 1 mL saf su ilave edilmiştir. Son çözelti, oda sıcaklığında 60 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda, içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.7 Toplam Kalorinin Belirlenmesi

Bölüm 3.4.2.3'te açıklandığı şekilde yapılmıştır.

3.8 Sakkaroz ve Fruktoz Tayini

Laktofermente meyve bazlı içeceklerde şeker miktarlarının belirlenmesi için RID dedektörlü ve Agilent Zorbax karbonhidrat kolonlu (5 μm ve 4,6 mm $\times$ 150 mm) HPLC (Agilent 1100 HPLC system, Agilent Technologies, Palo Alto, ABD) sistemi kullanılmıştır. Sıvı örnek, 0,45 μm filtreden geçirilerek HPLC'ye enjekte edilmiştir. Analiz şartları şu şekilde ayarlanmıştır: mobil faz % 80 asetonitril - % 20 su; akış hızı 1,4 mL/dk., enjeksiyon hacmi 20 μL, kolon sıcaklığı 25 ^{o}C. Şekerlerin miktarları, şeker standartları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılarak alıkonma zamanlarına göre belirlenmiştir [91].

3.9 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Vişne bazlı içeceklerin antimikrobiyal etkisi, agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Test mikroorganizmaları olarak *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır. %1 (v/v) oranında aktifleştirilmiş test mikroorganizması ilave edilen besiyerlerinin (bakteriler için Nutrient Agar, mayalar için DRBC / Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) petrilere dökülerek katılaşması beklenmiş ve daha sonra besiyerlerinde kuyucuklar açılarak meyve suları (50 μL) bu kuyucuklara inoküle edilmiştir. pH'nın inhibisyon üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla probiyotik vişne bazlı içeceklerin pH değerleri 0,1 N NaOH ile 5, 6 ve 7'ye ayarlanarak kıyaslama yapılmıştır. Petriler; bakteriler için 37 ^{o}C'de, mayalar için 28 ^{o}C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür. Sonuçlar mm olarak kaydedilmiştir. Bu testlerde negatif kontrol olarak fermente olmamış meyve nektarı kullanılmıştır [100].

3.10 Duyusal Analiz

Bölüm 3.4.2.2'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.11 Uçucu Bileşenlerin Belirlenmesi

Vişne bazlı laktofermente içeceklerin uçucu bileşenleri, Andreu-Sevilla vd. [101] tarafından uygulanan yöntem baz alınarak EST Flex 2 autosampler, GC–MS QP-5050A MS dedektör ve Rxi-5ms (30mx0.25x0.25) kolon entegreli GC-MS cihazında (Shımadzu, GC-MS-QP2010 Ultra, Japonya) analiz edilmiştir. 25 mL meyve bazlı içecek örneği, hermetik olarak 50 mL'lik viallere kapatılmış ve hem enzimatik degradasyonu önlemek hem de uçucu maddelerin tepe boşluğuna geçişini kolaylaştırmak için üzerine %15 oranında NaCl ilave edilmiştir. Daha sonra 60 °C'ye getirilmiş termoblokta tutularak 30 dk süreyle denge haline getirilmiştir. Süre sonunda 75 μm CAR/PDMS fiber tepe boşluğuna 60 °C'de 30 dk süreyle muamele edilmiştir. Ardından fiberdeki uçucu maddeler hızlı bir şekilde GC-MS cihazının enjeksiyon portunda 2 dk süreyle desorbe edilmiştir. Analiz koşulları şu şekilde ayarlanmıştır: Taşıyıcı gaz, He; akış hızı, 1,4 mL/dk, ayırma oranı, 1:5; fırın sıcaklığı sırasıyla başlangıçta 50 °C/1dk, 50 °C'den 210 °C'ye 10 °C/dk hızla ısıtma; 5 dk bu sıcaklıkta bekletme; 210 °C'den 300 °C'ye 10 °C/dk hızla ısıtma; 10 dk bu sıcaklıkta bekletme; enjektör ve dedektör sıcaklığı 280 °C; MS modu, 35-550 m/z. Uçucu maddelerin kütle spektrumları, MS kütüphanesi (NIST 11, WILEY 7.0 ve FFSNC 2) ile karşılaştırılarak maddeler tanımlanmıştır.

3.12 Aroma Aktif Bileşenlerin Belirlenmesi

Örneklerde bulunan aroma-aktif bileşenler katı faz mikroekstraksiyon gaz kromatografisi oSH10aktometri (GC-O) sistemi kullanılarak belirlenmiştir. 5 g örnek 40 mL hacmindeki ve PTFE/silicon septum ile kapatılan amber viallere (Supelco, Bellefonte, PA, ABD) tartılmış ve üzerine 1 g tuz ilave edilerek 30 saniye süreyle vorteks kullanılarak karıştırılmıştır. 50°C'deki su banyosunda 20 dakika bekletilmiş ve daha sonra SPME fiber (2 cm, 50×30 μm DVB/Carboxen/PDMS) viale batırılarak 50°C'lik su banyosunda 20 dakika daha bekletilmiştir. Örnekler GC'ye enjekte edildikten sonra GC-O da koklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak He kullanılmıştır. Aroma maddelerinin alıkonma indeksleri (RI-Retention Index) alkan serisi kullanılarak Van Den Dool ve Kratz [102] tarafından önerilen yöntem kullanılarak hesaplanmıştır.

3.12.1 Gaz Kromatografisi Oflaktometri

Gaz Kromatografisine (6890, Agilent Technologies, Wilmington, De, ABD) oSH10aktori port bağlanarak koklama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Aroma aktif bileşenlerin ayrımı için Polar olmayan özellikteki DB-5 (30m x 0,32 mm iç çap x 0,25 μm film kalınlığı) kullanılmıştır (J&W Scientific (Folsom, CA, ABD).

Kolondaki akış hızı 1,7 mL/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Gaz kromatografisi cihazına ait fırın sıcaklık programı ve bekleme süreleri 40 °C'den 200 °C'ye kadar sırasıyla; 40 °C'de 3 dakika bekleme süresi, 200 °C' ye ulaşıncaya kadar dakikada 10°C (10°C/dk) artış ile 20 dakika bekleme süresi olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.12.2 Karakteristik Aroma Aktif Bileşenlerin GC-O Yöntemi ile Belirlenmesi

Koklama işlemi deneyimli bir kişi tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonra gaz kromatografisine n-alkan standard serisi (C_6....C_{23}) enjekte edilerek alıkonma zamanları belirlenmiştir. Gerek kullanılan alkan serisinin ve gerekse analiz edilen gıda örneğindeki aroma maddelerinin alıkonma zamanları kullanılarak alıkonma indeksleri (RI-Kovats retention index) aşağıda belirtilen formül yardımıyla hesaplanmıştır (Van den Dool ve Kratz, 1963). Aroma aktif bileşenlerin tanımlanması amacıyla https://www.flavornet.org/flavornet.html web sayfasında yer alan bileşenlerin alıkonma indeksleri ve aroma özellikleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

$$RI = 100n + 100\frac{RT_{unk} - RT_n}{RT_{n+1} - RT_n} \quad (3.3)$$

Bu formülde; RI: Alıkonma indeksi, n: Küçük alkanın karbon sayısı, RT_{unk}: Bilinmeyen maddenin alıkonma zamanı, RT_n: Küçük alkanın alıkonma zamanı, RT_{n+1}: Büyük alkanın alıkonma zamanı anlamına gelmektedir.

Aroma yoğunluğunun saptanması amacıyla 10-puanlık ölçek kullanılmıştır. Ölçek üzerinde 1 çok az yoğunluğu, 10 ise çok yüksek yoğunluğu göstermektedir. Her bir örnekte bulunan ve taşıyıcı gazla birlikte oSH10aktometrik üniteye taşınan aroma maddeleri 20 dakika boyunca koklanmıştır.

3.13 *in vitro* Sitotoksik Aktivite

Sitotoksisite testinde insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) kullanılmıştır. Kültürü yapılmak üzere sıvı nitrojen tankından çıkarılan hücreler 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda hızlıca çözüldükten sonra içinde 5 mL %10 PBS'li DMEM-F12 medyumu bulunan santrifüj tüpleri içine alınarak, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 7,5 mL %10 PBS'li DMEM-F12 ile süspanse edilip 25 cm^2'lik flaska aktarılmıştır. Flasktaki hücrelerin flask yüzeyini kaplamaları, 9 gün boyunca ters mikroskopta incelenerek takip edilmiştir. Kültürün 48. saatinde flaskın içindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve 7,5 mL taze hazırlanmış %10 PBS'li DMEM-F12 eklenmiştir. Aynı işlem kültürün 7. gününde de yapılmıştır. Ters mikroskop altında hücrelerin yüzeyi tamamen kapladığı tespit edildiğinde kültür tekrardan tripsinize edilmiştir.

XTT yöntemi kullanılarak yapılacak *in vitro* sitotoksisite testleri için Cakir-Koc vd. [103] tarafından açıklanan metot bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Yukarıda anlatılan işlemlerden geçirilerek hazırlanan hücrelerin flasklardan kaldırılması sonrasında hemositometre ile sayımı yapılmıştır. Daha sonra hücreler, 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakaya eklenerek, hücrelerin kuyucuk tabanına tutunması için 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası farklı konsantrasyonlardaki vişne bazlı içecekler, kuyucuklara eklenerek 37 °C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde tekrar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, kuyucuklardaki medyum kısmı uzaklaştırılarak 100 μL 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sul-fophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT; 0,5 mg/mL) çözeltisi kuyucuklara eklenmiş ve mikroplakalar 37 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikroplaka okuyucuda (Biotek, Elx800, ABD) 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk (OD) ölçülmüş ve canlı hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\%Canlı\ hücre = \frac{Örnek\ OD\ değeri}{Kontrol\ OD\ değeri} \times 100 \qquad (3.4)$$

3.14 Vişne bazlı içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının belirlenmesi

Vişne bazlı içecek örneklerinin biyoaktif ve antioksidan özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılığının tespit edilmesi için örnekler farklı sindirim evreleri analizlerine tabi tutulmuştur (post gastrik sindirim, Pg; bağırsak sindiriminde diyaliz edilebilir fraksiyon, In; bağırsak sindiriminde diyaliz edilemeyen fraksiyon, out). Bu amaçla McDougall vd. [104] tarafından önerilen gastrointestinal sindirim modeli kullanılmıştır. Buna göre; 2,5 mL örnek, 250 mL'lik beher içinde destile su ile 20 mL'ye tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Bu aşama, ağızdaki mekanik sindirimi ifade etmektedir. İkinci olarak, 0,1 M HCl içinde çözdürülen 1,5 mL pepsin çözeltisi (40 mg/mL) behere ilave edilmiş ve 5 M HCl ile pH değeri 2 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra 37 ^{o}C'deki çalkalamalı su banyosunda 100 rpm'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu aşama, midedeki sindirimi ifade etmektedir. Bu aşamanın sonunda 2 mL solüsyon alınıp analize kadar -20 ^{o}C'de bekletilmiştir. Alınan bu örnek, post gastrik (Pg) olarak nitelendirilmektedir. Kalan karışıma 4 mg/mL pankreatin ve 25 mg/mL safra tuzu karışımından 4,5 mL ilave edilmiştir. Numunenin titre edilebilir asitliğini nötrleştirmek için selüloz diyaliz tüpü (15 cm) yeterli miktarda 0,5 M $NaHCO_3$ ile doldurulmuştur. Beherin ağzı parafilmle kapatılarak 37 ^{o}C'deki çalkalamalı su banyosunda 100 rpm'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu aşama bağırsak sindirimini ifade etmektedir. Diyaliz tüpünün içi diyaliz edilebilir fraksiyonu (In), dışı ise diyaliz edilemeyen fraksiyonu (out) ifade etmektedir. Bütün örnekler (Pg, In, out) hazırlandıktan sonra toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan kapasitesi analizleri için -20 ^{o}C'de depolanmıştır [105]. Kontrol olarak fermente olmamış meyve bazlı içecek kullanılmıştır.

3.15 İstatistiksel Analizler

Laboratuvar çalışmaları sonucunda elde edilen veriler bilgisayara aktarılarak Microsoft Excel ile ortalamalar ve standart sapmalar hesaplanmıştır. Çalışma süresince uygulanan analizler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Yapılan tüm çalışmalar ve elde edilen sonuçlar, her bir örnek için ayrı ayrı toplanarak istatistiksel değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Verilerin değerlendirilmesinde varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizleri, Windows tabanlı SAS (SAS 8.2,

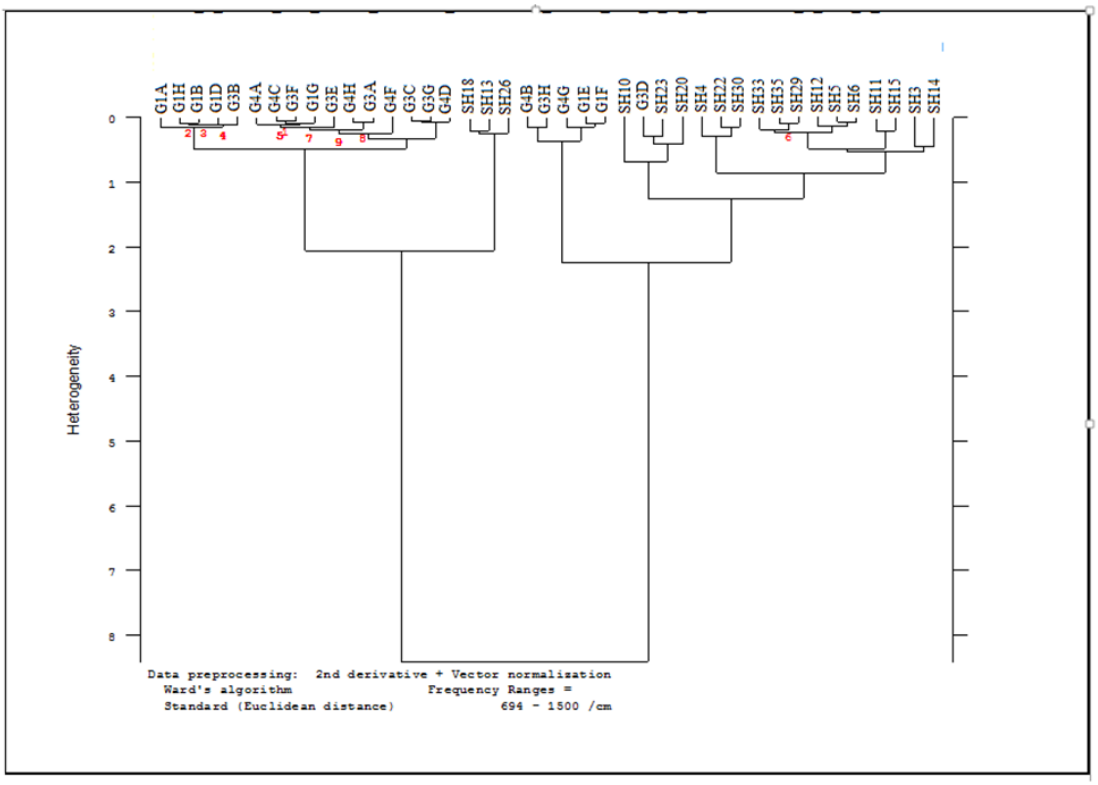
North Carolina, ABD) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortalamalar arasındaki önem dereceleri ise Tukey çoklu karşılaştırma testi ile %95 güven aralığında belirlenmiştir.

4
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, vişne bazlı probiyotik taşıyıcısı laktofermente içeceklerin üretimi amaçlanmıştır. Bu amaçla, geleneksel gilaburu ve şalgam içeceklerinden 41 adet laktik asit bakterisi (LAB) izolatı elde edilmiş ve FTIR tabanlı kümeleme analizi ve PCR tanımlaması sonucunda bunlardan 10 tanesi seçilerek probiyotik özellikleri belirlenmiştir. En iyi özelliklere sahip üç adet izolat seçilerek fermentasyon optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve optimum özelliklere sahip olan laktofermente vişne bazlı içecekler depolanarak depolama boyunca bazı kalite özellikleri incelenmiştir. Elde edilen bütün bulgular aşağıda verilmiştir.

4.1 FTIR, Kümeleme Analizi ve Tanımlama Sonuçları

Probiyotik bakterilerin tanımlanması amacıyla şalgam ve gilaburu örneklerinden izole edilen toplam 60 adet izolat, FTIR spektrometrisi ile analiz edilmiş ve genotipik olarak kümelendirilmiştir (Cluster analizi). Dziuba vd. [106] tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ilk defa homojen LAB kümeleri ayrılmış ve 1500–1200 cm^{-1}, 1200–900 cm^{-1}, 900–700 cm^{-1} orijinal spektral bölgelerinde Lactobacillus türleri araştırılmıştır. Ayrıca Wenning ve Scherer [107], FTIR ile bakteri ve mayaların tanımlanmasının mikrobiyal tanımlama yöntemleri arasında en güvenilir yöntemlerden biri olarak kabul edilebileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada, kümeleme analizi sonucunda 60 adet izolattan 41 adet izolat pozitif olarak belirlenmiş ve genotipik olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Şalgam ve gilaburu örneklerinde izole edilen izolatların FTIR kümeleme analizi

Örneklerde 16S rDNA dizilimi ve BLAST analizleri sonucunda, izolatlar arasında *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus pentosus* ve *Lactiplantibacillus plantarum* olmak üzere üç ana suş belirlenmiştir (Tablo 4.1). Ancak, Şekil 4.1'deki filogenetik ağaç kümelenmesinde görüldüğü gibi, *SH5b. plantarum* ve *SH5b. pentosus* benzer genotipik yapıda olduğu için izolatlar iki ana grup olarak tanımlanmıştır [83, 108]. Sagdic vd. [82] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, fermente gilaburu suyundan çeşitli LAB izole edilmiş ve izolatların yaklaşık %95'lik kısmının laktobasil suşları ile ilişkili olduğu ve birincil LAB grubunun ise *SH5b. plantarum* olduğu bildirilmiştir. Arici ve Coskun [71] tarafından yürütülen bir başka çalışmada ise, kırmızı üzüm ve hardal tohumlarının fermente edilmesi ile elde edilen geleneksel hardaliye içeceklerinde *L. paracasei* subsp. *paracasei* ve *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* suşlarının baskın olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, Yien Ong vd. [109] Meksika ve Güney Amerika'da yaygın olarak tüketilen kırmızı ejder meyvesinin fermente edilmesi ile elde edilen içeceklerde, sadece *Enterococcus* türlerinin olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, çalışmada elde edilen izolatların FTIR tabanlı kümeleme analizi (Cluster)

ve PCR tanımlaması sonucunda, ileri karakterizasyon analizleri için farklı dallardan toplam 10 adet izolat seçilmiş ve Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1 PCR tanımlaması yapılan LAB izolatları

Izolat	Suşlar
G1G	*Limosilactobacillus fermentum* G1G
G4B	*Lactiplantibacillus pentosus* G4B
G4C	*Lactiplantibacillus plantarum* G4C
G4D	*Lactiplantibacillus plantarum* G4D
SH5	*Lactiplantibacillus plantarum* SH5
SH10	*Limosilactobacillus fermentum* SH10
SH11	*Lactiplantibacillus plantarum* SH11
SH14	*Lactiplantibacillus pentosus* SH14
SH23	*Lactiplantibacillus plantarum* SH23
SH35	*Lactiplantibacillus plantarum* SH35

4.2 LAB İzolatlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1 LAB İzolatlarının Caco-2 Bağırsak Epitel Hücrelerine Tutunma Kabiliyetleri

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak nitelendirilebilmesi için taşıması gereken en önemli özelliklerden birisi bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyetidir. Probiyotiklerin bağırsak hücrelerine yüksek miktarda tutunması, gastrointestinal sistemi patojenlerin kolonizasyonuna karşı korur [84]. Bu araştırmada, şalgam ve gilaburu örneklerinden izole edilen ve FTIR/PCR analizleri ile seçilen 10 adet izolatın Caco-2 bağırsak epitel hücrelerine tutunma oranları Tablo 4.2'de verilmiştir. Çalışmadaki izolatlar, Caco-2 bağırsak hücrelerinde %37-88 aralığında değişen oranlarda tutunma kabiliyeti göstermiştir. En yüksek tutunma oranını SH23 izolatı göstermiş olup (%88,86), Şekil 4.2'de ters mikroskop görüntüsü verilmiştir.

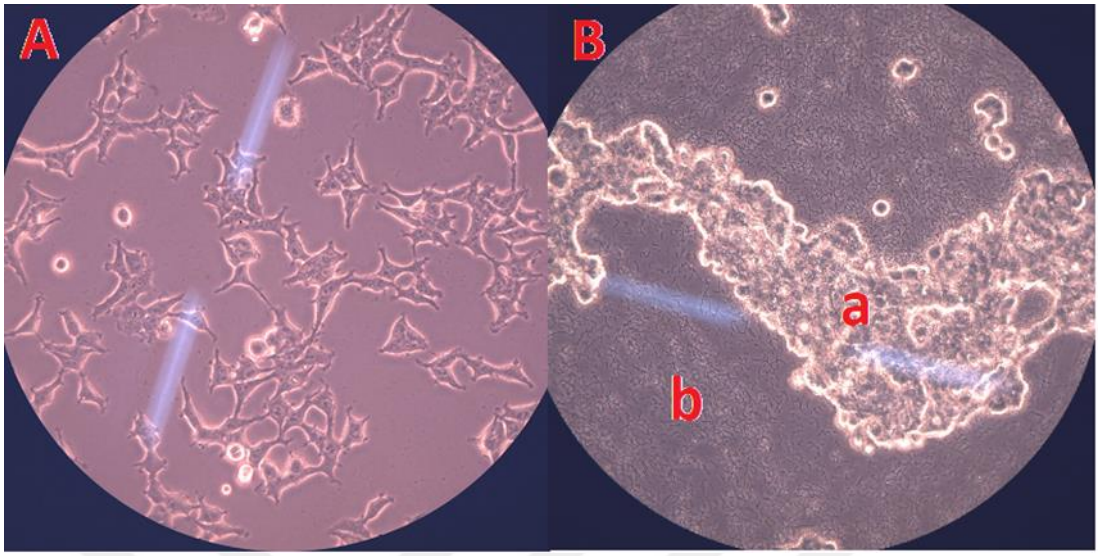
Tablo 4.2 LAB izolatları ve Caco-2 hücrelerine tutunma yetenekleri (%)

Izolat	Suş	Tutunma (%)
G1G	*Limosilactobacillus fermentum* G1G	48,30±1,24^{g}
G4B	*Lactiplantibacillus pentosus* G4B	37,16±2,35^{j}
G4C	*Lactiplantibacillus plantarum* G4C	65,66±0,97^{e}
G4D	*Lactiplantibacillus plantarum* G4D	70,00±1,44^{c}
SH5	*Lactiplantibacillus plantarum* SH5	75,09±2,36^{b}
SH10	*Limosilactobacillus fermentum* SH10	51,88±0,75^{f}
SH11	*Lactiplantibacillus plantarum* SH11	42,26±1,38^{h}
SH14	*Lactiplantibacillus pentosus* SH14	40,56±2,81^{i}
SH23	*Lactiplantibacillus plantarum* SH23	88,86±1,53^{a}
SH35	*Lactiplantibacillus plantarum* SH35	68,30±2,21^{d}

Hücrelere tutunma, Caco-2 hücrelerine yapışan bakteri sayımlarının eklenen toplam bakteri sayısına oranı ile ifade edilir. a-j: Aynı sütundaki farklı küçük harfler, sonuçlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu ($P<0,05$) gösterir.

Literatür incelendiğinde, bakteri hücrelerinin bağırsak epiteline tutunma oranlarının test suşunun orijinine ve in vitro uygulama dozuna bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterdiği görülmektedir [84]. Bu çalışmadaki izolatların epitel hücrelere tutunma oranları, literatür ile karşılaştırıldığında genel olarak daha yüksek seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Örneğin bir çalışmada, *Lacticaseibacillus rhamnosus* suşunun tutunma oranı %7,2-14,4 aralığında bulunurken, başka bir çalışmada aynı kültürün tutunma oranı %0,2 olarak belirlenmiştir [110]. Diğer yandan Tuomola ve Salminen [111], yaptıkları çalışmada *L. plantarum* suşunun tutunma oranının %6,7 düzeyinde olduğunu belirtirken, Moussavi ve Adams [112] bu oranı %80 olarak tespit etmiştir. Benzer bulgular *Bifidobacterum longum* ve *Bif. lactis* için, Candela vd. [113] ve Gagnon vd. [114] tarafından yürütülen çalışmalarda elde edilmiştir. Piatek vd. [84] ise yaptıkları çalışmada, bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine tutunma oranının, test bakterilerinin uygulanma dozuna bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada, $5,5x10^{8}$ kob/mL (*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının karışımı) uygulama dozunda bakteriyel kültürün tutunma oranı %83,1 olarak tespit edilirken, $5,5x10^{6}$ kob/mL oranında inokülasyon yapıldığında tutunma oranı %45,5'e kadar düşmüştür. Buradan probiyotik bakterilerin bağırsak

epitel hücrelerine tutunma oranının inokülasyon konsantrasyonu ile doğrudan ilgili olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.2 Ters mikroskop hücre görüntüleri (40x): (A) Caco-2 hücreleri; (B) Caco-2 hücrelerine tutunan bakteri hücreleri (a) ve tutunamayan bakteri hücreleri (b)

4.2.2 Asit Toleransı

Probiyotik bakterilerin ince bağırsağa ulaşmadan önce mide ortamında çok düşük pH değerlerine (pH<3) dayanması gerekmektedir. Bu açıdan asit toleransı, probiyotik bakteri seçiminde önemli bir kriterdir. Bu çalışmada LAB izolatlarının pH 2,5 seviyesinde gösterdikleri asit tolerans değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Çalışmadaki bütün izolatlar, 3 saatlik inkübasyon süresince pH 2,5 değerinde yüksek dirençle canlı kalmıştır. SH14 ve SH35 izolatları, asidik ortama karşı sırasıyla en dirençli ve en hassas suşlar olarak belirlenmiştir.

Haller vd. [115] tarafından yürütülen bir çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının pH 2,0 asitlik derecesinde %0-93 aralığında farklı oranlarda canlı kaldığı tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, insan anne sütünden *Lacticaseibacillus rhamnosus* elde edilmiş ve bu izolatların pH 2,0 ve pH 3,0 değerlerinde %81 ile %90 aralığında değişen oranlarda canlı kaldığı gözlenmiştir [116].

Tablo 4.3 LAB izolatlarının asit tolerans yetenekleri

İzolat	Canlı mikroorganizma sayısı		
	Başlangıç	İnkübasyon sonu (pH 2,5)	İnkübasyon sonu (pH 6,5)
G1G	$8,27\pm0,04^{ABab}$	$7,64\pm0,29^{Ba}$	$8,62\pm0,34^{Ab}$
G4B	$8,50\pm0,28^{Aab}$	$7,99\pm0,49^{Aa}$	$8,60\pm0,34^{Ab}$
G4C	$8,30\pm0,00^{Bab}$	$8,10\pm0,25^{Ba}$	$9,24\pm0,13^{Aab}$
G4D	$8,50\pm0,28^{ABab}$	$8,03\pm0,38^{Ba}$	$9,09\pm0,20^{Aab}$
SH5	$8,68\pm0,03^{ABa}$	$8,23\pm0,29^{Ba}$	$8,81\pm0,25^{Ab}$
SH10	$8,26\pm0,31^{ABab}$	$7,77\pm0,16^{Ba}$	$8,81\pm0,16^{Ab}$
SH11	$7,77\pm0,67^{ABb}$	$7,34\pm0,74^{Ba}$	$8,82\pm0,15^{Ab}$
SH14	$8,50\pm0,28^{Aab}$	$8,41\pm0,23^{Aa}$	$8,70\pm0,34^{Ab}$
SH23	$8,81\pm0,16^{Ba}$	$8,18\pm0,33^{Ca}$	$9,63\pm0,07^{Aa}$
SH35	$8,55\pm0,21^{Aab}$	$7,69\pm0,22^{Ba}$	$8,79\pm0,17^{Ab}$

A-C: Aynı satırdaki farklı büyük harfler, sonuçlar arasında istatistiki olarak önemli bir fark olduğunu ($P<0,05$) göstermektedir. a-b: Aynı sütundaki farklı küçük harfler, sonuçların önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir ($P<0,05$).

Angmo vd. [117] "Ladakh" geleneksel içeceğinden izole ettikleri, Das vd. [118] ise çeşitli deniz ürünlerinden izole ettikleri LAB suşlarının asit tolerans testlerinde benzer bulgular elde etmişlerdir. Farklı LAB türlerinin düşük pH'lara karşı değişen dirençleri, bakterilerin üreme fazındaki farklılıklarla ilişkili olabilir [117]. Örneğin, *Lactobacillus* türlerinin asit toleransı kabiliyeti, hücre dışı ve hücre içindeki sitoplazmik pH arasındaki denge ile çok yakından ilişkilidir. Hücre içi sitoplazmik pH kritik bir pH değerine ulaştığında hücre dışı ile olan denge bozulduğunda, hücresel aktiviteler durur ve hücreler ölür [119]. Ayrıca laktobasillerde hücre içi pH'yı düzenleyen F0F1-ATPaz enzimi varlığının bu bakteri türünde asidik koşullara karşı stabilite sağladığı düşünülmektedir [120].

4.2.3 Safra Tuzu Toleransı

Safra tuzu direnci, probiyotik seçimindeki bir diğer önemli kriterdir. Safra asitleri ilk olarak karaciğerde sentezlenir ve safra kesesine iletilir ve burada konjuge hale dönüştürülerek ince bağırsağa geçer. Son olarak kalın bağırsakta mikrobiyal aktivite ile dekonjugasyon, dehidroksilasyon, dehidrojenasyon ve

deglukuronidasyon gibi kimyasal değişikliklere uğrar [121]. Bu süreç boyunca, sindirim sisteminde mevcut probiyotik bakteriler, safra asitlerinin ve tuzlarının bu tür konjuge ve konjuge olmayan formlarına maruz kalırlar ve canlı kalmalarını zorlaştırabilir, hatta inhibe olmalarına yol açabilir. Bu nedenle probiyotik olarak seçilen mikroorganizmaların safra tuzlarına karşı direnci, bu inhibisyon etkisine dayanacak kadar güçlü olmalıdır [122]. Bu çalışmada elde edilen LAB izolatlarının safra tuzuna karşı direnci Tablo 4.4'te verilmiştir. Genel olarak bütün izolatlar safra tuzuna karşı yüksek dirençli olup, en yüksek direnci SH11 izolatı göstermiştir. Bununla birlikte %1,5 safra tuzuna en düşük toleransı, %7,33'lük bir azalma oranı ile G1G izolatı sergilemiştir. Benzer bir çalışmada Leite vd. [123], bazı *Lactobacillus* suşlarının %2 safra tuzuna bile oldukça dirençli olduğunu belirlemiştir. Başka bir çalışmada ise deve sütünden farklı türden potansiyel probiyotik LAB suşları izole edilmiş ve bu izolatların %0,3 ve %1 safra tuzu konsantrasyolarında oldukça yüksek oranda canlı kaldığı tespit edilmiştir [124]. Benzer şekilde, Zhang vd. [125], çeşitli fermente gıdalardan *L. paracasei* subp*. paracasei* M5-L, *L. rhamnosus* J10-L, *L. casei* Q8-L ve *L. rhamnosus* GG suşları izole etmiş ve bu izolatların %3 safra tuzu içeren besiyerinde 4 saat inkübasyon sırasında en fazla yaklaşık 1 log kob/mL azalmaya uğradığını göstermiştir.

Literatüre bakıldığında, safra tuzlarının LAB gelişimi üzerinde oldukça farklı seviyelerde etkili olduğu görülmektedir. Bazı LAB suşları %0,1 safra tuzu konsantrasyonuna maruz kaldığında bile canlılığını büyük oranda yitirirken, bazı LAB suşları ise %3 safra tuzu konsantrasyonuna dahi güçlü bir direnç göstermektedir. Örneğin, Zoral [86] tarafından yürütülmüş bir çalışmada, 25 adet farklı LAB suşunun safra tuzuna karşı direnci analiz edilmiş ve istatistiksel olarak önemli farklılıklar ($P<0,05$) olduğu belirtilmiştir. Bahsi geçen bu çalışmada, *Lactobacillus* suşlarının canlılık oranı sırasıyla %0,3 safra tuzu konsantrasyonunda %76, %0,5 safra tuzu konsantrasyonunda %40, %1 safra tuzu konsantrasyonunda %24 ve %1,5 safra tuzu konsantrasyonunda ise %20 olarak tespit edilmiştir. Safra tuzuna karşı toleransı en iyi olan suşların ise *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, L. *pentosus* LS-2, *L. plantarum* LS-11, *L. plantarum* LS-12, *L. fermentum* LS-15, *L. fermentum* LS-16 olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.4 LAB izolatlarının safra tuzu (ST) tolerans yetenekleri

İzolat	Canlı mikroorganizma sayısı (log kob/mL)				
	Başlangıç	**%0,3 ST**	**%0,5 ST**	**%1 ST**	**%1,5 ST**
G1G	$8,28\pm0,04^{ABab}$	$8,31\pm0,01^{Aab}$	$8,24\pm0,28^{ABabcd}$	$7,94\pm0,07^{BCbc}$	$7,68\pm0,03^{Cbc}$
G4B	$8,35\pm0,07^{Aab}$	$8,42\pm0,13^{Aab}$	$8,30\pm0,14^{ABabcd}$	$7,97\pm0,31^{ABbc}$	$7,84\pm0,16^{Bbc}$
G4C	$8,27\pm0,04^{Aab}$	$8,48\pm0,09^{Aa}$	$8,33\pm0,18^{Aabc}$	$8,30\pm0,15^{Aab}$	$8,23\pm0,27^{Aab}$
G4D	$8,20\pm0,14^{BCab}$	$8,53\pm0,02^{Aa}$	$8,46\pm0,08^{ABabc}$	$8,32\pm0,17^{ABCab}$	$8,09\pm0,10^{Cab}$
SH5	$8,65\pm0,07^{ABa}$	$8,81\pm0,53^{Aa}$	$8,04\pm0,45^{ABcd}$	$7,83\pm0,16^{Bbc}$	$7,78\pm0,14^{Bbc}$
SH10	$8,65\pm0,07^{Aa}$	$8,88\pm0,25^{Aa}$	$8,88\pm0,31^{Aa}$	$8,51\pm0,13^{Aa}$	$8,47\pm0,23^{Aa}$
SH11	$8,18\pm0,17^{Aab}$	$8,82\pm0,24^{Aa}$	$8,81\pm0,24^{Aab}$	$8,54\pm0,16^{Aa}$	$8,24\pm0,37^{Aab}$
SH14	$8,77\pm0,32^{Aa}$	$8,23\pm0,16^{ABab}$	$8,11\pm0,18^{Bbcd}$	$8,08\pm0,18^{Babc}$	$8,02\pm0,20^{Bab}$
SH23	$8,21\pm0,27^{ABCab}$	$8,66\pm0,01^{Aa}$	$8,54\pm0,13^{ABabc}$	$8,10\pm0,12^{BCab}$	$7,93\pm0,28^{Cabc}$
SH35	$8,00\pm0,43^{Ab}$	$7,80\pm0,31^{Ab}$	$7,62\pm0,24^{Ad}$	$7,58\pm0,19^{Ac}$	$7,34\pm0,18^{Ac}$

ST: Safra tuzu; A-C: Aynı satırdaki farklı büyük harfler, sonuçlar arasında istatistiki olarak önemli bir fark olduğunu ($P < 0.05$) göstermektedir. a-d: Aynı sütundaki farklı küçük harfler, sonuçların önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir ($P < 0.05$).

Bir başka çalışmada ise, Papamanoli vd. [126] %3,0 safra tuzu konsantrasyonunun *L. sakei, L. curvatus,* ve *L. plantarum* üzerindeki etkisini incelemiş ve bu konsantrasyonun *L. sakei* suşunu % 100, *L. curvatus* suşunu %42 oranında inhibe ettiğini, *L. plantarum* suşu üzerinde ise inhibisyon etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, *L. oris* AS17 ve *L. fermentum* AS83 suşlarının %3,0 oranında safra tuzu içeren ortamda 4 saat süreyle safra tuzu toleransı incelenmiş, bu iki suşun da inkübasyon boyunca canlılıklarını neredeyse tamamen koruyabildikleri belirtilmiştir. Verilen konsantrasyon, bu çalışmada kullanılan en yüksek konsantrasyonun 2 katıdır. Görüldüğü gibi safra tuzu direnci suşlara göre oldukça farklılık göstermektedir. Bazı araştırmacılar bu durumun, bakteride bulunan safra tuzu hidrolaz enzimi (BSH) aktivitesi ile ilişkili olduğunu belirtmektedir. Bu enzim, amid bağlarını hidrolize ederek safra tuzunun toksik etkisini azaltmaktadır. Bu nedenle BSH enzim aktivitesi yüksek olan bakterilerde, safra tuzu direnci de daha güçlü olmaktadır [123, 126-128].

4.2.4 TDC Hidroliz Aktivitesi

TDC hidrolizi kabiliyeti, probiyotik özelliklerde önem verilen bir diğer unsurdur. Çünkü TDC hidroliz aktivitesi sayesinde, gastrointestinal sistemde dekonjuge safra asitleri, bağırsak mikroflorası tarafından sekonder safra asitlerine dönüştürülür ve böylece kandaki serum kolesterol seviyesi düşer ve bu da kardiyovasküler sağlığın korunmasını destekler [129, 130]. Çalışmada elde edilen LAB izolatlarının TDC hidroliz aktiviteleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5 LAB izolatlarının TDC hidroliz aktivitesi

İzolat	TDC hidroliz aktivitesi
G1G	+
G4B	++
G4C	+++
G4D	+++
SH5	++++
SH10	++
SH11	++++
SH14	++++
SH23	+++
SH35	++

TDC aktivitesi tanımı; + zayıf; ++ orta; +++ güçlü; ++++ çok güçlü

Tablo 4.5'te görüldüğü gibi, izolatların tümü TDC hidroliz aktivitesi sergilemiş ve safra tuzlarını değişen seviyelerde dekonjuge etmiştir. En güçlü TDC hidroliz aktivitesini SH5, SH11 ve SH14 suşları sergilerken, en düşük TDC tuzu hidroliz aktivitesini G1G izolatı göstermiştir. Moser ve Savage [131] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 30 adet insan bağırsağı kökenli ve 15 adet süt kökenli LAB izolatının TDC hidroliz aktivitesi incelenmiş ve bu izolatların %55'inin TDC hidroliz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Çeşitli *Lactobacillus* suşlarının TDC hidroliz aktivitesi ve kolesterol düşürme yeteneklerinin incelendiği bir başka çalışmada, 22 adet *Lactobacillus* suşundan 13 tanesinin çok güçlü TDC hidroliz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir [87]. Benzer şekilde, geleneksel Brezilya Coalho peynirinden izole edilen tüm *Lactobacillus* suşlarının, değişken TDC

hidroliz aktivitelerine sahip olduğu rapor edilmiştir [132]. Ayrıca Noriega vd. [133] gerçekleştirdikleri çalışmada, *Bifidobacterium* suşlarının TDC hidroliz aktivitesini incelemiş ve *B. animalis* IPLA 658 hariç hemen hemen tüm suşların TDC hidroliz yeteneğine sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

4.2.5 Antimikrobiyal Aktivite

LAB türlerinin çoğunun organik asit, karbondioksit, diasetil, biyosürfaktanlar, hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve biyoaktif peptitler gibi antimikrobiyal aktivite gösterebilen çeşitli metabolitler ürettiği bilinmektedir ve birçok çalışmada gösterilmiştir [134-136]. Probiyotiklerin gastrointestinal sistemdeki en önemli faydalarından biri de enfeksiyonlara neden olan patojen mikroorganizmaların gelişerek bağırsakta kolonize olmalarını önlemek ve bağırsak sağlığına katkıda bulunmaktır [137]. Bu çalışmada, geleneksel fermente şalgam ve gilaburu sularından izole edilen LAB suşlarının iki Gram pozitif ve iki Gram negatif gıda kaynaklı patojen bakteri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon yöntemi kullanılarak test edilmiş ve sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6 LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitesi

İzolat	İnhibisyon zonları (mm)			
	E. coli O157:H7	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*B. cereus*
G1G	$12,75\pm0,96^{Aa}$	$11,00\pm0,82^{Ad}$	$12,25\pm1,26^{Ac}$	$00,00\pm0,00^{Bd}$
G4B	$00,00\pm0,00^{Bb}$	$00,00\pm0,00^{Be}$	$13,50\pm0,58^{Abc}$	$00,00\pm0,00^{Bd}$
G4C	$00,00\pm0,00^{Bb}$	$13,00\pm0,82^{Abcd}$	$00,00\pm0,00^{Bd}$	$13,50\pm1,29^{Ac}$
G4D	$00,00\pm0,00^{Cb}$	$10,50\pm1,00^{Bd}$	$13,00\pm0,82^{Abc}$	$00,00\pm0,00^{Cd}$
SH5	$13,00\pm3,16^{Ba}$	$13,25\pm0,96^{Bbcd}$	$15,75\pm1,50^{ABb}$	$20,25\pm0,96^{Aa}$
SH10	$11,25\pm0,96^{Ba}$	$14,25\pm0,96^{Ab}$	$14,50\pm0,58^{Abc}$	$15,75\pm0,96^{Ac}$
SH11	$15,25\pm1,26^{Ba}$	$23,25\pm0,96^{Aa}$	$23,50\pm1,00^{Aa}$	$15,00\pm1,63^{Bc}$
SH14	$13,75\pm1,26^{Aa}$	$11,25\pm1,50^{Acd}$	$13,25\pm0,96^{Abc}$	$14,50\pm2,38^{Ac}$
SH23	$14,00\pm2,16^{Aa}$	$14,00\pm1,63^{Abc}$	$14,25\pm2,22^{Abc}$	$16,50\pm1,29^{Abc}$
SH35	$15,25\pm1,26^{Ba}$	$13,00\pm0,82^{Bbcd}$	$13,25\pm0,50^{Bbc}$	$19,25\pm0,96^{Aab}$

A-C: Aynı satırdaki farklı büyük harfler, a-d: Aynı sütundaki farklı küçük harfler, sonuçlar arasında istatistiki olarak önemli bir fark olduğunu ($P<0,05$) göstermektedir.

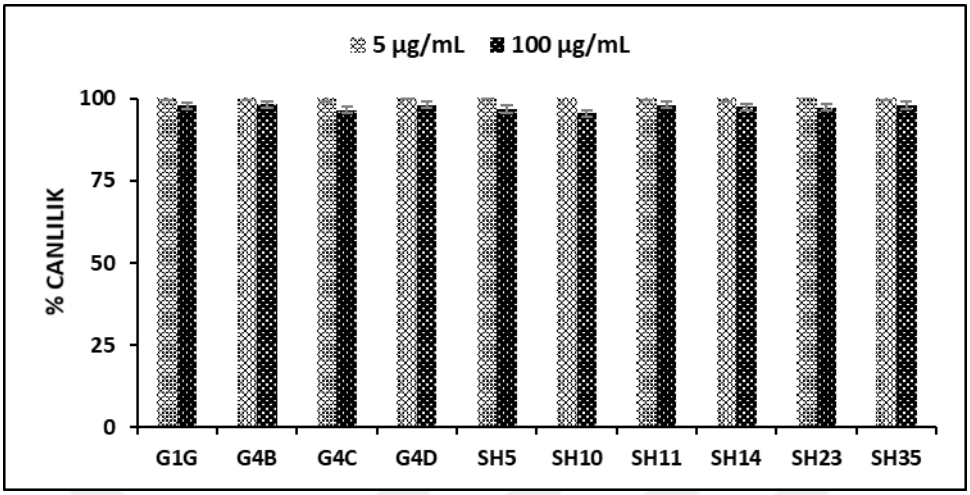
Genel olarak, şalgamdan izole edilen SH5, SH10, SH11, SH14, SH23 ve SH35 izolatları, gilaburudan elde edilen izolatlara göre patojenler üzerinde daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. Diğer yandan, bütün izolatlar Gram pozitif (G+) patojen bakteriler üzerinde Gram negatif (G-) patojen bakterilere kıyasla daha etkili bulunmuştur. Bu farklılık, genel olarak Gram-negatif bakterilerin hücre duvarlarının dış zarının bariyer görevi görmesi nedeniyle daha yüksek dirence sahip olmalarından kaynaklanmaktadır [138]. Literatür incelendiğinde, farklı kaynaklardan izole edilen LAB izolatlarının antimikrobiyal etkilerinin de farklılık gösterdiği görülmektedir. Örneğin, Abushelaibi vd. [124] tarafından gerçekleştirilen ve deve sütünden izole edilen LAB izolatlarının probiyotik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, izolatların çoğunun *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* ve *Stapylococcus aureus* patojenlerine karşı antimikrobiyal etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada, Rajoka vd. [116] anne sütünden izole ettikleri farklı *L. rhamnosus* suşlarının antimikrobiyal etkisini incelemiş ve *E. coli* ATCC 25922, *S.* Typhimurium CMCC (B) 50115, *Staphylococcus petrasii* subsp*. pragensis* KY196531 üzerinde 6-14 mm'lik bir antimikrobiyal inhibisyon zonu oluşturduklarını göstermişlerdir. Başka bir benzer çalışmada ise, *L. acidophilus* ve *L. casei*'nin metisiline dirençli *S. aureus*'a (MRSA) karşı antimikrobiyal etkisi incelenmiş ve uygulanan farklı konsantrasyonlarda 14-37 mm aralığında değişen antimikrobiyal inhibisyon zonları gözlenmiştir [139].

4.2.6 Antibiyotik Direnci

Bakteriyel enfeksiyonlara karşı bilinçsiz şekilde antibiyotik kullanımının artması sonucu, patojenlerin antibiyotiklere karşı yüksek direnç göstermesi tüm dünyada ciddi bir sağlık problemi haline gelmiştir ve bu durum enfeksiyon tedavilerini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle son yıllarda, bağırsak mikrobiyatası açısından LAB türlerinin antibiyotik direncine sahip olması bilimsel araştırmalarda büyük önem kazanmıştır [140]. Birçok çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilen LAB suşlarının antibiyotiklere karşı direnç sağlayabildiği belirtilmiştir [141].

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından geliştirilen “nitelikli güvenlik varsayımı” (QPS) kavramına göre, LAB suşlarında antibiyotik direncinin varlığı

önemli bir güvenlik kriteri haline gelmiştir [142]. Bu çalışmada, LAB'lerin antibiyotik (vankomisin) dirençleri Şekil 4.3'te canlılık yüzdesi olarak verilmiştir.

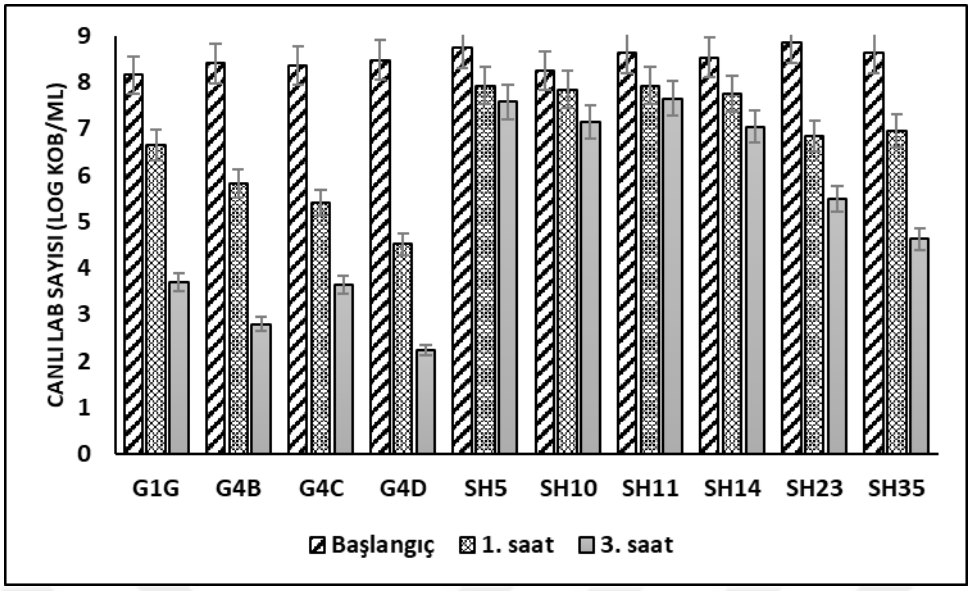


Şekil 4.3 LAB izolatlarının antibiyotik direnci

Bu çalışmadaki bütün izolatlar, 100 μg/mL'lik konsantrasyonda vankomisine enterik direnç sergilemiştir ve aralarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık ($P>0,05$) tespit edilmemiştir. Benzer bir çalışmada, gilaburudan izole edilen LAB izolatları, 30 μg/mL vankomisine karşı güçlü bir direnç göstermişler ve yüksek oranda canlı kalmışlardır [82]. Başka bir çalışmada ise, bozadan izole edilen LAB'leri 0,0625-128 μg/mL konsantrasyon aralığındaki vankomisine maruz bırakılmış ve canlılıklarını yüksek oranda korumuşlardır [141]. Ayrıca, Gad vd. [143], bazı farmasötikler ve süt ürünlerinden izole edilen LAB'lerin antibiyotik direncini incelemiş ve bu LAB izolatlarının %40,6'sının 30 μg/mL'lık vankomisin konsantrasyonunda canlılıklarını koruduklarını belirlemişlerdir.

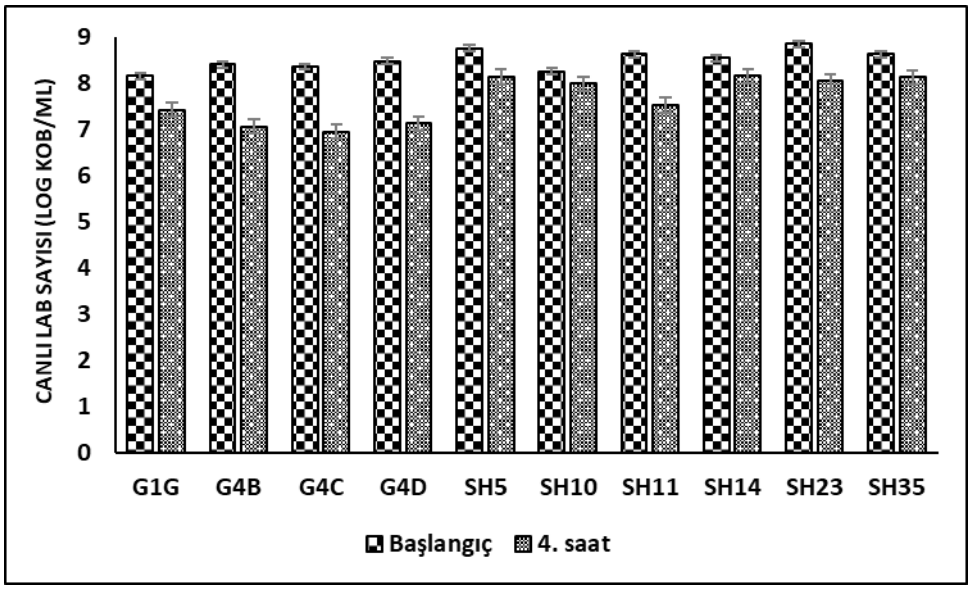
4.2.7 Pepsin ve Pankreatin Toleransı

Bu çalışmada, gilaburu ve şalgamdan izole edilen 10 LAB izolatının pepsin ve pankreatin enzimlerine karşı toleransları sırasıyla Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.5 LAB izolatlarının pepsin toleransı

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi pepsin enzimi varlığında bütün izolatların birinci ve üçüncü saatlerdeki canlılık oranları oldukça değişkenlik göstermiştir. Genel olarak şalgamdan elde edilen izolatlar (SH5, SH10, SH11, SH14, SH23 ve SH35), gilaburudan elde edilen izolatlara göre pepsine karşı daha fazla direnç göstermiştir. En dayanıklı suşlar ise 3 saat sonunda bile en fazla 1 log azalma gösteren SH5, SH10, SH11 ve SH14 izolatları olmuştur.



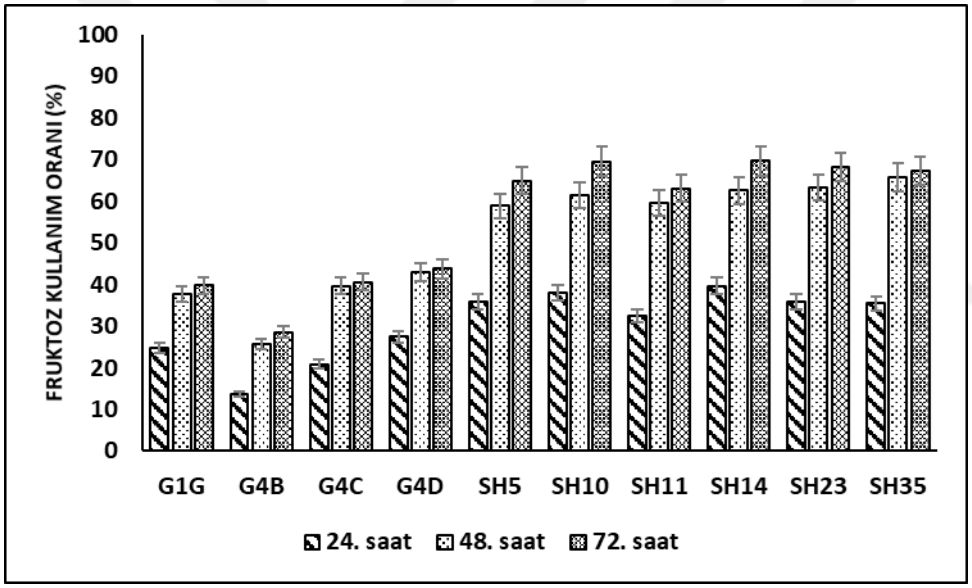
Şekil 4.6 LAB izolatlarının pankreatin toleransı

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, bütün izolatlar 4 saatlik inkübasyon sonunda pankreatine karşı oldukça yüksek direnç göstermiştir. Benzer bulgular

Maragkoudakis vd. [144] tarafından yapılan çalışmada da elde edilmiştir. Bu çalışmada çeşitli süt ürünlerinden izole edilen LAB izolatları oldukça değişken düzeyde pepsin direnci göstermiş, bazı izolatlar ise 3 saatlik inkübasyon sonunda tamamen canlılığını yitirmiştir.

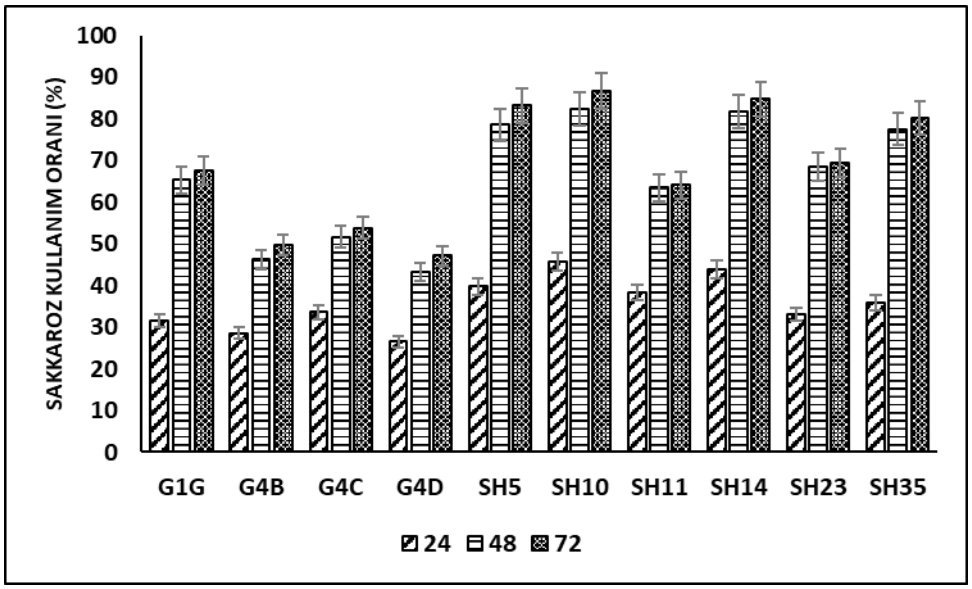
4.2.8 Fruktoz ve Sakkaroz Kullanabilme Yeteneği

Bu araştırmada LAB izolatlarının fermentasyonda karbon kaynağı olarak kullandıkları fruktoz ve sakkaroz miktarlarının yüzde (%) oranları sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir. Genel olarak bütün izolatların 24.-48. saat aralığında şeker kullanma oranlarında önemli ($P<0,05$) artış olmuştur. 48.-72. saat aralığında ise istatistiksel açıdan önemli olmayan ($P>0,05$) minimal düzeyde bir artış (yaklaşık %1-5 arası) gözlenmiştir.



Şekil 4.7 LAB izolatlarının fruktoz kullanım yeteneği (%)

Bölüm 4.3'te verilen fermentasyon optimizasyonu denemelerinde de görülmüştür ki LAB sayısı genel olarak 20-24. saatler arasında logaritmik artış fazını tamamlamakta ve 24. saatten sonra durağan faza geçmektedir. Bu nedenle şeker kullanım oranı da düşmektedir. Nitekim bu analizlerde elde edilen sonuçlar da bunu destekler özelliktedir.



Şekil 4.8 LAB izolatlarının sakkaroz kullanım yeteneği (%)

Genel olarak, şalgamdan izole edilen SH5, SH10, SH11, SH14, SH23 ve SH35 izolatlarının fruktoz ve sakkaroz kullanma yetenekleri gilaburudan izole edilen suşlarınkinden daha yüksek bulunmuştur. Özellikle SH10 izolatı en yüksek şeker kullanma oranına sahiptir.

4.3 Vişne Bazlı İçeceklerin Fermentasyon Optimizasyonu

Bu aşamada, probiyotik potansiyeli en yüksek olan 3 adet izolat (SH5, SH10 ve SH14) kullanılarak, farklı süre ve sıcaklıklarda fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre, LAB sayısı yüksek olan ve duyusal olarak kabul edilebilir nitelikte olan örnekler seçilerek, bu örnekler üzerinde kalite parametrelerine yönelik analizler gerçekleştirilmiştir.

4.3.1 Fermentasyon Süresi Optimizasyonu

Farklı şeker oranları (%9, %12 ve %15) kullanılarak hazırlanan ve pastörize edilen vişne nektarlarına, probiyotik özellikler açısından en iyi değerlere sahip olduğu tespit edilen SH5, SH10 veya SH14 izolatları inoküle edilmiş ve örnekler farklı sıcaklık derecelerinde (20 ^{0}C, 28,5 ^{0}C ve 37 ^{0}C) 48 saat boyunca fermentasyona tabi tutulmuştur. Fermentasyon sırasında 4'er saat aralıklarla LAB sayıları belirlenmiştir. Söz konusu LAB'lerle fermente edilen nektarların LAB sayıları sırasıyla Tablo 4.7, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.7 SH5 izolatı (Lactiplantibacillus plantarum SH5) ile fermente edilen vişne bazlı içeceklerin LAB sayıları

Süre (saat)	VN-9-20-SH5	VN-9-28,5-SH5	VN-9-37-SH5	VN-12-20-SH5	VN-12-28,5-SH5	VN-12-37-SH5	VN-15-20-SH5	VN-15-28,5-SH5	VN-15-37-SH5
0	9,51±0,25	9,51±0.25	9,51±0,25	9,51±0,25	9,51±0,25	9,51±0,25	9,51±0.25	9,51±0,25	9,51±0,25
4	9,51±0,13	9,53±0.15	9,74±0,24	9,56±0,12	9,72±0,29	9,54±0,22	9,53±0.17	9,55±0,26	9,64±0,21
8	9,53±0,15	9,63±0.12	9,78±0,22	9,59±0,16	9,85±0,07	9,59±0,30	9,56±0.35	9,62±0,17	9,62±0,31
12	9,55±0,24	9,64±0.14	9,91±0,27	9,76±0,52	9,93±0,04	9,66±0,23	9,56±0.00	9,63±0,04	9,50±0,33
16	9,60±0,12	9,70±0.16	9,66±0,15	9,87±0,43	9,91±0,09	9,96±0,05	9,59±0.51	9,70±0,05	9,46±0,27
20	9,62±0,29	9,55±0.07	9,63±0,03	9,46±0,12	9,70±0,32	9,65±0,28	9,66±0.45	9,83±0,21	9,39±0,21
24	9,57±0,21	9,53±0.10	9,53±0,10	9,43±0,16	9,68±0,10	9,50±0,33	9,64±0.45	9,62±0,03	9,37±0,46
28	9,52±0,17	9,48±0.09	9,48±0,00	9,44±0,07	9,49±0,23	9,14±0,06	9,64±0.45	9,62±0,03	9,29±0,27
32	9,49±0,26	9,44±0.07	9,21±0,05	9,47±0,11	9,49±0,19	9,10±0,11	9,60±0.15	9,60±0,08	9,10±0,11
36	9,46±0,20	9,33±0.04	9,25±0,10	9,46±0,09	9,45±0,01	9,03±0,21	9,27±0.14	9,58±0,03	9,10±0,01
40	9,43±0,50	9,30±0.00	9,30±0,14	9,39±0,12	9,41±0,14	8,90±0,28	9,33±0.04	9,59±0,02	8,59±0,01
44	9,42±0,26	9,27±0.04	9,23±0,08	9,30±0,17	9,35±0,07	8,62±0,03	9,25±0.10	9,58±0,04	8,55±0,01
48	9,31±0,05	9,22±0,06	8,19±0,12	9,18±0,25	9,36±0,32	8,65±0,07	9,22±0,12	9,59±0,21	8,55±0,21

*Örnek kodlarındaki VN vişne nektarını; 9, 12 ve 15 örneklerin % şeker miktarlarını, 20; 28,5 ve 37 ise fermente edildikleri sıcaklık derecelerini (°C) temsil etmektedir.

Tablo 4.7'de görüldüğü gibi, genel olarak, 20 °C ve 28,5 °C'de inkübe edilen örneklerde SH5 hücre canlılığı daha yüksek ve dengeli iken, 37 °C'de inkübe edilen örneklerde ilk 16 saatte canlı bakteri sayısında bir artış ve daha sonra durağan faza geçiş ve hafif bir azalış trendi gözlenmiştir. Vişne bazlı içeceklerde meydana gelen sınırlı artış ve erkenden durağan faza geçiş vişnenin doğal asitliğinin yüksek olmasından ve fermentasyon sırasındaki yeni oluşan laktik asit ve diğer metabolitlerden kaynaklanabilir. Vişne nektarı "berrak meyve suyu proses hattı" ürünü olduğu için kullanılan vişne suyu konsantresi içerisinde vişne meyvesinden gelen pektinli lifli yapılar nektar üretimi esnasında enzimlerle parçalanıp çöktürülerek uzaklaştırılmakta ve böylelikle berrak meyve suyu elde edilmektedir [145]. Dolayısıyla, vişne suyunda LAB gelişimini teşvik edebilecek diyet liflerin olmaması, ayrıca düşük pH ve düşük kuru madde oranı, LAB izolatlarının daha fazla stres altında kalmasına neden olmuş ve bundan dolayı fermentasyon optimizasyonunda LAB gelişiminin sınırlı olmasına yol açmıştır. Benzer şekilde, SH14 ve SH10 izolatlarını içeren örneklerden 20 °C ve 28,5 °C'de inkübe edilen örneklerde bakteri canlılığı daha yüksek ve dengeli iken, 37 °C'de inkübe edilen örneklerde ilk 16 saatte canlı bakteri sayısında hızlı bir artış ve daha sonra hızlı bir azalış gözlenmiştir. Bu durum da yine aynı şekilde örneklerdeki asitlik artışı ve ozmotik denge ile ilgilidir. Sonuç olarak, Tablo 4.7, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da verilen sonuçlar değerlendirildiğinde, vişne bazlı içecek fermentasyonunda optimum fermentasyon süresi 20 saat olarak belirlenmiştir. 20 saat seçilmesinin sebebi, 16 saatte en yüksek bakteri sayısına ulaştıktan sonra durağan (denge) fazına geçmesi ve bu süreçte de mevcut şeker içeriğini kullanmaya devam ederek daha fazla kalori düşüşü beklenmesidir.

Tablo 4.8 SH14 izolatı (Lactiplantibacillus pentosus SH14) ile fermente edilen vişne bazlı içeceklerin LAB sayıları

Süre (saat)	VN-9-20-SH14	VN-9-28,5-SH14	VN-9-37-SH14	VN-12-20-SH14	VN-12-28,5-SH14	VN-12-37-SH14	VN-15-20-SH14	VN-15-28,5-SH14	VN-15-37-SH14
0	9,45±0,11	9,45±0,11	9,45±0,11	9,45±0,11	9,45±0,11	9,45±0,11	9,45±0,11	9,45±0,11	9,45±0,11
4	9,49±0,10	9,48±0,37	9,37±0,28	9,48±0,10	9,49±0,20	9,28±0,17	9,49±0,45	9,46±0,02	9,48±0,27
8	9,51±0,16	9,51±0,05	8,87±0,18	9,66±0,04	9,72±0,03	9,15±0,03	9,57±0,15	9,38±0,02	9,42±0,24
12	9,58±0,11	9,64±0,27	8,62±0,11	9,47±0,01	9,60±0,09	8,89±0,16	9,46±0,14	9,36±0,30	9,26±0,38
16	9,64±0,05	9,41±0,02	8,58±0,26	9,42±0,24	9,55±0,00	8,72±0,03	9,40±0,04	9,31±0,01	9,15±0,03
20	9,45±0,22	9,37±0,35	8,54±0,24	9,40±0,10	9,47±0,11	8,68±0,03	9,31±0,10	9,30±0,11	9,12±0,17
24	9,36±0,31	9,33±0,09	7,72±0,08	9,34±0,19	9,30±0,36	7,70±0,00	9,28±0,12	9,27±0,05	9,04±0,06
28	9,34±0,34	9,31±0,36	7,68±0,03	9,33±0,04	9,30±0,36	7,70±0,00	9,25±0,08	9,15±0,04	8,96±0,31
32	9,30±0,36	9,24±0,09	7,30±0,00	9,32±0,35	9,24±0,34	7,62±0,11	9,14±0,06	9,04±0,06	8,81±0,16
36	9,22±0,11	9,22±0,06	6,78±0,00	9,31±0,16	9,23±0,32	7,57±0,12	9,07±0,10	9,01±0,01	8,09±0,12
40	9,10±0,11	9,22±0,32	6,70±0,00	9,29±0,03	9,17±0,24	7,54±0,00	9,03±0,04	8,94±0,09	7,85±0,21
44	9,09±0,12	9,14±0,20	6,70±.0,00	9,18±0,01	9,10±0,11	7,35±0,49	9,01±0,01	8,94±0,09	7,70±0,00
48	8,96±0,05	9,12±0,17	6,70±0,00	9,18±0,01	9,02±0,03	6,70±0,00	9,01±0,01	8,92±0,11	6,18±0,00

*Örnek kodlarındaki VN vişne nektarını; 9, 12 ve 15 örneklerin % şeker miktarlarını, 20; 28,5 ve 37 ise fermente edildikleri sıcaklık derecelerini (°C) temsil etmektedir.

Tablo 4.9 SH10 izolatı (Limosilactobacillus fermentum SH10) ile fermente edilen vişne bazlı içeceklerin LAB sayıları

Süre (saat)	VN-9-20-SH10	VN-9-28,5-SH10	VN-9-37-SH10	VN-12-20-SH10	VN-12-28,5-SH10	VN-12-37-SH10	VN-15-20-SH10	VN-15-28,5-SH10	VN-15-37-SH10
0	9,49±0,12	9,49±0,12	9,49±0,12	9,49±0,12	9,49±0,12	9,49±0,12	9,49±0,12	9,49±0,12	9,49±0,12
4	9,51±0,08	9,50±0,00	9,46±0,12	9,49±0,08	9,47±0,21	9,38±0,00	9,54±0,15	9,50±0,07	9,52±0,20
8	9,63±0,06	9,55±0,06	9,02±0,21	9,62±0,08	9,68±0,03	9,22±0,15	9,57±0,15	9,67±0,09	9,42±0,24
12	9,72±0,08	9,65±0,02	8,68±0,03	9,69±0,01	9,58±0,11	9,10±0,08	9,65±0,01	9,67±0,03	9,23±0,33
16	9,64±0,05	9,61±0,05	8,69±0,03	9,54±0,14	9,47±0,11	8,72±0,02	9,64±0,10	9,65±0,23	9,15±0,03
20	9,44±0,22	9,56±0,04	8,56±0,12	9,37±0,05	9,47±0,11	8,65±0,06	9,64±0,01	9,50±0,04	9,10±0,13
24	9,37±0,29	9,43±0,13	7,75±0,12	9,28±0,07	9,34±0,34	7,68±0,03	9,50±0,03	9,49±0,08	9,01±0,01
28	9,35±0,32	9,49±0,25	7,70±0,09	9,25±0,36	9,30±0,36	7,68±0,03	9,44±0,00	9,36±0,04	8,91±0,13
32	9,29±0,36	9,35±0,06	7,40±0,04	9,25±0,10	9,20±0,28	7,59±0,16	9,36±0,02	9,27±0,02	8,77±0,10
36	9,22±0,11	9,34±0,05	7,00±0,07	9,21±0,08	9,23±0,32	7,57±0,12	9,22±0,10	9,15±0,00	8,05±0,07
40	9,12±0,08	9,31±0,19	6,93±0,10	9,23±0,05	9,12±0,17	7,54±0,00	9,12±0,02	9,15±0,07	7,95±0,07
44	9,10±0,11	9,23±0,07	6,70±0,09	9,18±0,01	9,12±0,08	7,55±0,21	9,03±0,01	9,12±0,03	7,74±0,03
48	8,99±0,02	9.14±0,20	6,54±0,07	9,16±0,02	9,11±0,10	7,00±0,04	9,01±0,14	9,04±0,01	7,40±0,06

*Örnek kodlarındaki VN vişne nektarını; 9, 12 ve 15 örneklerin % şeker miktarlarını, 20; 28,5 ve 37 ise fermente edildikleri sıcaklık derecelerini (°C) temsil etmektedir.

Literatür incelendiğinde, vişne benzeri çeşitli meyveler kullanılarak üretilen laktofermente içeceklerde pH, fermentasyon süresi ve fermentasyon sıcaklığının LAB sayısını önemli ölçüde etkilediği görülmektedir. Örneğin Rafiq vd. [146] tarafından yürütülen bir çalışmada, havuç suyu farklı LAB suşları ile farklı sıcaklık ve pH değerlerinde 24 saat fermente edilmiş ve optimum pH değeri 6, optimum sıcaklık değeri 30 $^{\circ}$C olarak belirlenmiştir. Ayrıca başlangıç inokülasyon yükü 7 log kob/mL iken, fermentasyon sonrası LAB sayısı 7,40 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada, kavun suyu *Lactobacillus casei* NRRL B-442 kullanılarak fermente edilmiş ve fermentasyon için optimum süre 8 saat, optimum sıcaklık 31 $^{\circ}$C ve optimum pH 6,1 olarak belirlenmiştir. Ayrıca başlangıç inokülasyon miktarı 7 log kob/mL iken, optimum koşullardaki fermentasyon sonrasında LAB sayısı 8,3 log kob/mL olarak tespit edilmiştir [147]. Pereira vd. [72] gerçekleştirdikleri çalışmada, elma suyunu *Lactobacillus casei* ile fermente etmiş ve farklı sıcaklık, pH, inkübasyon süresi ve inokülasyon oranı kullanarak fermentasyon optimizasyon koşullarını incelemişlerdir. Sonuç olarak laktofermente içecek için optimum koşulları 7,48 log kob/mL inokülasyon miktarı, 30 ^{0}C inkübasyon sıcaklığı, 16 saat inkübasyon süresi, pH 6,4 olarak belirtmişlerdir. Ayrıca 16 saatlik inkübasyon sonrası laktofermente elma suyundaki toplam LAB miktarını yaklaşık 8,2 log kob/mL olarak tespit etmişlerdir.

4.3.2 Duyusal Özellikler

Optimum fermentasyon süresi 20 saat olarak belirlendikten sonra, probiyotik vişne bazlı içecek örnekleri bu süre baz alınarak fermente edilmiş ve fermentasyon sonrası 4 ^{0}C'de soğutularak duyusal analiz yapılmış ve ardından 10 günlük süreyle soğukta depolama yapılmıştır. 9 panelistin katıldığı duyusal değerlendirme sonucundaki ortalama genel beğeni skorları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10 Probiyotik vişne bazlı içecek örneklerinin genel beğeni değerleri

Örnek	Genel beğeni	Örnek	Genel beğeni	Örnek	Genel beğeni
VN-9-20-SH5	4,4	VN-9-20-SH10	3,4	VN-9-20-SH14	2,7
VN-9-28,5-SH5	6,4	VN-9-28,5-SH10	6,9	VN-9-28.5-SH14	7,0
VN-9-37-SH5	6,3	VN-9-37-SH10	7,2	VN-9-37-SH14	3,6
VN-12-20-SH5	3,3	VN-12-20-SH10	3,4	VN-12-20-SH14	4,7
VN-12-28,5-SH5	6,2	VN-12-28,5-SH10	5,2	VN-12-28.5-SH14	7,4
VN-12-37-SH5	6,4	VN-12-37-SH10	6,1	VN-12-37-SH14	7,6
VN-15-20-SH5	2,5	VN-15-20-SH10	2,5	VN-15-20-SH14	4,3
VN-15-28,5-SH5	5,0	VN-15-28,5-SH10	3,2	VN-15-28.5-SH14	4,2
VN-15-37-SH5	4,1	VN-15-37-SH10	1,9	VN-15-37-SH14	3,6

*Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9, 12 ve 15 örneklerin % şeker miktarlarını, 20; 28,5 ve 37 ise fermente edildikleri sıcaklık derecelerini (^{o}C) temsil etmektedir.

Tablo 4.10 incelendiğinde, örneklerin beğeni skorlarının oldukça değişken olduğu görülmektedir. Genel olarak, 20 ˚C'de fermente edilen vişne bazlı örneklerde genel beğeni düşük skorlar almıştır. Benzer şekilde, %15 oranında şeker içeren örneklerde de genel beğeni düşük olmuştur. Panelistler bu örnekler için "fazla şekerli" ve/veya "fazla asidik" yorumlarını yapmıştır. Diğer taraftan, LAB çeşidi fark etmeksizin %9 veya %12 şeker içeren ve 28,5 ˚C veya 37 ˚C'de fermente edilmiş bütün örnekler panelistler tarafından duyusal olarak kabul edilebilir nitelikte bulunmuştur. Laktofermente içecekler yüksek asitliğe sahip olabildiği için her tüketici için cazip bir seçenek olmayabilir. Muhialdin vd. [148] bu sorunu bertaraf etmek için farklı bir yaklaşım geliştirmiş ve ejder meyvesi suyunun asitliğini azaltmak amacıyla meyve suyu içerisine liyofilize edilmiş ejder meyvesi suyu eklemiştir. Ancak, 37 erkek ve 18 kadın panelist tarafından gerçekleştirilen duyusal değerlendirme sonucunda, taze meyve suyu ile liyofilize meyve suyu karıştırılmış örnekler arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunamamıştır. Başka bir çalışmada, jicama, kış kavunu ve havuç kullanılarak karışık meyve suyu elde edilmiş ve *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* ile fermente edilmiştir. Panelistler duyusal değerlendirmede

laktofermente örneklere 9 puanlık hedonik skala ölçüsü ile 5-8 arası genel beğeni puanı vermiş ve kontrol grubuna kıyasla daha çok kabul edilebilir bulmuşlardır. Ayrıca, fermentasyon esnasında örneklere %10 oranında sükroz ilave edilmesi, duyusal özellikleri iyileştirmiştir [149].

4.3.3 LAB Canlılığı

Laktofermente içecekler için starter kültür olarak seçilen izolatların depolama sürecinde canlılıklarının nasıl etkilendiği belirlemek için örnekler 4 ^{0}C'de 10 günlük bir ön depolamaya tabi tutulmuş ve bu örneklerde fermentasyon öncesi, fermentasyon sonrası ve depolamanın 10. günü LAB sayıları tespit edilmiştir. Elde edilen canlılık değerleri, optimizasyonda göz önünde bulundurulmuştur. Laktofermente vişne bazlı içeceklerde tespit edilen LAB sayıları Tablo 4.11'de görülmektedir. Tablo 4.11 incelendiğinde, 20 saatlik fermentasyon sonucunda LAB sayılarında başlangıç inokülasyon oranına kıyasla azalış olduğu görülmektedir. Fermentasyonun başlangıç safhasında ortama adapte olan starter kültürler ilk etapta sayısal olarak artış göstermiş, sonrasında ise fermentasyon ilerledikçe pH değişikliği, metabolit birikimi ve rekabet gibi nedenlere bağlı olarak LAB sayısı azalmaya başlamıştır. Nitekim elde edilen bu bulgular, Tablo 4.7, 4.8 ve 4.9'da verilen fermentasyon süre optimizasyonu bulguları ile uyum içerisindedir. Ayrıca, hemen hemen bütün örneklerde 10 günlük depolama sonunda 8 log kob/mL civarında LAB canlılığı muhafaza edilmiştir.

Tablo 4.11 Probiyotik vişne bazlı içeceklerdeki LAB sayısı (log kob/mL)

Örnek*	Başlangıç	Ferm. Sonu	10. gün
VN-9-20-SH5	9,71±0,08	9,13±0,15	8,14±0,16
VN-9-28,5-SH5	9,71±0,08	9,41±0,08	8,44±0,23
VN-9-37-SH5	9,71±0,08	9,54±0,02	8,61±0,08
VN-12-20-SH5	9,71±0,08	9,23±0,18	8,28±0,14
VN-12-28,5-SH5	9,71±0,08	9,56±0,06	8,82±0,14
VN-12-37-SH5	9,71±0,08	9,47±0,08	8,54±0,16
VN-15-20-SH5	9,71±0,08	9,20±0,15	8,29±0,15
VN-15-28,5-SH5	9,71±0,08	9,32±0,11	8,48±0,15
VN-15-37-SH5	9,71±0,08	9,27±0,12	8,38±0,05
VN-9-20-SH10	9,73±0,19	8,80±0,13	8,01±0,06
VN-9-28,5-SH10	9,73±0,19	9,41±0,24	8,40±0,25
VN-9-37-SH10	9,73±0,19	9,34±0,15	8,44±0,29
VN-12-20-SH10	9,73±0,19	8,79±0,11	7,94±0,23
VN-12-28,5-SH10	9,73±0,19	9,45±0,12	8,58±0,27
VN-12-37-SH10	9,73±0,19	9,13±0,33	8,38±0,26
VN-15-20-SH10	9,73±0,19	9,06±0,08	7,92±0,28
VN-15-28,5-SH10	9,73±0,19	9,59±0,11	8,65±0,05
VN-15-37-SH10	9,73±0,19	9,13±0,16	8,38±0,25
VN-9-20-SH14	9,67±0,07	8,74±0,07	8,12±0,14
VN-9-28,5-SH14	9,67±0,07	9,40±0,18	8,51±0,17
VN-9-37-SH14	9,67±0,07	9,27±0,34	8,31±0,41
VN-12-20-SH14	9,67±0,07	8,71±0,02	8,18±0,19
VN-12-28,5-SH14	9,67±0,07	9,53±0,04	9,07±0,21
VN-12-37-SH14	9,67±0,07	9,04±0,30	8,39±0,08
VN-15-20-SH14	9,67±0,07	8,93±0,17	8,37±0,26
VN-15-28,5-SH14	9,67±0,07	9,57±0,10	8,70±0,27
VN-15-37-SH14	9,67±0,07	9,03±0,05	8,44±0,24

*Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9, 12 ve 15 örneklerin % şeker miktarlarını, 20; 28,5 ve 37 ise fermente edildikleri sıcaklık derecelerini (°C) temsil etmektedir.

4.3.4 Kalori Değerleri

10 günlük ön depolamaya tabi tutalan laktofermente içeceklerin LAB sayıları ve duyusal özellikleri baz alınarak Bölüm 3.4.2'de verilen formülasyona göre hesaplama yapılmış ve bu hesaplama sonucunda 8 ve üzeri puan alan örnekler toplam kalori analizine tabi tutulmuştur. Fermentasyon sonrası kalori

değerlerinde meydana gelen azalma yüzde olarak hesaplanmıştır. Tablo 4.12'de hesaplama sonucu vişne bazlı içecek örneklerinin almış oldukları skorlar görülmektedir.

Tablo 4.12 Probiyotik vişne bazlı içeceklerin LAB sayıları ve duyusal özellikleri baz alınarak hesaplanan toplam skorları

Örnek	Toplam skor	Örnek	Toplam skor	Örnek	Toplam skor
VN-9-20-SH5	7,04	VN-9-20-SH10	6,48	VN-9-20-SH14	6,20
VN-9-28,5-SH5	8,01	VN-9-28,5-SH10	8,20	VN-9-28,5-SH14	8,26
VN-9-37-SH5	8,06	VN-9-37-SH10	8,30	VN-9-37-SH14	6,81
VN-12-20-SH5	6,67	VN-12-20-SH10	6,46	VN-12-20-SH14	7,00
VN-12-28,5-SH5	8,07	VN-12-28,5-SH10	7,58	VN-12-28,5-SH14	8,59
VN-12-37-SH5	8,06	VN-12-37-SH10	7,77	VN-12-37-SH14	8,33
VN-15-20-SH5	6,34	VN-15-20-SH10	6,21	VN-15-20-SH14	6,97
VN-15-28,5-SH5	7,42	VN-15-28,5-SH10	6,85	VN-15-28,5-SH14	7,25
VN-15-37-SH5	7,02	VN-15-37-SH10	6,09	VN-15-37-SH14	6,74

*Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9, 12 ve 15 örneklerin % şeker miktarlarını, 20; 28,5 ve 37 ise fermente edildikleri sıcaklık derecelerini (°C) temsil etmektedir.

Toplam skor değeri 8 ve üzeri olan 9 adet laktofermente vişne bazlı içecek örneğinin toplam kalori değerleri analiz edilmiş ve kalori değerleri Tablo 4.13'te verilmiştir. Bu çalışmada fermentasyonla örneklerde en az %30 kalori düşüşü hedeflenmiştir.

Tablo 4.13 Fermente vişne nektarlarının toplam kalori değerleri ve % azalış oranı

Kontrol	Örnek*	Kalori (kcal/100 mL)	Azalış (%)
%9 şeker içeren vişne nektarı (59,5 kcal/100 mL)	VN-9-28,5-SH5	44,00±0,75	26,05
	VN-9-37-SH5	50,70±1,02	14,79
	VN-9-28,5-SH10	36,40±1,35	38,82
	VN-9-37-SH10	32,00±0,67	46,22
	VN-9-28,5-SH14	27,84±1,15	53,21
%12 şeker içeren vişne nektarı (72,0 kcal/100 mL)	VN-12-28,5-SH5	44,20±0,50	38,61
	VN-12-37-SH5	48,50±1,20	32,64
	VN-12-28,5-SH14	40,50±0,65	43,75
	VN-12-37-SH14	42,00±1,00	41,67

*Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9, 12 ve 15 örneklerin % şeker miktarlarını, 20; 28,5 ve 37 ise fermente edildikleri sıcaklık derecelerini (°C) temsil etmektedir.

Tablo 4.13'te görüldüğü gibi, laktofermente içeceklerin kalori değerlerinde, kontrol grubu taze vişne nektarlarına kıyasla %14-53 aralığında azalış meydana gelmiştir. Çalışmada hedeflenen %30 azalma oranı, 9 örneğin 7 tanesinde sağlanmıştır. Günümüzde sağlıklı yaşam bilincinin artması ile birlikte kalorisi ve şeker içeriği düşük olan ürünlere olan talep de artmaktadır. Diğer yandan tüm dünyada Tip 2 diyabet ve obezite hastalıklarındaki artış da göz önünde bulundurulursa, tüketiciler için bu tarz fermente ürün alternatiflerinin olması yavaş yavaş bir gereklilik haline gelmeye başlamıştır. Nitekim, bu çalışmadaki duyusal analiz sonuçlarına göre de fermente edilmiş vişne bazlı içecekler, şeker dengesi bakımından fermente olmamış kontrol örneğine kıyasla panelistler tarafından daha fazla kabul edilebilir bulunmuştur. Benzer bir çalışmada, ananas suyu kefir taneleri ile fermente edilmiş ve osmotik dehidrasyonla diyet lif içeriği artırılarak kalorisi düşürülmüştür [150]. Chand vd. [151] tarafından yürütülen çalışmada ise, %8 şeker ilavesi içeren sütlü içecekler, çeşitli probiyotik kültürlerle fermente edilerek düşük kalorili laktofermente içecekler elde edilmiş ve soğuk

depolama koşulları altında duyusal ve fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Başka bir çalışmada, hünnap suyu çeşitli probiyotik kültürlerle fermente edilmiş ve D-glukoz izomeraz (GI) ve D-alüloz 3-epimeraz (DAE) enzimleri ile glukoz ve fruktoz, düşük kalorili ve daha tatlı olan D-alüloza dönüştürülmüştür [152].

4.4 Vişne Bazlı Laktofermente İçeceklerin Depolanması

Vişne bazlı laktofermente içecekler 28 gün boyunca 4 ^{0}C'de depolanmış ve depolama boyunca 7 günlük periyotlarda aşağıda verilen ölçümler gerçekleştirilmiştir.

4.4.1 Briks

Vişne bazlı laktofermente içeceklerin 28 günlük depolama boyunca briks değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerler Tablo 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.14 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin briks değerlerinin depolama boyunca değişimi

Örnek türü	Briks				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
VN9-Kontrol	28,71±0,06^{Ab}	28,64±0,21^{Ab}	28,77±0,02^{Ab}	28,83±0,11^{Ab}	28,76±0,03^{Ab}
VN12-Kontrol	29,87±0,06^{Aa}	29,80±0,10^{Aa}	29,77±0,06^{Aa}	29,67±0,06^{Aa}	29,67±0,15^{Aa}
VN9-SH10	25,33±0,06^{Af}	25,13±0,06^{ABd}	25,10±0,10^{ABd}	25,07±0,15^{ABe}	24,93±0,12^{Bd}
VN12-SH5	27,20±0,06^{Ae}	27,17±0,31^{Ac}	27,27±0,42^{Ac}	27,17±0,25^{Ad}	27,00±0,26^{Ac}
VN12-SH14	27,83±0,06^{Ad}	27,53±0,25^{Ac}	27,70±0,20^{Ac}	27,60±0,17^{Ac}	27,43±0,15^{Ac}
VN9-Miks	28,55±0,06^{Ac}	28,69±0,15^{Ab}	28,41±0,31^{Ab}	28,45±0,06^{Ab}	28,52±0,42^{Ab}

Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Tablo 4.14'te görüldüğü gibi, depolamanın başlangıcında laktofermente vişne bazlı içeceklerin briks değerlerinde kontrol örneklerine kıyasla istatistiksel olarak önemli ($P<0,05$) azalmalar olmuştur. Depolama boyunca en yüksek briks değeri

(P<0,05) her zaman kontrol örneklerde kalmıştır. Diğer yandan, depolama boyunca bütün örneklerin briks değerlerinde azalma olmuştur ancak bu azalmalar istatiastiksel olarak önemli (P>0,05) olmamıştır. Bu azalmaların düşük seviyelerde olması, depolama süresince bakteriyel aktivitenin de sınırlı olduğunu göstermektedir. Güney ve Güngörmüşler [153] gerçekleştirdikleri çalışmada, enginar, ananas, kabak, ıspanak ve salatalık sularını karıştırarak sebze suyu elde etmiş ve probiyotik LAB'ler ve bifidobakterler ile fermente etmişlerdir. Fermentasyon sonucunda briks değerlerinde %0,7-2,3 arasında azalmalar belirlenmiştir. Zandi vd. [154] tarafından yürütülen başka bir çalışmada havuç, şeker kamışı ve elma suyu karışımının fermentasyonu ile briks değerlerindeki düşüş %1-1,5 düzeylerinde gerçekleşmiştir.

4.4.2 pH ve Titrasyon Asitliği

Tablo 4.15'de laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında pH değerlerinde meydana gelen değişim görülmektedir.

Tablo 4.15 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin pH değerlerinin depolama boyunca değişimi

Örnek türü	pH değeri				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
VN9-Kontrol	$3,54\pm0,01^{Ab}$	$3,54\pm0,01^{Ac}$	$3,54\pm0,00^{Ab}$	$3,54\pm0,01^{Ab}$	$3,54\pm0,01^{Ac}$
VN12-Kontrol	$3,54\pm0,01^{Ab}$	$3,54\pm0,01^{Ac}$	$3,54\pm0,00^{Ab}$	$3,54\pm0,01^{Ab}$	$3,54\pm0,01^{Ac}$
VN9-SH10	$3,61\pm0,01^{Aba}$	$3,61\pm0,01^{Aab}$	$3,60\pm0,01^{ABCa}$	$3,59\pm0,01^{BCa}$	$3,59\pm0,01^{Cb}$
VN12-SH5	$3,62\pm0,01^{Aa}$	$3,62\pm0,00^{ABab}$	$3,61\pm0,01^{BCa}$	$3,59\pm0,01^{CDa}$	$3,59\pm0,01^{Db}$
VN12-SH14	$3,63\pm0,01^{Aa}$	$3,62\pm0,01^{Aba}$	$3,61\pm0,01^{BCa}$	$3,60\pm0,01^{Ca}$	$3,60\pm0,01^{Cab}$
VN9-Miks	$3,62\pm0,01^{Aa}$	$3,61\pm0,01^{Bb}$	$3,61\pm0,01^{Ba}$	$3,61\pm0,01^{Ba}$	$3,61\pm0,01^{Ba}$

Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark (P<0,05) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektir.

Tablo 4.15'e göre, fermentasyon sonrasında laktofermente örneklerin pH değerlerinde 0,7-0,9 birimlik artış gözlenmiştir. Mousavi vd. [155] tarafından gerçekleştirilen benzer bir çalışmada, *L. plantarum* ve *L. delbrueckii* ile fermente edilen nar sularının pH değerlerinin fermentasyon sonrası arttığı, toplam asitliklerinin ise azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, starter kültürün birincil karbon kaynağı olarak meyve suyundaki sitrik asidin kullanması ile ilişkilendirilmiştir. Başka bir çalışmada, elma suları farklı başlangıç pH değerlerinde (3,5; 4,2 ve 5,1) hazırlanmış, *L. plantarum* PCS 26 ile fermente edilmiştir. Başlangıç pH değerleri 5,1 ve 4,2 olan örneklerin fermentasyon sonrası pH değerleri sırasıyla 7,0 ve 4,7'ye yükselmiştir [156].

Tablo 4.15 incelendiğinde, bütün örneklerin pH değerlerinde depolama boyunca oldukça sınırlı azalışlar varmış gibi görünse de bu azalışların istatistiksel olarak önemli ($P<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Kontrol örneklerinin pH değerlerinde depolama boyunca herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin depolamanın başlangıcında tespit edilen titrasyon asitliği değerleri, laktik asit cinsinden (% LA) Tablo 4.16'da verilmiştir.

Tablo 4.16 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin laktik asit cinsinden titrasyon asitlik değerleri

Örnek	% asitlik (LA)
VN9-Kontrol	$1,39\pm0,02^{a}$
VN12-Kontrol	$1,38\pm0,01^{a}$
VN9-SH10	$1,28\pm0,01^{b}$
VN12-SH5	$1,26\pm0,03^{b}$
VN12-SH14	$1,27\pm0,02^{b}$
VN9-Miks	$1,27\pm0,01^{b}$

Aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Genel olarak meyve bazlı ürünlerde %asitlik değerleri meyvelerdeki malik asit veya sitrik asit gibi en baskın organik asit cinsinden verilmektedir. Ancak bu çalışmada örnekler laktik asit fermentasyonuna tabi tutulduğu için örneklerin titrasyon asitliği değerleri laktik asit cinsinden verilmiştir. Tablo 4.16'ya göre, fermentasyon sonrası laktofermente ürünlerin % asitlik değerlerinde kontrol örneklere kıyasla önemli düzeyde ($P<0,05$) azalma görülmüştür. Bu veriler, pH değerlerinin artış göstermesi ile uyum içerisindedir ve sonuçlar birbirini destekler niteliktedir. Mousavi vd. [155] tarafından gerçekleştirilen benzer bir çalışmada, nar suyu çeşitli laktik asit bakterileri ile fermente edilmiş ve fermentasyon sonrası pH değerinde artış görülürken, % asitlik değerinde ise azalış görülmüştür. Bu durum, fermentasyon süresi boyunca laktik asit bakterileri tarafından sitrik asidin hızla tüketilmesi ve bu esnada laktik asit üretilmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu fenomen, nar suyundaki şeker içeriğinin çok düşük olması ve bunun aksine, önemli miktarda organik asit, yani sitrik asit bulunması nedeniyle suşların ana karbon kaynağı olarak sitrik asidi metabolize etmesi şeklinde yorumlanmıştır. Bununla birlikte, üretilen laktik asit konsantrasyonu, sitrik asit konsantrasyonunda gözlemlenen azalmayı karşılayacak kadar yüksek olmamış ve sonuç olarak, toplam asitlik azalmıştır [155].

4.4.3 Kuru Madde

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında kuru maddelerinde görülen değişimler Tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.17'de görüldüğü gibi, depolamanın başlangıcında örneklerin kuru madde değerleri %28,65 ile %30,75 arasında değişmiştir. Fermentasyon sonrası bütün laktofermente örneklerin kuru madde değerlerinde azalma olurken, en fazla azalma VN9-SH10 ve VN12-SH14 örneklerinde görülmüştür. Ayrıca, depolama boyunca tüm örneklerin kuru madde değerlerinde başlangıca kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede ($P<0,05$) azalma olduğu tespit edilmiştir. Vişne bazlı içeceklerin kuru maddelerinde depolama boyunca meydana gelen değişim, briks değerlerindeki değişim ile büyük ölçüde ilişkili bulunmuştur.

Tablo 4.17 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin kuru madde değerlerinin depolama boyunca değişimi

Örnek türü	Depolama (gün)				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
VN9-Kontrol	29,84±0,06^{Aab}	29,81±0,15^{Aa}	29,90±0,06^{Aa}	29,86±0,21^{Aa}	29,81±0,11^{Aa}
VN12-Kontrol	30,75±0,05^{Aa}	30,04±0,24^{Ba}	29,92±0,34^{Ba}	29,90±0,34^{Ba}	29,92±0,04^{Ba}
VN9-SH10	27,84±0,18^{Ac}	27,62±0,28^{Ac}	27,69±0,28^{Ac}	27,65±0,15^{Ac}	27,65±0,15^{Ac}
VN12-SH5	28,65±0,04^{Ac}	28,10±0,04^{Bc}	28,08±0,04^{Bc}	28,08±0,06^{Bc}	28,06±0,20^{Bc}
VN12-SH14	28,88±0,63^{Abc}	28,81±0,12^{Ab}	28,76±0,12^{Ab}	28,73±0,05^{Ab}	28,69±0,11^{Ab}
VN9-Miks	29,91±0,72^{Aab}	29,77±0,15^{Aa}	29,65±0,23^{Aa}	29,61±0,12^{Aa}	29,59±0,32^{Aa}

Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Benzer bir çalışmada, şeker kamışından alkolik laktofermente içecekler üretilmiş ve fermentasyon sonrası kuru madde içeriğinde azalma olduğu gözlenmiştir [157]. Yeğin ve Üren [158] tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise, geleneksel bir laktofermente içecek olan farklı boza örneklerinde fermentasyon sırasında biyojenik amin oluşumu araştırılmış ve kuru madde içeriği ile herhangi bir korelasyon tespit edilememiştir. Başka bir çalışmada, tropik bir Afrika bitkisi olan rafya *Lactobacillus fermentum* ve *Bifidobacterium bifidum* probiyotik kültürleri ile fermente edilerek laktofermente içecek üretilmiş ve fermentasyon ile kuru madde içeriğinin farklı oranlarda değiştiği tespit edilmiştir [159].

4.4.4 Renk

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında renk değerlerinde meydana gelen değişim ve toplam renk farklılıkları Tablo 4.18'de görülmektedir.

Tablo 4.18 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin renk değerlerinin depolama boyunca değişimi

Örnek türü	*L**				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
VN9-Kontrol	15,24±0,05^{Ad}	15,15±0,22^{Ac}	15,18±1,05^{Aa}	14,97±0,34^{Ab}	15,08±0,49^{Ac}
VN12-Kontrol	15,56±0,10^{Acb}	15,20±0,31^{Ac}	15,24±0,24^{Aa}	15,12±0,12^{Ab}	15,78±0,35^{Abac}
VN9-SH10	16,66±0,15^{Aa}	16,57±0,65^{Aa}	16,57±0,35^{Aa}	16,49±0,37^{Aa}	16,49±0,08^{Aa}
VN12-SH5	15,43±0,34^{Ad}	15,41±0,37^{Ac}	15,45±0,20^{Aa}	15,45±0,60^{Aba}	15,47±0,14^{Abc}
VN12-SH14	15,98±0,12^{Ab}	15,95±0,13^{Aba}	15,91±0,21^{Aa}	15,86±0,20^{Aba}	15,83±0,10^{Aba}
VN9-Miks	15,24±0,25^{Ade}	15,23±0,21^{Ac}	15,25±0,62^{Aa}	15,31±0,46^{Ab}	15,30±0,21^{Abc}
	*a**				
VN9-Kontrol	13,00±0,22^{Ad}	12,94±0,35^{Ad}	13,02±0,14^{Ad}	13,00±0,54^{Ad}	13,00±0,18^{Ad}
VN12-Kontrol	12,86±0,10^{Ad}	12,80±0,25^{Ad}	12,95±0,04^{Ad}	12,86±0,42^{Ad}	12,89±0,15^{Ad}
VN9-SH10	18,15±0,24^{Aa}	18,21±0,03^{Aa}	18,20±0,04^{Aa}	18,10±0,22^{Aa}	18,02±0,15^{Aa}
VN12-SH5	18,20±0,02^{Aa}	18,20±0,34^{Aa}	18,15±0,08^{Aa}	18,06±0,13^{Aa}	18,11±0,20^{Aa}
VN12-SH14	14,23±0,31^{Ac}	14,11±0,18^{Ac}	14,05±0,12^{Ac}	14,00±0,20^{Ac}	14,11±0,22^{Ac}
VN9-Miks	15,62±0,10^{Ab}	15,63±0,03^{Ab}	15,59±0,17^{Ab}	15,60±0,15^{Ab}	15,49±0,10^{Ab}
	*b**				
VN9-Kontrol	-5,78±0,10^{Ac}	-5,67±0,48^{Ac}	-5,71±0,41^{Ac}	-5,74±0,38^{Ac}	-5,69±0,15^{Ac}
VN12-Kontrol	-5,65±0,21^{Ac}	-5,50±0,11^{Ac}	-5,65±0,21^{Ac}	-5,50±0,35^{Ac}	-5,60±0,20^{Ac}
VN9-SH10	-3,24±0,12^{Aa}	-3,31±0,28^{Aa}	-3,29±0,14^{Aa}	-3,31±0,12^{Aa}	-3,28±0,09^{Aa}
VN12-SH5	-3,05±0,30^{Aa}	-3,14±0,11^{Aa}	-3,09±0,27^{Aa}	-3,12±0,10^{Aa}	-3,10±0,17^{Aa}
VN12-SH14	-4,33±0,14^{Ab}	-4,25±0,25^{Ab}	-4,21±0,25^{Ab}	-4,20±0,20^{Ab}	-4,22±0,32^{Ab}
VN9-Miks	-4,20±0,10^{Ab}	-4,17±0,34^{Ab}	-4,18±0,14^{Ab}	-4,18±0,34^{Ab}	-4,19±0,48^{Ab}
	ΔE				
VN9-SH10	17,50	17,66	17,31	17,11	16,51
VN12-SH5	17,27	17,07	16,63	16,36	16,50
VN12-SH14	1,89	1,91	1,87	1,77	1,69
VN9-Miks	4,69	4,74	4,47	4,66	4,25

Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Tablo 4.18'de verildiği gibi, genel olarak fermentasyon sonrası örneklerin renk parametrelerinde istatistiksel açıdan önemli ($P<0,05$) değişimler tespit edilmiştir. Fermentasyon ile *L, a* ve *b* değerlerinde artışlar olmuştur. Depolama başlangıcında

en yüksek *L, a* ve *b* değerleri VN9-SH10 örneğinde belirlenmiştir. Diğer yandan, depolama boyunca örneklerin renk parametrelerinde önemli (P>0,05) değişimler gözlenmemiştir. ΔE değerlerine bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla VN9-SH10 ve VN12-SH5 örnekleri daha yüksek renk farklılığı gösterirken, VN12-SH14 ve VN9-Miks örneklerinin renk farklılıkları daha düşük bulunmuştur. ΔE değerleri, depolama boyunca her bir örnek için önemli düzeyde değişim (P>0,05) göstermemiştir. Benzer bir çalışmada, karadut suyu laktobasil türü starter kültürle fermente edilmiş ve fermente örneklerin kontrol örneğe kıyasla *L** ve *b** değerlerinde azalma, a* değerinde ise artma olduğu belirlenmiştir. Bu durum, fermentasyon ile monomerik antosiyanin konsantrasyonunun artması ile ilişkilendirilmiştir [160]. Pereira vd. [72] tarafından yürütelen başka bir çalışmada ise, farklı başlangıç pH değerlerine ayarlanmış kaju elması suları LAB kültürü ile fermente edilmiş ve fermentasyon sonrası *L** ve *a** değerlerinde azalma gözlenirken *b** değerlerinde artma olduğu tespit edilmiştir.

4.4.5 Bulanıklık

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında bulanıklık değerlerinde meydana gelen değişim Tablo 4.19'da görülmektedir.

Tablo 4.19 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin bulanıklık değerlerinin depolama boyunca değişimi

Örnek türü	Bulanıklık				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
VN9-Kontrol	$0,638\pm0,001^{Bab}$	$0,653\pm0,004^{Bd}$	$0,694\pm0,006^{Aa}$	$0,701\pm0,020^{Ab}$	$0,711\pm0,002^{Ac}$
VN12-Kontrol	$0,645\pm0,010^{Cab}$	$0,676\pm0,003^{Bc}$	$0,764\pm0,011^{Aa}$	$0,779\pm0,004^{Aa}$	$0,777\pm0,010^{Aa}$
VN9-SH10	$0,678\pm0,042^{Ca}$	$0,716\pm0,011^{BCa}$	$0,762\pm0,004^{Aa}$	$0,773\pm0,005^{Aa}$	$0,682\pm0,005^{Cd}$
VN12-SH5	$0,643\pm0,005^{Eab}$	$0,683\pm0,000^{Dc}$	$0,714\pm0,004^{Cb}$	$0,730\pm0,011^{Bab}$	$0,754\pm0,001^{Ab}$
VN12-SH14	$0,656\pm0,004^{Bab}$	$0,697\pm0,000^{ABb}$	$0,724\pm0,025^{Aab}$	$0,731\pm0,042^{Aab}$	$0,755\pm0,000^{Ab}$
VN9-Miks	$0,614\pm0,016^{Db}$	$0,645\pm0,001^{Cd}$	$0,699\pm0,010^{Bb}$	$0,716\pm0,016^{ABb}$	$0,744\pm0,014^{Ab}$

Örnekler 1:10 oranında seyreltilmiştir; Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark (P<0,05) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Tablo 4.19'da görüldüğü gibi, fermentasyon sonrası laktofermente örneklerde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde değişimler ($P<0,05$) meydana gelmiştir. VN9-Miks ve VN9-SH10 örnekleri sırasıyla en düşük ve en yüksek ($P<0,05$) bulanıklık değerlerine sahip olan örnekler olmuştur. Depolama boyunca bütün örneklerin bulanıklık değerlerinde önemli düzeyde artışlar olduğu ($P<0,05$) tespit edilmiştir. Vişne suyu, berrak meyve suyu proses hattı kategorisinde bir ürün olduğu için, bulanıklık bu tarz ürünler için olumsuz bir durumdur. Benzer şekilde, Navruz vd. [161] tarafından yapılmış olan bir çalışmada, gallik asit ve çeşitli bitki ekstraktları ile zenginleştirilmiş vişne suyu konsantreleri farklı sıcaklık değerlerinde depolanmış ve depolama boyunca bulanıklık değerlerinin tamamında artış gözlenmiştir. Benzer bir trend, Ertan vd. [162] tarafından vişne suları üzerinde yapılmış başka bir çalışmada da elde edilmiştir.

4.4.6 Biyoaktif Özellikler

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında biyoaktif özelliklerinde görülen değişimler Tablo 4.20'de verilmiştir.

Tablo 4.20'de görüldüğü gibi, depolama başlangıcında laktofermente örneklerdeki fenolik madde içeriğinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum, fermentasyon esnasında fenolik bileşiklerin dekompozisyona uğradığının bir göstergesidir. Bununla birlikte, depolama boyunca bütün örneklerin fenolik madde içeriğinde zamana bağlı olarak azalma gözlenmiştir. Diğer yandan, antioksidan kapasitenin göstergesi olan CUPRAC (antioksidan kapasite) ve DPPH (antiradikal aktivite) analiz sonuçlarına göre, laktofermente örneklerin antioksidan kapasitesinin kontrol örneğine kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, fermentasyon prosesinin ürünün antioksidan kapasitesini artırdığının bir göstergesidir. Depolama süresi boyunca laktofermente örneklerin antioksidan kapasite değerleri kontrol örneklerinden daha yüksek kalmıştır.

Tablo 4.20 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin biyoaktif özelliklerinin depolama boyunca değişimi

Örnek türü	Toplam fenolik madde (mg GAE /100 mL)				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
VN9-Kontrol	353,48±5,42^{Aa}	312,58±3,52^{Ba}	305,90±1,73^{Ba}	286,37±6,96^{Ca}	266,00±2,93^{Da}
VN12-Kontrol	353,67±4,24^{Aa}	315,71±3,66^{Ba}	302,50±5,98^{BCa}	291,54±3,99^{Ca}	264,06±7,21^{Da}
VN9-SH10	295,72±7,26^{Abc}	274,35±2,00^{Bb}	253,31±2,79^{Cb}	232,61±1,04^{Dbc}	224,10±2,02^{Db}
VN12-SH5	288,37±3,98^{Ac}	259,66±2,52^{Bc}	236,95±1,90^{Cc}	222,43±3,02^{Dc}	214,75±3,28^{Db}
VN12-SH14	301,56±2,26^{Ab}	275,68±0,29^{Bb}	256,15±2,02^{Cb}	238,62±4,65^{Db}	221,43±3,33^{Eb}
VN9-Miks	293,255±3,48^{Abc}	277,81±4,21^{Bb}	261,35±1,44^{Cb}	229,24±6,63^{Dbc}	217,31±2,98^{Eb}
	DPPH yakalama aktivitesi (mg TE/100 mL)				
VN9-Kontrol	252,71±0,72^{Ad}	251,36±0,14^{Ad}	248,22±0,11^{ABd}	244,59±3,97^{Bc}	223,46±0,32^{Cd}
VN12-Kontrol	251,64±0,58^{Ad}	251,78±0,26^{Ac}	249,35±0,23^{Bc}	242,84±1,46^{Cc}	229,55±0,78^{Dcd}
VN9-SH10	273,69±0,52^{Aa}	270,80±0,07^{Aa}	269,51±0,14^{Aa}	267,65±0,11^{Aa}	240,24±7,18^{Bb}
VN12-SH5	263,98±0,04^{Ab}	260,80±0,07^{ABb}	259,32±0,04^{ABb}	257,95±0,04^{Bb}	238,99±4,25^{Cbc}
VN12-SH14	274,02±0,11^{Aa}	270,90±0,11^{Ba}	269,40±0,11^{Ca}	267,63±0,18^{Da}	250,02±0,62^{Ea}
VN9-Miks	257,53±1,08^{Ac}	245,77±0,14^{Be}	231,60±0,27^{Ce}	229,86±1,65^{Cd}	213,54±0,77^{De}

Tablo 4.20 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin biyoaktif özelliklerinin depolama boyunca değişimi (devamı)

Örnek türü					
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
	CUPRAC (mg TE/100 mL)				
VN9-Kontrol	994,47±9,26^{Ad}	982,80±10,10^{Aa}	962,97±33,76^{ABd}	946,63±11,25^{ABc}	924,46±12,62^{Bc}
VN12-Kontrol	996,31±4,42^{Ad}	985,70±7,90^{ABc}	959,56±12,45^{BCd}	947,77±5,60^{CDc}	931,00±15,25^{Dc}
VN9-SH10	1232,50±33,39^{Ab}	1216,16±52,66^{Aa}	1172,99±3,50^{ABb}	1132,15±16,54^{Bb}	1109,98±12,13^{Bb}
VN12-SH5	1108,82±12,29^{Ac}	1090,15±4,04^{Ab}	1084,31±38,56^{Ac}	1081,98±37,04^{Ab}	1069,14±17,62^{Ab}
VN12-SH14	1576,71±68,71^{Aa}	1262,83±35,93^{Ba}	1258,17±35,06^{Ba}	1257,00±24,50^{Ba}	1243,48±18,19^{Ba}
VN9-Miks	1078,42±34,81^{Acd}	1053,09±27,45^{ABbc}	998,63±15,71^{BCd}	965,05±36,17^{Cc}	936,34±26,11^{Cc}

Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Fermente meyve bazlı içeceklerin antioksidan ve antiradikal aktiviteleri, bazı durumlarda farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılıklar, muhtemelen fermentasyonda fitokimyasal bileşenlerinde meydana gelen değişimlerden kaynaklanmaktadır. Probiyotik bakterilerin faaliyeti ile makromoleküler fenolik bileşenlerin depolimerizasyona uğradığı veya daha spesifik fenollere dönüştürüldüğü söylenebilir [163]. Örneğin, Sina vd. [164] tarafından yapılan çalışmada, *Morinda citrifolia* meyvesi ile hazırlanan taze ve fermente edilmiş meyve sularının antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmış, taze meyve suyunun DPPH radikaline ait IC50 değeri daha düşük bulunmuştur. Yine benzer şekilde başka bir çalışmada, kış kavunu ve ananastan elde edilen meyve suyu *L. plantarum, L. salivarus* ve *Saccharomyces boilardii*'nin farklı miktarlardaki starter kombinasyonları ile fermente edilmiş ve elde edilen içeceklerin DPPH ve FRAP antioksidan kapasite sonuççlarında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir [165]. Fenolik bileşenlerinin çoğu benzer iskelet veya yapısal özelliklere sahip olmasına rağmen, hidroksil gruplarının sayısı ve konumu biyolojik ve fonksiyonel özelliklerde anahtar rol oynamaktadır [166]. İndirgeyici ajanlar, serbest radikal süpürücüler ve singlet oksijen söndürücüler olarak nitelendirilen fenolik bileşiklerin, esas olarak hidrojen atomu transferi veya serbest radikallere elektron aktarımı yolu ile dikkate değer antioksidan aktiviteye sahip oldukları pek çok çalışma ile doğrulanmıştır [167]. Antioksidan aktivitesindeki artış, LAB fermantasyonunun proton verici özelliklere sahip polifenol bileşiklerinin aktivitesini geliştirebileceğini göstermiştir [168]. Benzer bir çalışmada, elma suyu çeşitli laktik asit bakteri suşları ile fermente edilmiş ve fermentasyon sonrası toplam fenolik içeriğinin azalırken, antioksidan kapasitesinin arttığı belirtilmiştir [163].

4.4.7 Fenolik Bileşikler

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında fenolik profillerinde meydana gelen değişim Tablo 4.21'de görülmektedir.

Tablo 4.21 Laktofermente vişne bazlı içeceklerin depolama başlangıcındaki (0. gün) ve sonundaki (28. gün) fenolik profili

Fenolik madde	Fenolik konsantrasyonu (ppm)					
	0. Gün					
	VN9-Kontrol	VN12-Kontrol	VN9-SH10	VN12-SH5	VN12-SH14	VN9-Miks
Fenolik asitler						
Gallik asit	2,68	2,66	2,69	2,79	2,65	2,67
Protokateşik asit	1,09	1,09	1,45	1,35	1,59	1,07
4- hidroksibenzoik asit	2,05	2,11	2,55	2,35	2,46	2,16
Sirinjik asit	0,57	0,56	0,55	0,48	0,42	0,48
Elajik asit	1,77	1,77	1,86	1,79	1,76	1,75
Kafeik asit	2,00	2,00	2,42	2,45	2,17	2,11
p-kumarik asit	0,43	0,43	0,43	0,42	0,43	0,43
Ferulik asit	0,26	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00
Klorojenik asit	10,82	10,82	10,93	10,36	11,05	10,87
Flavonoidler						
Kateşin	31,36	31,36	32,86	31,36	32,90	31,05
Mirisetin	6,89	6,90	5,32	5,05	5,33	5,85
Kuersetin	1,40	1,41	0,00	1,36	0,00	1,08
Kamferol	1,13	1,13	0,65	0,64	0,93	0,98
Rutin	1,10	1,11	1,75	0,86	0,74	1,26
TOPLAM	**63,55**	**63,60**	**63,46**	**61,25**	**62,42**	**61,77**

Tablo 4.21 (devamı) Laktofermente vişne bazlı içeceklerin depolama başlangıcındaki (0. gün) ve sonundaki (28. gün) fenolik profili

Fenolik madde	Fenolik konsantrasyonu (ppm)					
	28. Gün					
	VN9-Kontrol	VN12-Kontrol	VN9-SH10	VN12-SH5	VN12-SH14	VN9-Miks
Fenolik asitler						
Gallik asit	2,44	2,01	2,34	2,49	2.47	1,98
Protokateşik asit	0,94	1,13	1,16	1,17	1.49	0,93
4- hidroksibenzoik asit	1,87	2,08	1,36	2,09	2.27	2,04
Sirinjik asit	0,48	0,37	0,18	0,30	0.31	0,32
Elajik asit	1,53	1,63	1,69	1,64	1.36	1,59
Kafeik asit	1,65	1,79	2,27	2,17	1,94	1,96
p-kumarik asit	0,27	0,30	0,26	0,32	0,30	0,27
Ferulik asit	0,11	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00
Klorojenik asit	9,52	9,32	8,35	8,78	10,06	9,46
Flavonoidler						
Kateşin	29,59	29,33	31,20	29,68	30.77	29,86
Mirisetin	6,77	5,58	5,03	4,59	3,88	4,79
Kuersetin	1,45	1,28	0,00	1,19	0,00	0,88
Kamferol	0,92	1,11	0,42	0,54	0,58	0,79
Rutin	0,99	0,92	1,44	0,66	0,56	1,01
TOPLAM	**58,52**	**57,08**	**55,69**	**55,60**	**55,98**	**55,84**

Tablo 4.21'de verildiği gibi, fermentasyon sonrası laktofermente örneklerde kontrol grubuna kıyasla önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, depolama boyunca bütün örneklerin toplam fenolik profilinde azalma meydana gelmiştir. Bütün örneklerde en fazla bulunan majör bileşenin kateşin olduğu belirlenmiştir. Kateşini sırasıyla klorojenik asit ve mirisetin takip etmiştir.

Diğer yandan, laktofermente örneklerin fenolik madde profili depolamanın başlangıcında ve sonunda kontrol grubunun fenolik profiline göre hep düşük kalmıştır. Bu bulgular, Tablo 4.20'deki toplam fenolik madde tayini sonuçları ile de uyum içerisindedir. Meyve sularının fenolik kompozisyonları; hammaddenin türü, olgunluğu, iklim koşulları ve coğrafi koşullar gibi faktörlerle birlikte, ısıl işlem, fermentasyon, depolama koşulları ve kullanılan katkı maddeleri gibi proses faktörlerine bağlı olarak da değişiklik göstermektedir [169]. Örneğin bir çalışmada, geleneksel fermente bir içecek olan hardaliye örnekleri 0, 4 veya 20 °C'de 60 gün boyunca depolanmış ve gallik asit, rezveratrol, absisik asit ve trans-p-kumarik asit gibi fenolik bileşenlerinin miktarı depolama sıcaklığına bağlı olarak artış göstermiştir [170]. Li vd. [171] tarafından yapılmış olan çalışmada, çeşitli LAB kültürleri ile fermente edilmiş yabanmersini sularında 48 saatlik fermentasyon sonucunda rutin, mirisetin ve gallik asit içeriklerinde sırasıyla %136, %71% ve %38'lik artış gerçekleştiği, p-hidroksibenzoik asit ve kafeik asit çeriklerinde de ise azalma olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Hu vd. [172], havuç suyunun *L. rhamnosus* GG fermentasyonu ile elde ettikleri laktofermente içeceklerde serbest kuersetin, gallik asit, kateşinik asit, klorojenik asit ve kaemferol gibi fenolik maddelerin miktarlarında artışların olduğunu belirtmişlerdir.

4.4.8 Toplam Kalori Değeri

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında kalori değerlerinde meydana gelen değişim Tablo 4.22'de görülmektedir.

Tablo 4.22 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin toplam kalori değerlerinin depolama boyunca değişimi

Örnek türü	Kalori (kcal/100 mL)				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
VN9-Kontrol	59,50±0,45^{Ab}	59,50±0,45^{Ab}	59,45±0,40^{Ab}	59,40±0,40^{Ab}	59,40±0,27^{Ab}
VN12-Kontrol	72,00±0,64^{Aa}	72,00±0,65^{Aa}	72,02±0,45^{Aa}	72,02±0,33^{Aa}	72,03±0,32^{Aa}
VN9-SH10	32,00±0,67^{Ae}	31,98±0,68^{Ae}	31,90±0,58^{Ae}	31,85±0,58^{Af}	31,80±0,73^{Af}
VN12-SH5	44,20±0,50^{Ac}	44,15±0,48^{Ac}	44,08±0,45^{Ac}	43,93±0,50^{Ad}	43,90±0,55^{Ad}
VN12-SH14	40,50±0,65^{Ad}	40,43±0,58^{Ad}	40,33±0,61^{Ad}	40,20±0,56^{Ae}	40,10±0,34^{Ae}
VN9-Miks	45,46±0,41^{Ac}	45,38±0,38^{Ac}	45,35±0,37^{Ac}	45,32±0,37^{Ac}	45,32±0,36^{Ac}

Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Depolamanın başlangıcında, örneklerin kalori değerleri 32,00 ile 72,00 kcal/100 mL arasında değişmekte olup örnekler arasında istatistiksel olarak önemli ($P<0,05$) farklılıklar belirlenmiştir. Fermentasyon sonrasında kontrol grubuna kıyasla laktofermente örneklerin kalori değerlerinde önemli azalmalar ($P<0,05$) meydana gelmiştir. VN9-SH10 örneği, başlangıç şeker oranının daha düşük olması ve satarter kültür faaliyetinin daha yüksek olması nedeni ile en düşük kalori değerine sahip olmuştur. Diğer yandan, depolama boyunca hiçbir örneğin kalori değerinde önemli ($P>0,05$) değişimler meydana gelmemiştir. Bu durum, depolama esnasında bakteriyel faaliyetin sınırlı olduğunu da göstermektedir. Vişne suyu gibi berrak meyve suyu içeceklerde diyet lif, yağ, protein gibi besin içeriklerinin çok kısıtlı olması nedeni ile, fermentasyon esnasında starter kültürler karbon kaynağı ihtiyaçlarını büyük ölçüde şekerlerden karşılamaktadır. Bunun sonucunda da kalori değerlerinde düşüşler meydana gelmektedir. Nitekim, Xu vd. [173] tarafından yapılan çalışmada, havuç suyu *L. gasseri* izolatı ile fermente edilmiş ve fermentasyon sonrası meydana gelen kalori düşüşü LAB'nin fermentasyon sırasındaki aktiviteleri ile ilişkilendirilmiştir. Hu vd. [172]

tarafından yapılan başka bir benzer çalışmada, diyabetik ratlar *L. rhamnosus* GG ile fermente edilmiş havuç suyu ile beslenmiş ve bu ratların kan glukoz seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla neredeyse yarı yarıya azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, fermentasyon ile havuç suyunun basit şeker içeriğinin ve dolayısı ile kalori içeriğinin azalması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, Johnson vd. [174] gerçekleştirdikleri çalışmada, laktofermente yabanmersini suyunun diyete ilave edilmesinin farelerde obezite ve hiperglisemiyi azalttığına dair bulgular rapor edilmiştir.

4.4.9 Fruktoz ve Sakkaroz İçeriği

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında şeker içeriklerinde meydana gelen değişim Tablo 4.23'de görülmektedir.

Tablo 4.23 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin fruktoz ve sakkaroz içeriklerinin depolama boyunca değişimi

Örnek türü	Fruktoz konsantrasyonu (g/100 mL)				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
VN9-Kontrol	1,64±0,07^{Aa}	1,64±0,07^{Aa}	1,65±0,10^{Aa}	1,65±0,11^{Aa}	1,65±0,11^{Aa}
VN12-Kontrol	1,65±0,05^{Aa}	1,65±0,05^{Aa}	1,65±0,05^{Aa}	1,65±0,05^{Aa}	1,65±0,05^{Aa}
VN9-SH10	1,09±0,04^{Ab}	1,09±0,05^{Ab}	1,09±0,05^{Ab}	1,09±0,05^{Ab}	1,09±0,03^{Ab}
VN12-SH5	1,11±0,03^{Ab}	1,11±0,03^{Ab}	1,11±0,03^{Ab}	1,11±0,03^{Ab}	1,11±0,02^{Ab}
VN12-SH14	1,11±0,01^{Ab}	1,11±0,01^{Ab}	1,12±0,01^{Ab}	1,11±0,01^{Ab}	1,11±0,01^{Ab}
VN9-Miks	1,14±0,06^{Ab}	1,14±0,05^{Ab}	1,14±0,06^{Ab}	1,14±0,05^{Ab}	1,14±0,05^{Ab}
	Sakkaroz konsantrasyonu (g/100 mL)				
VN9-Kontrol	10,31±0,04^{Ab}	10,31±0,05^{Ab}	10,30±0,05^{Ab}	10,31±0,03^{Ab}	10,31±0,04^{Ab}
VN12-Kontrol	13,17±0,04^{Aa}	13,16±0,02^{Aa}	13,17±0,02^{Aa}	13,17±0,02^{Aa}	13,17±0,08^{Aa}
VN9-SH10	5,14±0,26^{Ae}	5,14±0,28^{Ae}	5,14±0,18^{Ae}	5,13±0,19^{Ae}	5,12±0,18^{Ae}
VN12-SH5	8,08±0,20^{Ad}	8,05±0,18^{Ad}	8,00±0,15^{Ad}	7,94±0,14^{Ad}	7,94±0,08^{Ad}
VN12-SH14	7,67±0,20^{Ad}	7,66±0,22^{Ad}	7,65±0,22^{Ad}	7,64±0,21^{Ad}	7,63±0,21^{Ad}
VN9-Miks	8,86±0,16^{Ac}	8,84±0,16^{Ac}	8,84±0,19^{Ac}	8,83±0,16^{Ac}	8,82±0,16^{Ac}

Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Tablo 4.23'te görüldüğü gibi, laktofermente örnekler ve kontrol grubunda sakkaroz miktarı fruktoza göre daha yüksektir. Fermentasyon sonrası hem fruktoz hem de sakkaroz içeriğinde önemli ($P<0,05$) düzeyde azalmalar gözlenmiştir. Laktofermente örnekler arasında en düşük fruktoz ve sakkaroz içeriğine sahip olan örnek VN9-SH10 olmuştur. Bununla birlikte, depolama boyunca örneklerin fruktoz ve sakkaroz içeriğinde önemli değişmeler ($P>0,05$) olmamıştır. Laktofermente örneklerin şeker içeriğinin azalması, fermentasyon esnasında starter kültürlerin karbon kaynağı olarak şekerleri kullanması ve metabolik faaliyetleri ile ilişkilidir. Xu vd. [173] tarafından yapılan çalışmada, 2 farklı *L. gasseri* suşu ile fermente edilen havuç sularının şeker düzeylerinin %27'ye varan oranlarda azaldığı tespit edilmiş, bakteriler tarafından en fazla metabolize edilen şekerlerin sırasıyla sakkaroz, glukoz ve fruktoz olduğu belirlenmiştir. Benzer bulgular, Hu vd. [172] tarafından da rapor edilmiştir.

4.4.10 Toplam LAB Sayısı

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında toplam LAB sayılarında meydana gelen değişim Tablo 4.24'te görülmektedir.

Tablo 4.24 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin LAB sayılarının depolama boyunca değişimi

Örnek türü	LAB sayısı (log kob/mL)				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
VN9-SH10	$9,94\pm0,14^{Aa}$	$9,32\pm0,13^{Ba}$	$8,44\pm0,14^{Cab}$	$7,43\pm0,07^{Db}$	$6,27\pm0,06^{Eb}$
VN12-SH5	$9,85\pm0,18^{Aa}$	$9,35\pm0,40^{Aa}$	$8,32\pm0,12^{Bab}$	$7,36\pm0,05^{Cb}$	$5,99\pm0,03^{Dc}$
VN12-SH14	$9,97\pm0,07^{Aa}$	$9,42\pm0,34^{Ba}$	$8,47\pm0,11^{Ca}$	$7,65\pm0,02^{Da}$	$6,46\pm0,04^{Ea}$
VN9-Miks	$9,82\pm0,11^{Aa}$	$9,21\pm0,45^{Aa}$	$8,04\pm0,26^{Bb}$	$7,01\pm0,10^{Cc}$	$5,87\pm0,09^{Dc}$

Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Fermentasyon sonrası laktofermente örneklerdeki LAB sayıları 9,82-9,97 log kob/mL düzeyinde olup örneklerin LAB sayıları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilememiştir ($P>0,05$). Bununla birlikte, depolama süresince bütün örneklerde LAB sayısı azalma trendi göstermiştir. Her ne kadar depolama sonunda LAB sayısı 10^6 kob/mL'nin üzerinde kalmış olsa da probiyotik özellik açısından değerlendirildiğinde, örneklerin sınırda kaldığı söylenebilir. Benzer bir çalışmada, doğal vişne suyu ve maya ekstraktı eklenmiş vişne suyu çeşitli laktobasil kültürleri ile 24 saat süreyle fermente edilmiş ve fermentasyon sonrası LAB sayısı incelenmiştir. Doğal vişne suyunda fermentasyon sonrası LAB sayısında önemli ölçüde azalma ($P<0,05$) görülürken, maya ekstraktı eklenmiş ve pH değeri 5-6 aralığında ayarlanmış vişne suyu örneklerinde fermentasyon sonrası LAB sayısı 7 log kob/mL den 9 log kob/mL'ye kadar ulaşmıştır [175].

4.4.11 Antimikrobiyal Aktivite

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında antimikrobiyal aktiviteleri Tablo 4.25'te görülmektedir.

Tablo 4.25 Probiyotik vişne bazlı içeceklerin B. cereus'a karşı antibakteriyel aktivitelerinin depolama boyunca değişimi (mm)

Örnekler	İnhibisyon zonu (mm)				
	0.gün	7.gün	14.gün	21.gün	28.gün
Kontrol	12,00±0,00	-	-	-	-
Kontrol-Ph 5	7,50±0,58	-	-	-	-
VN9-Miks	11,50±0,58	-	9,00±0,00	8,00±1,15	-

Laktofermente örneklerin *Staphylococcus aureus* ATCC 29213*, Escherichia coli* O157:H7 ATCC 25150*, Bacillus cereus* ATCC 11778 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Ancak Tablo 4.25'te verildiği gibi, V9-miks ve kontrol örneği *Bacillus cereus* ATCC 11778 üzerinde antibakteriyel aktivite gösterirken, diğer örneklerde hiçbir etki görülmemiştir. Literatür incelendiğinde meyve bazlı içeceklerin antimikrobiyal etkilerinin oldukça değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Örneğin, Sina vd. [164]

tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, piyasadan temin edilmiş taze ve fermente Morinda citrifolia meyve sularının *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, S. epidermidis, Proteus vulgaris, Streptococcus oralis, Enterococcus faecalis* and *E. coli* üzerinde değişen seviyelerde antibakteriyel etkiye sahip oldukları bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, *Bacillus amyloliquefaciens* and *L. brevis* ve *Starmerella bombicola* ile fermente edilen yabanmersini sularından elde edilen ekstraktların deri patojenlerine (*Brevibacterium linens, Propionibacterium acnes, Bacillus cereus* ve *Staphylococcus epidermidis*) karşı oldukça yüksek düzeyde antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir.

4.4.12 Duyusal Özellikler

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında duyusal özelliklerinde meydana gelen değişim Tablo 4.26'da görülmektedir.

Vişne bazlı laktofermente içeceklerin başlangıç duyusal skorları 5,80 ile 7,60 arasında değişiklik göstermiştir. Diğer yandan, her bir parametre için örnekler arasında istatistiksel olarak bir farklılık tespit edilememiştir ($P>0,05$). Tat parametresi değerleri incelendiğinde, depolama boyunca bütün örneklerin skorlarında azalma olduğu görülse de bu azalmalar istatistiksel olarak önemli ($P>0,05$) bulunmamıştır. Genel olarak, %12 şeker içeren kontrol örneği (VN12-Kontrol) panelistler büyük kısmı tarafından çok tatlı olarak değerlendirilmiş ve bu nedenle ortalama skor diğer örneklere kıyasla daha düşük olmuştur. Bu panelistler fermentasyon ile tatlılık seviyesi azalmış olan laktofermente örneklerin daha dengeli bir tada sahip olduğunu ve daha içilebilir olduğunu ifade etmişlerdir. Ortalama skorlardan da görüldüğü gibi, laktofermente vişne bazlı içecekler, yapı-tekstür ve renk-görünüş parametreleri bakımından kontrol grubuna kıyasla daha yüksek skorlar elde etmişlerdir. Koku parametresi değerlendirildiğinde, VN9-Miks örneğinin depolama ilerledikçe daha düşük skorlar ($P>0,05$) aldığı görülmüştür. Diğer örnekler genel itibariyle koku özelliği açısından kabul edilebilir nitelikte bulunmuştur.

Tablo 4.26 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin duyusal özellikleri

Örnek	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
	Tat				
VN9-Kontrol	6,60±1,14^{Aa}	5,60±1,14^{Aa}	5,60±1,14^{Aa}	5,40±0,55^{Aa}	5,60±0,55^{Aa}
VN12-Kontrol	6,00±0,71^{Aa}	5,40±0,89^{Aa}	5,40±0,55^{Aa}	5,20±0,84^{Aa}	5,20±0,45^{Aa}
VN9-SH10	6,20±0,84^{Aa}	6,40±0,55^{Aa}	6,00±0,70^{Aa}	6,40±1,14^{Aa}	6,20±0,84^{Aa}
VN12-SH5	6,40±1,14^{Aa}	6,20±0,84^{Aa}	6,20±0,84^{Aa}	6,60±0,55^{Aa}	6,00±1,00^{Aa}
VN12-SH14	7,20±0,84^{Aa}	6,80±0,84^{Aa}	6,40±1,52^{Aa}	6,60±1,14^{Aa}	6,20±0,84^{Aa}
VN9-Miks	6,00±0,71^{Aa}	5,80±0,84^{Aa}	5,60±0,55^{Aa}	6,00±1,58^{Aa}	6,00±1,22^{Aa}
	Renk-Görünüş				
VN9-Kontrol	7,40±0,55^{Aa}	7,00±0,71^{Aa}	6,80±0,45^{Aa}	6,80±0,45^{Aa}	7,00±0,71^{Aa}
VN12-Kontrol	7,00±0,71^{Aa}	6,80±0,45^{Aa}	7,40±0,55^{Aa}	7,00±0,71^{Aa}	6,80±0,45^{Aa}
VN9-SH10	7,00±0,71^{Aa}	7,00±1,22^{Aa}	6,80±0,45^{Aa}	6,80±0,84^{Aa}	7,00±1,22^{Aa}
VN12-SH5	7,40±0,55^{Aa}	7,00±0,71^{Aa}	6,80±0,45^{Aa}	6,80±0,45^{Aa}	7,00±0,71^{Aa}
VN12-SH14	7,40±0,55^{Aa}	7,00±1,22^{Aa}	6,60±0,55^{Aa}	6,80±1,10^{Aa}	6,80±0,84^{Aa}
VN9-Miks	7,40±0,55^{Aa}	7,00±0,71^{Aa}	6,60±0,45^{Aa}	6,80±0,45^{Aa}	6,80±1,34^{Aa}
	Yapı-tekstür				
VN9-Kontrol	7,20±0,84^{Aa}	7,40±0,55^{Aa}	7,60±0,55^{Aa}	7,40±0,55^{Aa}	7,20±0,45^{Aa}
VN12-Kontrol	7,40±0,55^{Aa}	7,40±0,55^{Aa}	7,60±0,55^{Aa}	7,40±0,55^{Aa}	7,20±0,45^{Aa}
VN9-SH10	7,40±0,55^{Aa}	7,20±0,45^{Aa}	7,20±1,30^{Aa}	7,20±0,84^{Aa}	7,20±0,45^{Aa}
VN12-SH5	7,40±0,55^{Aa}	7,20±0,84^{Aa}	7,40±0,55^{Aa}	7,20±0,45^{Aa}	7,20±1,30^{Aa}
VN12-SH14	7,20±0,45^{Aa}	7,40±0,55^{Aa}	7,20±0,84^{Aa}	7,00±0,71^{Aa}	7,00±0,00^{Aa}
VN9-Miks	7,40±0,55^{Aa}	7,00±0,89^{Aa}	7,20±0,45^{Aa}	7,00±1,22^{Aa}	7,00±1,22^{Aa}
	Koku				
VN9-Kontrol	7,60±0,55^{Aa}	7,40±0,55^{Aab}	7,20±0,84^{Aa}	7,00±1,22^{Aa}	7,00±1,22^{Aa}
VN12-Kontrol	7,60±0,55^{Aa}	7,60±0,55^{Aa}	7,20±1,30^{Aa}	7,00±1,41^{Aa}	7,00±1,22^{Aa}
VN9-SH10	5,80±1,48^{Aa}	5,80±1,30^{Aab}	6,00±1,00^{Aa}	6,40±1,14^{Aa}	6,00±1,00^{Aab}
VN12-SH5	6,40±1,52^{Aa}	5,80±2,05^{Aab}	6,20±0,84^{Aa}	5,60±1,34^{Aa}	6,20±0,84^{Aab}
VN12-SH14	5,60±1,14^{Aa}	5,80±0,84^{Aab}	6,00±1,00^{Aa}	6,00±0,71^{Aa}	5,80±0,45^{Aab}
VN9-Miks	5,80±0,45^{Aa}	5,20±0,84^{Aa}	5,20±1,48^{Aa}	5,00±0,71^{Aa}	4,60±1,14^{Ab}
	Genel Kabul				
VN9-Kontrol	6,60±1,14^{Aa}	6,40±1,14^{Aa}	6,00±1,00^{Aa}	6,20±1,10^{Aa}	6,20±0,84^{Aa}
VN12-Kontrol	6,60±1,14^{Aa}	6,80±1,30^{Aa}	6,20±0,84^{Aa}	6,40±0,89^{Aa}	6,60±0,55^{Aa}
VN9-SH10	6,80±0,84^{Aa}	6,40±0,55^{Aa}	6,80±0,84^{Aa}	6,40±0,55^{Aa}	6,80±1,30^{Aa}
VN12-SH5	6,60±1,14^{Aa}	7,00±0,00^{Aa}	7,00±1,41^{Aa}	6,80±0,84^{Aa}	6,80±1,10^{Aa}
VN12-SH14	7,40±0,55^{Aa}	7,00±0,71^{Aa}	6,80±1,10^{Aa}	6,60±0,89^{Aa}	7,00±1,22^{Aa}
VN9-Miks	6,60±1,14^{Aa}	7,20±0,84^{Aa}	7,00±0,71^{Aa}	6,60±0,55^{Aa}	6,60±1,14^{Aa}

Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Genel kabul edilebilirlik parametresi açısından, depolama başlangıcından sonuna kadar bütün örnekler ortalama 6 ve üzerinde puan almış ve bu durum tüm örneklerin depolama boyunca kabul edilebilir nitelikte duyusal özelliklere sahip olduklarını göstermiştir. Fermentasyon prosesinde gıdaların besinsel içeriklerinin iyileşmesinin yanında aynı zamanda duyusal özelliklerinin de olumlu şekilde gelişmesi nedeniyle tüketiciler tarafından yüksek beğeni ile tercih edilen gıdaların üretiminde önemli roller oynamaktadır. Bu nedenle, probiyotik veya prebiyotik bileşenlerle zenginleştirilmiş meyve bazlı fonksiyonel içeceklerin üretilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar son yıllarda artan trend göstermiştir. Luckow ve Delahunty [176], taze ve fermente kuş üzümü suları üreterek tüketici testlerine tabi tutmuşlardır. Sonuç olarak, fermente kuş üzümü suyunun duyusal açıdan kabul edilebilirliği, yaş ve cinsiyete bağlı olarak farklılık göstermiştir. Bununla birlikte, laktofermente örneklerin fonksiyonel ve daha sağlıklı olması, panelistlerin tercihlerini etkileyen en önemli kriter olmuştur. Başka bir çalışmada, elma, kivi, ayva, hintinciri, nar ve üzüm suları kefir taneleri ile fermente edilmiş ve elde edilen laktofermente içecekler duyusal özellikleri açısından incelenmiştir. Bu içecekler içerisinde duyusal özellikler bakımından en yüksek skorları elma ve üzüm sularından elde edilen laktofermente içecekler almıştır [177].

4.4.13 Aroma Profili

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin aroma profilleri Tablo 4.27'de görülmektedir. Tablo 4.27'de görüldüğü gibi, kontrol grubu ve laktofermente örneklerde toplam 38 adet aroma maddesi belirlenmiştir. Bulgular, fermentasyon sonrası aroma bileşenlerinde çeşitli değişimlerin olduğunu göstermektedir. 1-butanol, 3-methyl bileşeni, VN12-SH5 ve VN9-Miks örneklerinin majör aroma bileşenlerinden bir tanesi iken VN9-SH10 ve VN12-SH14'de eugenol ve phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)- yüksek konsantrasyonda tespit edilen 2 aroma maddesidir. Alpha terpineol ve Benzaldehyde, 3,5-dimethyl konsantrasyonlarının da VN9-SH10 ve VN12-SH14'de yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 4.27 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin aroma profilleri

Uçucu bileşen	Alan (%)				
	VN12-K	VN9-SH10	VN12-SH5	VN12-SH14	VN9-Miks
Aldehitler					
Benzaldehyde	3,40	5,60	-	-	-
2-furancarboxaldehyde	10,35	-	65,64	-	-
Benzaldehyde, 3,5-dimethyl	5,15	11,64	-	8,93	-
Alkoller					
1-butanol, 3-methyl-	-	-	17,79	-	35,58
2-methyl-1-butanol	-	-	-	-	49,13
2-heptanol, 5-methyl	-	-	-	-	0,28
Furfuryl alcohol	-	-	-	-	0,91
Phenethyl alcohol	-	-	-	-	3,80
2,4-heptadien-1-ol	-	2,85	-	3,83	-
Terpenoidler					
Linalool oxide	0,67	2,18	-	-	-
Limonene	1,01	-	-	-	-
Linalyl anthranilate	8,90	4,00	-	0,94	0,71
Myrtanol TMS derivative	-	1,33	-	-	-
Trans beta terpinyl benzoate	-	2,61	-	-	-
4-thujanol	1,18	-	-	-	0,24
Alpha terpineol	19,84	15,22	-	15,03	2,38
Geyrene	2,35	-	-	-	-
Carvacrol	-	-	6,45	2,04	-
Thymol	29,89	-	-	-	-
Eugenol	-	11,76	-	18,16	-

Tablo 4.27 (devamı) Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin aroma profilleri

Uçucu bileşen	Alan (%)				
	VN12-K	VN9-SH10	VN12-SH5	VN12-SH14	VN9-Miks
Esterler					
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate	-	3,84	-	-	-
5,7-Octadien-2-ol, 2,6-dimethyl-	-	-	-	2,54	-
2,4,6-octatriene, 2,6-dimethyl	2,01	-	-	-	-
1-butanol, 3-methyl-, acetate	-	-	-	-	1,35
Asitler					
Pentanoic acid, 3-methyl	-	-	-	-	0,36
Butanoic acid, 2-methyl-	-	-	-	-	0,64
Heptanoic acid	-	-	-	-	0,18
Ethyl 2,(5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl)-propane-2-yl carbonate	-	-	-	-	0,61
Octanoic acid	-	2,66	-	6,08	0,59
Decanoic acid	-	-	-	4,69	-
Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester	3,-79	6,72	-	5,63	0,56
Hexadecanoic acid	-	-	-	-	0,69
Carbamic acid	1,32	-	-	-	-
Benzoic acid	-	0,94	-	5,93	0,37
Benzenler					
M-cymen-8-ol	-	2,52	-	3,21	-
Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	7,56	23,30	10,12	6,69	0,82
Diğerleri					
2-hydroxy-iso-butyrophenone	-	2,83	-	4,35	-
1,2,3,6-tetrahydropyridine, 1-methyl-5-phenyl-	-	-	-	3,34	-

2-methyl-1-butanol, VN9-miks örneğinin majör aroma bileşenidir. Tablo incelendiğinde genel olarak terpenoidler ve esterlerin laktofermente örneklerde en fazla bulunan aroma bileşenleri olduğu görülmektedir. Terpenoidlerin sayı ve miktar olarak fazla bulunması, bitki aromasının meyve sularına da geçtiğini anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, eser miktarda pentanoik asit, bütanoik asit, heptanoik asit gibi aroma bileşenlerinin olması, yağımsı bir aromaya katkıda bulunmuştur [178]. Fonseca vd. [179] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, çarkıfelek meyvesi suyu potansiyel probiyotik *L. plantarum* izolatı ile fermente edilmiş ve elde edilen laktofermente içeceklerde alkaloidler, ketonlar, aldehit, asitler ve esterler tespit edilmiştir. Tespit edilen maddelerin fermentasyon ile değişiklik gösterdiği ve ürünün aromasına katkıda bulunduğu ifade edilmiştir. Elde edilen bulgular bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Buna ek olarak, VN9-SH10 örneğinde, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda benzaldehit bulunması, fenilalaninin aminotransferaz enzimi vasıtasıyla benzaldehite dönüşmesinin bir göstergesidir [180].

4.4.14 Aroma Aktif Bileşenler

Tablo 4.28'de vişne bazlı içeceklerin depolama başlangıcındaki aroma aktif bileşenleri verilmiştir.

Tablo 4.28'de görüldüğü gibi, fermentasyon işlemi örneklerin duyusal olarak hissedilen aroma aktif maddelerinde değişimlere yol açmıştır. VN9-SH10 örneğinde en yoğun hissedilen aroma bileşenleri methional, methyl butanoic acid ve ethyl valerate iken VN12-SH5'te en yoğun şekilde hissedilen bileşenler diacetyl, 2-nonenal ve ethyl valerate olmuştur. VN12-SH14'te ise 2-nonenal, diacetyl ve linalool/roseoxide yoğunluğu daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, ethyl valerate ve 2-nonenal aroma bileşenleri her 3 laktofermente içecek örneğinde de yüksek yoğunlukta algılanan maddeler olmuştur, ancak bu bileşenlerin aroma yoğunluklarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir. VN9-SH10 örneğinde yüksek yoğunlukta hissedilen methional, metionin amino asidinin Strecker degradasyon ürünü olup bu bileşenin fermente bambu filizi ve elle sıkılmış greyfurt suyunda varlığı belirlenmiştir [181] [182-184].

Tablo 4.28 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin aroma aktif bileşenleri

Aroma maddesi	RT	RI	Aroma kalitesi	Aroma yoğunluğu		
				VN9-SH10	VN12-SH5	VN12-SH14
Diacetyl	3,2	632	Tereyağı	1,75	3,5	3
Hexenone	5,1	756	Mantar/metal	-	-	0,75
Bilinmeyen 1	6,5	825	Yaprak/sardunya	1,15	-	0,5
Bilinmeyen 2	6,8	839	Ferah	0,5	-	-
Methyl butanoic acid	7,4	866	Kirli ayak/ şeftali gibi	4	1,25	2
Ethyl valerate	7,6	875	Olgun meyve/ester	4,5	2,5	2
2-methyl-3-furanthiol	8	894	İlaç/antibiyotik	-	0,5	-
Bilinmeyen 3	8,4	913	Meyve	-	-	1
Methional	8,8	932	Patates/fermente	5,5	1	1
Heptanol	9,6	970	Mantar	0,5	1	0,4
1-octen-3-one	10,3	1004	Metal/mantar	0,75	1,5	0,5
Bilinmeyen 4	11,6	1073	Pudra/gül	-	0,25	-
Linalool/roseoxide	12,6	1129	Çiçek/parfüm	2	2,25	2,25
2-nonenal	13,7	1193	Saman/tütün	2,25	3	3,25
Bilinmeyen 5	14,1	1218	Hayvansı	0,5	-	-
Bilinmeyen 6	14,6	1249	Yağ okside	1	-	-
Bilinmeyen 7	15,1	1281	Nanemsi	-	-	1
Bilinmeyen 8	15,3	1293	Ferah/nanemsi	1,75	1,75	-
Bilinmeyen 9	15,5	1306	Ahırımsı			0,5
Bilinmeyen 10	16,2	1353	Kirli/saman	0,5	-	0,4
Bilinmeyen 11	16,5	1374	Ferah	-	-	1
Bilinmeyen 12	16,6	1380	Saman	-	1,25	-
Methyl eugenol	17	1408	Çiçek/karanfil	1	1,75	0,5
Bilinmeyen 13	17,4	1436	Vişne/ekşi	0,75	1,75	0,5

RT: Alıkonma zamanı, RI: Alıkonma indeksi

Ethyl valerate, gıda ve kozmetik endüstrisinde de kullanılan önemli ester bileşiklerinden birisi olup yeşil elma/meyve aromasına sahiptir [185-187]. Söz konusu maddelerin dışında, örneklerde algılanan ancak ne olduğu tanımlanamayan 13 farklı aroma aktif bileşen de bulunmaktadır.

4.4.15 Sitotoksik Aktivite

Laktofermente vişne bazlı içeceklerin soğukta depolanmaları sırasında MCF-7 hücre hattına karşı sergilemiş oldukları sitotoksik aktivite Tablo 4.29'da görülmektedir.

Tablo 4.29 Probiyotik LAB'lerle fermente edilmiş vişne bazlı içeceklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

K (μL/mL)	Hücre Canlılığı (%)					
	0. Gün					
	VN9-Kontrol	VN12-Kontrol	VN9-SH10	VN12-SH5	VN12-SH14	VN9-Miks
100	101,69±0,99^{Ab}	102,26±1,81^{Aa}	89,87±3,94^{BCb}	93,31±2,23^{BCa}	87,64±1,98^{Cd}	94,45±0,78^{Bc}
50	102,37±1.08^{Aab}	103,21±2,62^{Aa}	97,91±2,58^{ABab}	99,25±2,12^{Aa}	93,20±1,39^{Bc}	98,64±1,56^{Ab}
25	103,81±1,10^{Aab}	104,19±1,46^{Aa}	100,95±2,16^{Aba}	99,69±3,29^{Aba}	97,40±0,27^{Bb}	100,10±1,20^{ABab}
12,5	103,93±0,68^{Aab}	105,62±2,93^{Aa}	101,83±4,92^{Aa}	99,47±0,67^{Aa}	99,84±0,56^{Aab}	101,20±0,65^{Aab}
6,25	104,35±0,95^{Aab}	106,00±2,23^{Aa}	101,11±2,34^{Aa}	101,44±4,00^{Aa}	100,73±0,88^{Aab}	101,64±0,73^{Aa}
3,125	104,47±1,56^{Aab}	106,73±4,11^{Aa}	102,48±4,72^{Aa}	101,22±7,24^{Aa}	101,21±2,34^{Aa}	102,25±0,92^{Aa}
1,562	104,80±0,83^{Aa}	107,12±1,68^{Aa}	102,15±4,42^{Aa}	102,44±5,97^{Aa}	102,46±0,60^{Aa}	102,52±1,36^{Aa}
	28. Gün					
100	104,00±1,64^{ABb}	105,97±3,98^{Aa}	100,57±0,27^{Bc}	100,60±0,15^{Bd}	100,58±0,15^{Bc}	100,35±0,11^{Bc}
50	105,92±0,83^{Aab}	106,84±1,19^{Aa}	102,03±0,67^{Bbc}	102,44±0,52^{Bcd}	102,60±0,15^{Babc}	102,24±0,50^{Bbc}
25	106,27±0,53^{Aab}	107,00±1,00^{Aa}	103,09±0,37^{Babc}	102,28±0,60^{Bbcd}	102,12±0,38^{Bbc}	102,08±0,29^{Bbc}
12,5	106,37±0,79^{Aab}	107,12±2,32^{Aa}	103,55±0,94^{Aabc}	103,31±1,25^{Abcd}	103,48±1,16^{Aabc}	103,80±1,80^{Aabc}
6,25	106,47±1,34^{Aab}	107,18±1,03^{Aa}	103,96±1,69^{Aab}	104,14±1,56^{Aabc}	104,39±2,19^{Aab}	104,74±2,77^{Aab}
3,125	107,59±0,92^{Aba}	108,76±0,92^{Aa}	105,31±1,46^{Bab}	105,43±1,79^{ABab}	104,52±1,13^{Bab}	106,48±1,08^{ABa}
1,562	107,63±0,92^{Aa}	108,96±2,15^{Aa}	105,61±1,89^{Aa}	106,58±0,98^{Aa}	105,88±2,13^{Aa}	106,40±0,53^{Aa}

Aynı satırdaki büyük, aynı sütundaki küçük harflerin farklı olması, veriler arasında istatistiksel olarak fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Tablo incelendiğinde, vişne bazlı laktofermente içeceklerin MCF-7 meme kanseri hücre hattına karşı çalışılan konsantrasyonlarda düşük bir sitotoksik etki sergilediği görülmektedir. Depolamanın başlangıcında, çalışılan en yüksek konsantrasyon olan 100 μL/mL'de VN12-SH14 örneğinde %87'lik bir hücre canlılığı gözlenmiş olup en yüksek sitotoksik etki ($P<0,05$) burada görülmüştür. Bu örneği sırasıyla VN9-SH10, VN12-SH5 ve VN9-Miks örnekleri takip etmiştir. Bu konsantrasyonda laktofermente örnekler, fermente edilmemiş kontrol örneklerine kıyasla daha yüksek ($P<0,05$) antikarsinojenik etki göstermiştir. Depolamanın sonunda ise, sitotoksik etkinin azaldığı ve hücre canlılığında 0. güne kıyasla artış olduğu belirlenmiştir. Benzer bir çalışmada Ravanbakhshian ve Behbahani [188], *L. plantarum* ile fermente edilmiş sarımsak ekstraktının meme kanseri hücresi üzerindeki sitotoksik etkisini incelemişler ve potansiyel bir antikanserojen madde olabileceğini öne sürmüşlerdir. Başka bir çalışmada, şeker pancarı suyu, karışık *L. acidophilus* and *L. plantarum* kültürü ile 48 saat boyunca fermente edilmiş ve elde edilen laktofermente içeceğin insan akciğer kanseri hücre hattının canlılık miktarını %64 oranında azalttığı tespit edilmiştir [189]. Priyadharshini [190] tarafından yapılan çalışmada ise, *L. rhamnosus* ile fermente edilen fuji elması suyu, MCF-7 meme kanseri hücre hattına karşı 62,5 μg/mL konsantrasyonda %49,58'lik bir sitotoksik etki göstermiştir.

4.5 *in vitro* Biyoyararlılık

Tablo 4.30'da laktofermente vişne bazlı içeceklerin sırasıyla 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerinde belirlenen *in vitro* biyoyararlılık değerleri görülmektedir.

Tablo 4.30 Vişne bazlı laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının depolama boyunca değişimi

		0. gün					
		VN9-Kontrol	**VN12-Kontrol**	**VN9-SH10**	**VN12-SH5**	**VN12-SH14**	**VN9-miks**
TPC	**Initial**	353,48±5,42	353,67±4,24	295,72±7,26	288,37±3,98	301,56±2,26	293,255±3,48
	Pg	186,50±3,43	184,76±4,57	110,25±3,61	102,42±4,60	121,89±2,65	104,10±4,14
	In	49,76±2,15	49,69±2,40	47,75±3,60	45,83±3,32	49,60±1,54	42,75±2,90
	Out	107,60±3,50	111,20±1,67	92,40±2,10	94,75±2,70	91,84±2,75	89,90±2,24
	Recovery (%)	14,08±0,06	14,05±0,10	16,15±0,05	15,89±0,09	16,45±0,07	14,58±0,09
CUPRAC	**Initial**	994,47±9,26	996,31±4,42	1232,50±33,39	1108,82±12,29	1576,71±68,7	1078,42±34,81
	Pg	277,43±3,15	274,78±4,67	497,25±14,60	316,73±5,71	659,35±11,47	431,54±6,79
	In	75,94±1,10	75,98±1,25	132,86±2,47	118,44±2,16	162,72±1,09	101,95±3,66
	Out	121,50±2,74	123,20±2,31	248,81±3,65	255,74±1,40	236,92±3,15	279,48±1,60
	Recovery (%)	7,64±0,02	7,63±0,07	10,78±0,05	10,68±0,09	10,32±0,07	9,45±0,05
FLAV	**Initial**	94,54±1,45	96,71±1,45	95,99±1,68	84,84±2,52	85,81±1,68	84,60±2,15
	Pg	18,62±1,10	19,58±1,20	24,44±1,08	22,63±1,42	21,89±1,07	21,35±1,12
	In	11,88±0,35	11,94±0,56	13,68±0,74	11,56±0,33	12,74±0,42	11,60±0,20
	Out	22,56±1,06	21,15±0,89	24,45±1,10	21,78±1,31	23,87±0,76	22,54±1,08
	Recovery (%)	12,57±0,05	12,35±0,07	14,25±0,13	13,63±0,09	14,85±0,05	13,71±0,07

TPC: Toplam fenolik madde; FLAV: Flavonoid; CUPRAC: Antioksidan kapasite; Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Tablo 4.30 (devamı) Vişne bazlı laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının depolama boyunca değişimi

		7. gün					
		VN9-Kontrol	**VN12-Kontrol**	**VN9-SH10**	**VN12-SH5**	**VN12-SH14**	**VN9-miks**
TPC	**Initial**	312,58±3,52	315,71±3,66	274,35±2,00	259,66±2,52	275,68±0,29	277,81±4,21
	Pg	154,25±1,86	152,44±2,51	128,37±2,34	117,65±1,78	131,93±1,42	130,76±2,40
	In	40,78±1,08	41,48±2,48	39,86±1,75	38,47±2,14	38,81±1,70	36,95±1,53
	Out	87,25±1,57	85,43±2,88	65,71±1,42	64,80±1,78	68,54±2,25	67,78±1,56
	Recovery (%)	13,05±0,27	13,14±0,25	14,53±0,18	14,82±0,13	14,08±0,21	13,30±0,14
CUPRAC	**Initial**	982,80±10,10	985,70±7,90	1216,16±52,66	1090,15±4,04	1262,83±35,9	1053,09±27,45
	Pg	265,31±4,27	262,83±3,80	417,56±12,73	354,45±8,76	434,55±9,32	347,15±6,24
	In	73,64±3,78	73,57±2,75	127,64±4,45	115,89±3,65	126,91±4,40	98,28±4,94
	Out	103,18±3,54	102,75±4,56	196,73±2,89	210,42±3,25	218,43±3,21	177,74±2,55
	Recovery (%)	7,49±0,05	7,46±0,07	10,50±0,03	10,63±0,04	10,05±0,02	9,33±0,02
FLAV	**Initial**	93,76±1,28	93,81±2,34	92,56±1,60	80,15±2,42	82,61±2,74	82,56±1,73
	Pg	18,13±0,82	18,84±0,76	19,67±1,06	19,75±0,74	19,96±0,68	19,83±0,81
	In	11,28±0,54	11,32±0,70	12,98±1,14	10,83±0,68	11,65±0,37	11,16±0,90
	Out	28,64±1,32	28,71±1,14	29,15±1,06	24,62±1,21	24,57±1,18	25,82±1,31
	Recovery (%)	12,03±0,06	12,07±0,07	14,02±0,11	13,51±0,04	14,10±0,03	13,52±0,10

TPC: Toplam fenolik madde; FLAV: Flavonoid; CUPRAC: Antioksidan kapasite; Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Tablo 4.30 (devamı) Vişne bazlı laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının depolama boyunca değişimi

		14. gün					
		VN9-Kontrol	**VN12-Kontrol**	**VN9-SH10**	**VN12-SH5**	**VN12-SH14**	**VN9-miks**
TPC	**Initial**	305,90±1,73	302,50±5,98	253,31±2,79	236,95±1,90	256,15±2,02	261,35±1,44
	Pg	150,43±2,26	151,16±2,62	114,42±3,51	109,78±2,43	116,65±1,80	118,72±3,60
	In	39,84±2,54	39,74±2,41	36,01±1,73	33,73±2,62	35,16±2,45	35,01±3,25
	Out	89,45±3,21	88,54±3,62	87,74±2,68	87,28±2,78	86,45±1,94	86,95±2,66
	Recovery (%)	13,02±0,08	13,14±0,05	14,22±0,07	14,24±0,10	13,73±0,05	13,40±0,05
CUPRAC	**Initial**	962,97±33,76	959,56±12,45	1172,99±3,50	1084,31±38,56	1258,17±35,06	998,63±15,71
	Pg	240,37±2,45	243,32±2,36	421,74±3,65	398,76±8,89	435,67±10,54	386,84±7,75
	In	68,85±3,21	67,54±2,48	125,23±3,23	111,43±2,76	125,85±6,75	94,24±5,47
	Out	121,45±2,48	126,73±3,24	208,54±4,45	215,63±2,71	238,86±4,17	198,95±2,14
	Recovery (%)	7,15±0,07	7,04±0,04	10,68±0,05	10,28±0,03	10,00±0,05	9,44±0,07
FLAV	**Initial**	80,65±2,42	82,56±3,18	79,24±2,52	67,74±2,16	66,51±2,58	67,83±1,86
	Pg	15,82±1,80	15,38±2,15	14,73±1,28	14,25±1,62	14,83±1,48	14,81±2,17
	In	9,28±0,36	9,64±0,52	10,25±0,74	8,38±0,86	8,48±0,41	8,22±0,34
	Out	30,54±1,22	31,62±1,54	28,86±1,76	29,94±1,37	29,65±2,14	28,62±1,12
	Recovery (%)	11,51±0,04	11,68±0,08	12,94±0,05	12,37±0,10	12,75±0,07	12,12±0,05

TPC: Toplam fenolik madde; FLAV: Flavonoid; CUPRAC: Antioksidan kapasite; Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Tablo 4.30(devamı) Vişne bazlı laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının depolama boyunca değişimi

		21. gün					
		VN9-Kontrol	**VN12-Kontrol**	**VN9-SH10**	**VN12-SH5**	**VN12-SH14**	**VN9-miks**
TPC	**Initial**	286,37±6,96	291,54±3,99	232,61±1,04	222,43±3,02	238,62±4,65	229,24±6,63
	Pg	132,78±2,42	135,14±2,19	130,67±1,46	129,86±2,34	132,25±2,71	128,64±2,40
	In	34,45±1,68	35,55±2,28	30,72±2,30	30,25±1,68	30,21±2,43	28,46±1,54
	Out	90,25±2,54	90,28±1,93	81,45±2,74	82,76±1,37	84,47±1,80	83,68±2,15
	Recovery (%)	12,03±0,06	12,19±0,04	13,21±0,10	13,60±0,05	12,66±0,08	12,41±0,07
CUPRAC	**Initial**	946,63±11,25	947,77±5,60	1132,15±16,54	1081,98±37,04	1257,00±24,5	965,05±36,17
	Pg	242,45±6,81	245,84±7,48	451,56±11,24	386,67±9,14	447,24±12,15	391,34±5,36
	In	65,22±3,45	64,73±2,15	100,73±5,37	95,32±3,25	112,37±6,28	68,87±2,43
	Out	128,56±2,65	131,37±1,79	278,45±3,14	214,35±2,72	256,92±3,18	196,43±2,51
	Recovery (%)	6,89±0,06	6,83±0,07	8,90±0,05	8,81±0,09	8,94±0,10	7,14±0,07
FLAV	**Initial**	70,54±3,28	73,15±1,46	70,64±2,24	66,56±2,21	65,28±1,75	65,34±2,32
	Pg	14,36±1,10	16,48±0,97	15,78±1,32	15,60±1,45	15,30±0,94	14,87±1,06
	In	7,18±0,43	7,32±0,26	7,82±1,05	7,14±0,40	6,83±0,32	6,70±0,21
	Out	34,23±1,06	33,74±0,83	31,24±1,21	29,56±1,18	29,74±0,94	28,15±0,87
	Recovery (%)	10,18±0,03	10,01±0,01	11,07±0,01	10,73±0,03	10,46±0,08	10,25±0,05

TPC: Toplam fenolik madde; FLAV: Flavonoid; CUPRAC: Antioksidan kapasite; Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Tablo 4.30 (devamı) Vişne bazlı laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılıklarının depolama boyunca değişimi

		28. gün					
		VN9-Kontrol	**VN12-Kontrol**	**VN9-SH10**	**VN12-SH5**	**VN12-SH14**	**VN9-miks**
TPC	**Initial**	266,00±2,93	264,06±7,21	224,10±2,02	214,75±3,28	221,43±3,33	217,31±2,98
	Pg	118,34±1,56	114,25±3,74	108,78±2,32	104,46±2,44	106,67±1,34	104,38±2,16
	In	30,48±1,64	30,72±2,17	26,53±1,08	25,40±1,30	26,14±1,62	25,67±1,93
	Out	87,15±1,50	85,36±1,70	71,37±1,55	58,87±1,21	73,15±1,16	54,68±2,24
	Recovery (%)	11,46±0,04	11,63±0,01	11,84±0,06	11,83±0,04	11,81±0,07	11,81±0,03
CUPRAC	**Initial**	924,46±12,62	931,00±15,25	1109,98±12,13	1069,14±17,62	1243,48±18,1	936,34±26,11
	Pg	254,08±6,25	259,76±8,38	472,45±11,64	328,76±9,64	562,75±16,34	312,26±9,48
	In	54,48±2,25	56,60±2,31	87,85±4,48	83,45±2,56	98,83±6,48	68,84±3,62
	Out	94,86±3,22	96,67±3,54	108,14±9,86	99,76±6,41	124,42±9,58	98,71±7,43
	Recovery (%)	5,89±0,03	6,08±0,04	7,91±0,07	7,81±0,09	7,95±0,05	7,35±0,07
FLAV	**Initial**	63,28±2,34	62,76±1,84	60,85±1,21	60,14±0,94	60,32±1,35	58,86±1,42
	Pg	16,24±1,11	16,00±0,87	15,28±1,08	15,37±1,30	15,42±1,83	15,64±0,97
	In	5,87±0,24	5,95±0,32	5,78±0,44	5,82±0,18	5,94±0,32	5,45±0,40
	Out	33,42±1,10	32,86±1,93	33,64±1,27	32,54±2,34	33,78±0,97	33,60±2,49
	Recovery (%)	9,28±0,04	9,48±0,02	9,50±0,05	9,68±0,07	9,85±0,05	9,26±0,09

TPC: Toplam fenolik madde; FLAV: Flavonoid; CUPRAC: Antioksidan kapasite; Kontrol: Fermente edilmemiş meyve bazlı içecek; Örnek kodlarındaki VN, vişne nektarını; SH5, *Lactiplantibacillus plantarum* SH5; SH10, *Limosilactobacillus fermentum* SH10; SH14, *Lactiplantibacillus pentosus* SH14; 9 ve 12 örneklerin % şeker miktarlarını temsil etmektedir.

Vişne bazlı içeceklerin biyoaktif özelliklerinin *in vitro* biyoyararlılık değerlerine genel olarak göz atıldığında, mide sindirimi (PG) sonrası toplam fenolik madde değerlerinde önemli ölçüde azalma olduğu görülmektedir. Bağırsak sindiriminin bir parçası olan IN fraksiyonu örneklerinin toplam fenolik madde değerleri, fermentasyon prosesinin fenoliklerin serum mevcudiyetine önemli katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bağırsak sindiriminin diğer bir parçası olan OUT fraksiyon sonuçları, tüm örneklerde IN fraksiyonu sonuçlarından daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, bağırsakta sindirilen fenoliklerin serum mevcudiyetinden daha az olduğunu göstermektedir. Kazanılmış biyoyararlanımın bir ifadesi olan % recovery sonuçlarına göre, sindirim süresince laktofermente örneklerin biyoyararlılığının, kontrol örneklere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, fermentasyon ile uzun zincirli fenolik bileşenlerin depolimerizasyona uğrayarak daha kısa zincirli bileşenler oluşturması ve bu bileşenlerin bağırsak ortamında geçişinin daha kolay olması ile ilişkilidir [191]. Benzer bulgular, sindirim sürecindeki toplam antioksidan ve flavonoid içerikleri için de gözlenmiştir. Benzer bir çalışmada, çeşitli sebzeler kullanılarak laktofermente sebze içecekleri hazırlanmış ve bu içeceklerde fermentasyon sonrası fenolik içeriğinde ve % recovery değerinde önemli ölçüde artış olduğu tespit edilmiştir [192]. Başka bir çalışmada, taze kekik yaprakları kurutularak fermente edilmiş ve elde edilen bütün örneklerin etanolik ekstraktları *in vitro* sindirime tabi tutularak TPC ve antioksidan içerikleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, fermente örneklerin antioksidan ve % recovery değerlerinin kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir [191].

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, vişne sularının probiyotik taşıyıcısı düşük kalorili laktofermente içecek olarak tasarlanması amaçlanmıştır. İlk etapta, ülkemizde geleneksel olarak üretilen şalgam ve gilaburu laktofermente içeceklerinden LAB'leri izole edilerek tanımlanmış ve tanımlanan izolatların potansiyel probiyotik özellikleri karakterize edilmiştir. *Lactiplantibacillus plantarum* SH5*, Limosilactobacillus fermentum* SH10 ve *Lactiplantibacillus pentosus* SH14 izolatları, optimum probiyotik özelliklere sahip izolatlar olarak belirlenmiştir. İkinci etapta, seçilen bu 3 farklı izolat, farklı oranlarda şeker ilavesi yapılan vişne nektarlarına inoküle edilmiş ve bütün örnekler farklı süre ve sıcaklarda fermente edilerek fermentasyon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemelerde optimum fermentasyon süresi 20 saat olarak belirlenmiştir. Optimizasyon sonrası 10 günlük kısa bir ön depolama yapılarak en yüksek LAB sayısı, en iyi duyusal özellikler ve en büyük kalori azalması sağlayan örnekler seçilmiş ve seçilen örnekler ile 28 günlük asıl depolama süreci başlatılmıştır. Üçüncü aşamada, 4 ^{0}C'de 28 günlük depolama boyunca 7 günlük periyotlarla laktofermente içeceklerin fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri bakımından karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışma boyunca aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

- Fermentasyon işleminde starter kültürler vişne bazlı içeceklere uyum sağlamıştır ancak fermentasyon esnasında LAB sayısı artışı sınırlı düzeyde kalmıştır.
- Çalışma başlangıcında laktofermente vişne bazlı içeceklerin depolanma süresi 60 gün olarak ve analiz periyotları 14 gün olarak tasarlanmıştır ancak bu süre zarfında içeceklerdeki LAB miktarı hızla azalmış ve analizlerden sağlıklı sonuç alınamamıştır. Yapılan denemeler sonucunda, laktofermente içeceklerdeki LAB sayısı hedeflenen değer olan 10^{6} kob/mL'nin üzerinde kalması için geçen maksimum süre 28 gün olarak belirlenmiştir.

- Vişne bazlı laktofermente içeceklerde %50'ye yaklaşan kalori düşüşleri elde edilmiştir. Bu değerler, hedef olarak belirlenen %30 kalori azalışı oranının oldukça üzerindedir.
- Laktofermente vişne bazlı içecekler, depolama boyunca kontrol grubuna kıyasla duyusal olarak daha kabul edilebilir niteliklere sahip olmuşlardır.
- Fermentasyon işlemi ile vişne bazlı içeceklerin fenolik ve aroma profilleri ile aroma aktif bileşenlerinde önemli değişimler meydana gelmiştir.
- Fermentasyon işlemi, vişne bazlı içeceklerin toplam fenolik madde miktarlarında azalmaya yol açarken antioksidan kapasitelerini artırmıştır.
- Laktofermente meyve bazlı içecekler MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına karşı konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik aktivite göstermiştir. Depolamanın sonunda sitotoksik etki azalmıştır.
- Biyoaktif özelliklerin *in vitro* biyoyararlılığı, vişne bazlı içecekte fermentasyon ile artmıştır.

Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, vişne bazlı laktofermente içeceklerin probiyotik taşıyıcısı olarak potansiyelinin olduğu söylenebilir. Ancak, 28 günlük depolama boyunca LAB canlılığı değişimi göz önünde bulundurulduğunda, ürünün raf ömrünün 4 ^{0}C'de 14 gün olarak kısıtlanmasının probiyotik özelliği koruması açısından daha makul olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan, vişne nektarı berrak meyve suyu proses hattı ürünü olduğu için çalışmada tasarlanan laktofermente içecekler diyet lif açısından fakirdir ve ilave şeker dışında hiçbir katkı maddesi içermemektedir. Bu durum, fermentasyon esnasında starter kültürlerin canlı kalmasını ve faaliyet göstermesini zorlaştıran bir faktördür. Bu problemi bertaraf etmek için, vişne bazlı içeceklere oligosakkaritler gibi prebiyotik maddeler eklenebilir. Ayrıca starter kültürlere çeşitli polimerler kullanılarak enkapsülasyon işlemi uygulanabilir. 10^{9} kob/mL olarak uygulanan inokülasyon dozu daha yüksek seviyelere çıkarılabilir. Böylelikle daha yüksek canlılık ve daha stabil bir osmotik denge sağlanarak starter kültürün ortama uyum sağlaması ve daha yüksek verimle faaliyet göstermesi; buna bağlı olarak da laktofermente içeceklerin biyoaktif özelliklerinin iyileştirilmesi sağlanabilir. Bunun dışında,

Türkiye'de yaygın olarak tüketilen şeftali, kayısı, portakal, mandalina gibi farklı meyveler veya bu meyvelerin karışımları kullanılarak alternatif içecek formülasyonları geliştirilebilir. Bununla beraber, bu içecek formülasyonlarında Tablo 2.4'te verilen farklı probiyotik bakteri türleri kullanılarak da laktofermente içecekler dizayn edilebilir ve fonksiyonel özellikleri araştırılabilir. Böylelikle kalite özellikleri iyileştirilmiş ve biyoaktivitesi yüksek alternatif ürün gamları oluşturulabilir.

KAYNAKÇA

[1] J.-O. Gebbers, "Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins–a critical review," *GMS German Medical Science,* vol. 5, 2007.

[2] N. J. Temple, "Antioxidants and disease: more questions than answers," *Nutrition research,* vol. 20, no. 3, pp. 449-459, 2000.

[3] R. H. Liu, "Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals," *The American journal of clinical nutrition,* vol. 78, no. 3, pp. 517S-520S, 2003.

[4] K. He, F. Hu, G. Colditz, J. Manson, W. Willett ve S. Liu, "Changes in intake of fruits and vegetables in relation to risk of obesity and weight gain among middle-aged women," *International journal of obesity,* vol. 28, no. 12, pp. 1569-1574, 2004.

[5] F. J. He, C. A. Nowson, M. Lucas ve G. A. MacGregor, "Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies," *Journal of human hypertension,* vol. 21, no. 9, pp. 717-728, 2007.

[6] I. Endrizzi *vd.* , "Toward a new fruit juice line with a high healthy power," *Ingredienti Alimentari (Italy),* 2006.

[7] L. Dauchet *vd.* , "Dietary patterns and blood pressure change over 5-y follow-up in the SU. VI. MAX cohort," *The American journal of clinical nutrition,* vol. 85, no. 6, pp. 1650-1656, 2007.

[8] İ. Öztürk, "Beslenmede Fermente Gıdalar ve Probiyotikler," *Beslenme ve Diyetetikte Biyopsikososyal Konulara Multidisipliner Yaklaşım,* p. 39, 2022.

[9] N. Mota de Carvalho, E. M. Costa, S. Silva, L. Pimentel, T. H. Fernandes ve M. E. Pintado, "Fermented foods and beverages in human diet and their influence on gut microbiota and health," *Fermentation,* vol. 4, no. 4, p. 90, 2018.

[10] M. Arıcı, "Fermentasyon teknolojisi, bitkisel fermentasyonlar," ed: İstanbul, 2017.

[11] D. Bass *vd.* , "Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans," *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,* vol. 274, no. 1629, pp. 3069-3077, 2007.

[12] J. P. Tamang, K. Watanabe ve W. H. Holzapfel, "Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages," *Frontiers in microbiology,* vol. 7, p. 377, 2016.

[13] C. Voidarou *vd.* , "Fermentative foods: Microbiology, biochemistry, potential human health benefits and public health issues," *Foods,* vol. 10, no. 1, p. 69, 2020.

[14] M. García-Burgos, J. Moreno-Fernández, M. J. Alférez, J. Díaz-Castro ve I. López-Aliaga, "New perspectives in fermented dairy products and their health relevance," *Journal of Functional Foods,* vol. 72, p. 104059, 2020.

[15] J. García-Díez ve C. Saraiva, "Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety," *International journal of environmental research and public health,* vol. 18, no. 5, p. 2544, 2021.

[16] P. Tsafrakidou, A.-M. Michaelidou ve C. G. Biliaderis, "Fermented cereal-based products: Nutritional aspects, possible impact on gut microbiota and health implications," *Foods,* vol. 9, no. 6, p. 734, 2020.

[17] N. Şanlier, B. B. Gökcen ve A. C. Sezgin, "Health benefits of fermented foods," *Critical reviews in food science and nutrition,* vol. 59, no. 3, pp. 506-527, 2019.

[18] N. Sajjad, A. Rasool, A. B. A. Fazili ve E. Eijaz Ahmed Bhat, "Fermentation of fruits and vegetables," *Plant Arch,* vol. 20, pp. 1338-1342, 2020.

[19] L. Liu *vd.* , "Traditional fermented soybean products: Processing, flavor formation, nutritional and biological activities," *Critical reviews in food science and nutrition,* vol. 62, no. 7, pp. 1971-1989, 2022.

[20] V. Bell, J. Ferrão, L. Pimentel, M. Pintado ve T. Fernandes, "One health, fermented foods, and gut microbiota," *Foods,* vol. 7, no. 12, p. 195, 2018.

[21] R. Nirmaladevi, "Therapeutic Uses of Fermented Food Products," in *Fermented Food Products*: CRC Press, 2019, pp. 385-402.

[22] S. J. Oak ve R. Jha, "The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review," *Critical reviews in food science and nutrition,* vol. 59, no. 11, pp. 1675-1683, 2019.

[23] P. Kumar *vd.* , "Quality, functionality, and shelf life of fermented meat and meat products: A review," *Critical reviews in food science and nutrition,* vol. 57, no. 13, pp. 2844-2856, 2017.

[24] S. Rezac, C. R. Kok, M. Heermann ve R. Hutkins, "Fermented foods as a dietary source of live organisms," *Frontiers in microbiology,* vol. 9, p. 1785, 2018.

[25] R. Di Cagno, R. Coda, M. De Angelis ve M. Gobbetti, "Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation," *Food Microbiology,* vol. 33, no. 1, pp. 1-10, 2013.

[26] N. Demir, K. S. Bahçeci ve J. Acar, "The effects of different initial Lactobacillus plantarum concentrations on some properties of fermented carrot juice," *Journal of Food Processing and Preservation,* vol. 30, no. 3, pp. 352-363, 2006.

[27] M. Tokatlı, D. Dursun, N. Arslankoz, P. Şanlıbaba ve F. Özçelik, "Turşu üretiminde laktik asit bakterilerinin önemi," *Akademik Gıda,* vol. 10, no. 1, pp. 70-76, 2012.

[28] H. Spurr Jr, "The microbial ecology of fruit and vegetable surfaces: its relationship to postharvest biocontrol," *Biological control of postharvest diseases-theory and practice,* 1994.

[29] E. Badosa, R. Trias, D. Parés, M. Pla ve E. Montesinos, "Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR)," *Journal of the Science of Food and Agriculture,* vol. 88, no. 4, pp. 605-611, 2008.

[30] W. Weissinger, W. Chantarapanont ve L. Beuchat, "Survival and growth of Salmonella baildon in shredded lettuce and diced tomatoes, and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer," *International journal of food microbiology,* vol. 62, no. 1-2, pp. 123-131, 2000.

[31] R. Di Cagno *vd.* , "Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows," *International journal of food microbiology,* vol. 127, no. 3, pp. 220-228, 2008.

[32] M. Naeem, M. Ilyas, S. Haider, S. Baig ve M. Saleem, "Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics," *Pak J Bot,* vol. 44, no. 323, p. 8, 2012.

[33] L. K. Nyanga, M. J. Nout, T. H. Gadaga, B. Theelen, T. Boekhout ve M. H. Zwietering, "Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (Ziziphus mauritiana) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe," *International journal of food microbiology,* vol. 120, no. 1-2, pp. 159-166, 2007.

[34] R. Di Cagno *vd.* , "Exploitation of sweet cherry (Prunus avium L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria," *Food microbiology,* vol. 28, no. 5, pp. 900-909, 2011.

[35] R. Di Cagno *vd.* , "Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (Ananas comosus L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing," *Food Microbiology,* vol. 27, no. 3, pp. 381-389, 2010.

[36] G. Campbell-Platt, "Fermented Foods in Encyclopedia of Food Microbiology. Robinson RK, Batt CA and Patel, PD," ed: London: Academic Press, 2000.

[37] W. J. Kelly, G. P. Davey ve L. J. Ward, "Characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh fruit and vegetables," *International journal of food microbiology,* vol. 45, no. 2, pp. 85-92, 1998.

[38] O. Sağdıç, E. Küçüköner ve S. Özçelik, "Probiyotik ve prebiyotiklerin fonksiyonel özellikleri," *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* vol. 35, no. 3-4, 2004.

[39] M. A. K. Azad, M. Sarker, T. Li ve J. Yin, "Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview," *BioMed research international,* vol. 2018, 2018.

[40] H. Bilginer ve B. Çetin, "Probiyotikler ve belirlenmelerinde kullanılan in vitro testler," *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* vol. 50, no. 3, pp. 312-325, 2019.

[41] Ş. D. Ürkmez ve A. Gücükoğlu, "Probiyotik Olarak Tanımlanan Yeni Mikroorganizmalar," *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi,* vol. 30, no. 1, pp. 95-99, 2019.

[42] L. Jack, F. Coyer, M. Courtney ve B. Venkatesh, "Probiotics and diarrhoea management in enterally tube fed critically ill patients—What is the evidence?," *Intensive and Critical Care Nursing,* vol. 26, no. 6, pp. 314-326, 2010.

[43] M. R. Swain, M. Anandharaj, R. C. Ray ve R. P. Rani, "Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics," *Biotechnology research international,* vol. 2014, 2014.

[44] F. C. Prado, J. L. Parada, A. Pandey ve C. R. Soccol, "Trends in non-dairy probiotic beverages," *Food Research International,* vol. 41, no. 2, pp. 111-123, 2008.

[45] L. Wang *vd.* , "Evaluation of the hypoglycemic effect of probiotics via directly consuming glucose in intestines of STZ-induced diabetic mice and glucose water-induced diabetic mice," *Journal of functional foods,* vol. 64, p. 103614, 2020.

[46] F. Yan *vd.* , "Screening for potential novel probiotics with dipeptidyl peptidase IV-inhibiting activity for type 2 diabetes attenuation in vitro and in vivo," *Frontiers in microbiology,* vol. 10, p. 2855, 2020.

[47] E. F. Goljan, "Rapid Review Pathology," 2018.

[48] Y. Wang *vd.* , "Antioxidant properties of probiotic bacteria," *Nutrients,* vol. 9, no. 5, p. 521, 2017.

[49] T. Feng ve J. Wang, "Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: A systematic review," *Gut Microbes,* vol. 12, no. 1, p. 1801944, 2020.

[50] S. Vivarelli *vd.* , "Benefits of using probiotics as adjuvants in anticancer therapy," *World Academy of Sciences Journal,* vol. 1, no. 3, pp. 125-135, 2019.

[51] A. Górska, D. Przystupski, M. J. Niemczura ve J. Kulbacka, "Probiotic bacteria: a promising tool in cancer prevention and therapy," *Current microbiology,* vol. 76, pp. 939-949, 2019.

[52] K. Śliżewska, P. Markowiak-Kopeć ve W. Śliżewska, "The role of probiotics in cancer prevention," *Cancers,* vol. 13, no. 1, p. 20, 2021.

[53] K. Lu, S. Dong, X. Wu, R. Jin ve H. Chen, "Probiotics in cancer," *Frontiers in Oncology,* vol. 11, p. 638148, 2021.

[54] J. C. Clemente, J. Manasson ve J. U. Scher, "The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease," *Bmj,* vol. 360, 2018.

[55] M. Aponte, N. Murru ve M. Shoukat, "Therapeutic, prophylactic, and functional use of probiotics: a current perspective," *Frontiers in Microbiology,* vol. 11, p. 562048, 2020.

[56] R. G. Kerry, J. K. Patra, S. Gouda, Y. Park, H.-S. Shin ve G. Das, "Benefaction of probiotics for human health: A review," *Journal of food and drug analysis,* vol. 26, no. 3, pp. 927-939, 2018.

[57] N. Yeşilyurt, B. Yılmaz, D. Ağagündüz ve R. Capasso, "Involvement of probiotics and postbiotics in the immune system modulation," *Biologics,* vol. 1, no. 2, pp. 89-110, 2021.

[58] S. Misra ve D. Mohanty, "Psychobiotics: a new approach for treating mental illness?," *Critical reviews in food science and nutrition,* vol. 59, no. 8, pp. 1230-1236, 2019.

[59] Ö. Merve, G. Özyurt ve Ş. T. Harsa, "Probiyotik ve prebiyotiklerin bağırsak-beyin aksına etkisi," *Akademik Gıda,* vol. 17, no. 2, pp. 269-280, 2019.

[60] P. Trzeciak ve M. Herbet, "Role of the intestinal microbiome, intestinal barrier and psychobiotics in depression," *Nutrients,* vol. 13, no. 3, p. 927, 2021.

[61] R. C. Ray ve P. S. Sivakumar, "Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops," *International Journal of Food Science & Technology,* vol. 44, no. 6, pp. 1073-1087, 2009.

[62] T. Gadaga, A. Mutukumira, J. Narvhus ve S. Feresu, "A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe," *International journal of food microbiology,* vol. 53, no. 1, pp. 1-11, 1999.

[63] F. Tornuk, I. Ozturk, S. Karaman, O. Sagdic ve H. Yetim, "Rheological and some physicochemical properties of probiotic boza beverage fermented with Lactobacillus casei Shirota: Application of principal component analysis for the characterisation," *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods,* vol. 6, no. 2, pp. 237-247, 2014.

[64] Ö. Hancioğlu ve M. Karapinar, "Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage," *International Journal of Food Microbiology,* vol. 35, no. 3, pp. 271-274, 1997.

[65] V. Gotcheva, S. S. Pandiella, A. Angelov, Z. G. Roshkova ve C. Webb, "Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza," *Process Biochemistry,* vol. 36, no. 1-2, pp. 127-130, 2000.

[66] N. Yapar, "Geleneksel olarak fermente edilmis gilaburu (Viburnum opulus L.) meyvesinin suyundan izole edilen laktik asit bakterilerinin endüstriyel gilaburu suyu üretiminde kullanim olanakları," *Master Thesis,* p. 96, 2008.

[67] H. Erten, H. Tanguler ve A. Canbaş, "A traditional Turkish lactic acid fermented beverage: Shalgam (Salgam)," *Food Reviews International,* vol. 24, no. 3, pp. 352-359, 2008.

[68] H. Tanguler ve H. Erten, "Occurrence and growth of lactic acid bacteria species during the fermentation of shalgam (salgam), a traditional Turkish

fermented beverage," *LWT-Food Science and Technology,* vol. 46, no. 1, pp. 36-41, 2012.

[69] H. Tanguler ve H. Erten, "Chemical and microbiological characteristics of shalgam (şalgam): a traditional turkish lactic acid fermented beverage," *Journal of Food Quality,* vol. 35, no. 4, pp. 298-306, 2012.

[70] B. Kabak ve A. D. Dobson, "An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey," *Critical reviews in food science and nutrition,* vol. 51, no. 3, pp. 248-260, 2011.

[71] M. Arici ve F. Coskun, "Hardaliye: fermented grape juice as a traditional Turkish beverage," *Food Microbiology,* vol. 18, no. 4, pp. 417-421, 2001.

[72] A. L. F. Pereira, T. C. Maciel ve S. Rodrigues, "Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus casei," *Food research international,* vol. 44, no. 5, pp. 1276-1283, 2011.

[73] S. Kun, J. M. Rezessy-Szabó, Q. D. Nguyen ve Á. Hoschke, "Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected Bifidobacterium strains," *Process Biochemistry,* vol. 43, no. 8, pp. 816-821, 2008.

[74] K. Y. Yoon, E. E. Woodams ve Y. D. Hang, "Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria," *LWT-Food Science and Technology,* vol. 38, no. 1, pp. 73-75, 2005.

[75] R. Rozada-Sánchez, A. P. Sattur, K. Thomas ve S. S. Pandiella, "Evaluation of Bifidobacterium spp. for the production of a potentially probiotic malt-based beverage," *Process Biochemistry,* vol. 43, no. 8, pp. 848-854, 2008.

[76] N. Kurtar, "Fermented vegetable juice production with Lactic Acid Fermentetion," Master's thesis, Mersin University, Mersin, 1998.

[77] S. Öztürk, "Probiyotik kültür kullanılarak fermente karpuz suyu üretimi üzerine bir araştırma," Fen Bilimleri Enstitüsü.

[78] A. Çayır, N. Atak ve S. K. Köse, "Beslenme ve diyet kliniğine başvuranlarda obezite durumu ve etkili faktörlerin belirlenmesi," *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası,* vol. 64, no. 1, pp. 13-19, 2011.

[79] Z. Aydın, "Toplum ve birey için sağlıklı yaşlanma: Yaşam biçiminin rolü," *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi,* vol. 13, no. 4, pp. 43-46, 2006.

[80] H.-C. Hung *vd.* , "Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease," *Journal of the National Cancer Institute,* vol. 96, no. 21, pp. 1577-1584, 2004.

[81] L. A. Bazzano, T. Y. Li, K. J. Joshipura ve F. B. Hu, "Intake of fruit, vegetables, and fruit juices and risk of diabetes in women," *Diabetes care,* vol. 31, no. 7, pp. 1311-1317, 2008.

[82] O. Sagdic, I. Ozturk, N. Yapar ve H. Yetim, "Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (Viburnum opulus L.) fruit drink," *Food Research International,* vol. 64, pp. 537-545, 2014.

[83] R. M. Yildirim ve M. Arici, "Effect of the fermentation temperature on the degradation of phytic acid in whole-wheat sourdough bread," *Lwt,* vol. 112, p. 108224, 2019.

[84] J. Piatek *vd.* , "The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination-in vitro study," *Annals of Agricultural and Environmental Medicine,* vol. 19, no. 1, 2012.

[85] R. Nagpal, A. Kumar ve M. Kumar, "Fortification and fermentation of fruit juices with probiotic lactobacilli," *Annals of microbiology,* vol. 62, no. 4, pp. 1573-1578, 2012.

[86] S. Zoral, "İnsan kaynaklı Lactobacillus spp. Suşlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi," Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013.

[87] R. Kumar, S. Grover ve V. K. Batish, "Bile salt hydrolase (Bsh) activity screening of Lactobacilli: in vitro selection of indigenous Lactobacillus strains with potential bile salt hydrolysing and cholesterol-lowering ability," *Probiotics and antimicrobial proteins,* vol. 4, no. 3, pp. 162-172, 2012.

[88] İ. Çakır, "Lactobacillus ve Bifidobakterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü," Doktora Tezi, 86 s., Ankara, 2003.

[89] G. Ucak Ozkaya, M. Z. Durak, I. Akyar ve O. Karatuna, "Antimicrobial Susceptibility Test for the Determination of Resistant and Susceptible S. aureus and Enterococcus spp. Using a Multi-Channel Surface Plasmon Resonance Device," *Diagnostics,* vol. 9, no. 4, p. 191, 2019.

[90] H. Musikasang, A. Tani ve S. Maneerat, "Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract," *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* vol. 25, no. 8, pp. 1337-1345, 2009.

[91] S. Karaman, M. T. Yilmaz, G. Ozturk, F. Yuksel, Ö. S. Toker ve M. Dogan, "Characterization of grape molasses/sesame paste/honey blends: Multiple response optimization of some physicochemical, bioactive, viscoelastic and sensory properties," *Journal of Food Process Engineering,* vol. 40, no. 2, p. e12406, 2017.

[92] T. Ahmed, R. Kanwal ve N. Ayub, "Influence of temperature on growth pattern of Lactococcus lactis, Streptococcus cremoris and Lactobacillus acidophilus isolated from camel milk," *Biotechnology,* vol. 5, no. 4, pp. 481-486, 2006.

[93] J. De Man, d. Rogosa ve M. E. Sharpe, "A medium for the cultivation of lactobacilli," *Journal of applied Bacteriology,* vol. 23, no. 1, pp. 130-135, 1960.

[94] K. Helrich, *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Association of official analytical chemists, 1990.

[95] W. Ellefson, "Provisions of the nutrition labeling and education act," *Methods of analysis for nutrition labeling. Virginia: AOAC International,* pp. 3-26, 1993.

[96] K. F. Worku, H. Kurabachew ve Y. Hassen, "Probiotication of Fruit Juices by Supplemented Culture of lactobacillus acidophilus," *Int. J. Food Sci. Nutr. Eng,* vol. 9, pp. 45-48, 2019.

[97] V. Singleton, R. Orthofer ve R. Lamuela-Raventos, "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In'Oxidants and Antioxidants, Pt A'. 299 pp. 152-178," *WOS: 000079431900014. http://dx. doi. org/10.1016/S0076-6879 (99),* pp. 99017-1, 1999.

[98] B. Turan, Z. H. Tekin-Cakmak, S. Kayacan Çakmakoglu, S. Karasu, M. Z. Kasapoglu ve E. Avci, "Effect of Different Drying Techniques on Total Bioactive Compounds and Individual Phenolic Composition in Goji Berries," *Processes,* vol. 11, no. 3, p. 754, 2023.

[99] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek ve S. E. Karademir, "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method," *Journal of agricultural and food chemistry,* vol. 52, no. 26, pp. 7970-7981, 2004.

[100] L. Česonienė, R. Daubaras, P. Viškelis ve A. Šarkinas, "Determination of the total phenolic and anthocyanin contents and antimicrobial activity of Viburnum opulus fruit juice," *Plant foods for human nutrition,* vol. 67, no. 3, pp. 256-261, 2012.

[101] A. J. Andreu-Sevilla, P. Mena, N. Martí, C. G. Viguera ve Á. A. Carbonell-Barrachina, "Volatile composition and descriptive sensory analysis of pomegranate juice and wine," *Food Research International,* vol. 54, no. 1, pp. 246-254, 2013.

[102] H. Van Den Dool ve P. D. Kratz, "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography," 1963.

[103] R. Cakir-Koc, Y. Budama-Kilinc, Z. Kaya, B. B. Orcen ve E. Ucarkus, "Coconut oil-loaded chitosan nanoparticles for the treatment of acne vulgaris: cytotoxicity, antibacterial activity, and antibiofilm properties," *Fresenius Environmental Bulletin,* vol. 27, no. 5, pp. 2642-2648, 2018.

[104] G. J. McDougall, P. Dobson, P. Smith, A. Blake ve D. Stewart, "Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system," *Journal of agricultural and food chemistry,* vol. 53, no. 15, pp. 5896-5904, 2005.

[105] M. Tomas, J. Beekwilder, R. D. Hall, O. Sagdic, D. Boyacioglu ve E. Capanoglu, "Industrial processing versus home processing of tomato sauce: Effects on phenolics, flavonoids and in vitro bioaccessibility of antioxidants," *Food Chemistry,* vol. 220, pp. 51-58, 2017.

[106] B. Dziuba, A. Babuchowski, D. Nałęcz ve M. Niklewicz, "Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis," *International Dairy Journal,* vol. 17, no. 3, pp. 183-189, 2007.

[107] M. Wenning ve S. Scherer, "Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method," *Applied microbiology and biotechnology,* vol. 97, no. 16, pp. 7111-7120, 2013.

[108] S. Torriani, G. E. Felis ve F. Dellaglio, "Differentiation of Lactobacillus plantarum, L. pentosus, and L. paraplantarum by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers," *Appl. Environ. Microbiol.,* vol. 67, no. 8, pp. 3450-3454, 2001.

[109] Y. Yien Ong, W. Siang Tan, M. Rosfarizan, E. S. Chan ve B. Ti Tey, "Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented red dragon fruit juices," *Journal of food science,* vol. 77, no. 10, pp. M560-M564, 2012.

[110] P. K. Gopal, J. Prasad, J. Smart ve H. S. Gill, "In vitro adherence properties of Lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli," *International journal of food microbiology,* vol. 67, no. 3, pp. 207-216, 2001.

[111] E. M. Tuomola ve S. J. Salminen, "Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures," *International journal of food microbiology,* vol. 41, no. 1, pp. 45-51, 1998.

[112] M. Moussavi ve M. C. Adams, "An in vitro study on bacterial growth interactions and intestinal epithelial cell adhesion characteristics of probiotic combinations," *Current microbiology,* vol. 60, no. 5, pp. 327-335, 2010.

[113] M. Candela *vd.* , "Interaction of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production," *International journal of food microbiology,* vol. 125, no. 3, pp. 286-292, 2008.

[114] M. Gagnon, E. E. Kheadr, G. Le Blay ve I. Fliss, "In vitro inhibition of Escherichia coli O157: H7 by bifidobacterial strains of human origin," *International Journal of Food Microbiology,* vol. 92, no. 1, pp. 69-78, 2004.

[115] D. Haller, H. Colbus, M. G. Gänzle, P. Scherenbacher, C. Bode ve W. Hammes, "Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative in vitro studybetween bacteria of intestinal and fermented food origin," *Systematic and Applied Microbiology,* vol. 24, no. 2, pp. 218-226, 2001.

[116] M. S. R. Rajoka *vd.* , "Identification, characterization, and probiotic potential of Lactobacillus rhamnosus isolated from human milk," *LWT,* vol. 84, pp. 271-280, 2017.

[117] K. Angmo, A. Kumari ve T. C. Bhalla, "Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh," *LWT-food Science and Technology,* vol. 66, pp. 428-435, 2016.

[118] P. Das, S. Khowala ve S. Biswas, "In vitro probiotic characterization of Lactobacillus casei isolated from marine samples," *Lwt,* vol. 73, pp. 383-390, 2016.

[119] E. R. Kashket, "Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance," *FEMS Microbiology Reviews,* vol. 3, no. 3, pp. 233-244, 1987.

[120] B. Corcoran, C. Stanton, G. Fitzgerald ve R. Ross, "Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars," *Applied and environmental microbiology,* vol. 71, no. 6, pp. 3060-3067, 2005.

[121] C. Dunne *vd.* , "Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials," in *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*: Springer, 1999, pp. 279-292.

[122] J. Prasad, H. Gill, J. Smart ve P. K. Gopal, "Selection and characterisation of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use as probiotics," *International Dairy Journal,* vol. 8, no. 12, pp. 993-1002, 1998.

[123] A. M. Leite *vd.* , "Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains," *Journal of dairy science,* vol. 98, no. 6, pp. 3622-3632, 2015.

[124] A. Abushelaibi, S. Al-Mahadin, K. El-Tarabily, N. P. Shah ve M. Ayyash, "Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk," *LWT-food Science and Technology,* vol. 79, pp. 316-325, 2017.

[125] Y. Zhang *vd.* , "Antimicrobial activity against Shigella sonnei and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food," *Microbiological research,* vol. 167, no. 1, pp. 27-31, 2011.

[126] E. Papamanoli, N. Tzanetakis, E. Litopoulou-Tzanetaki ve P. Kotzekidou, "Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties," *Meat science,* vol. 65, no. 2, pp. 859-867, 2003.

[127] M. Shehata, S. El Sohaimy, M. A. El-Sahn ve M. Youssef, "Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity," *Annals of Agricultural Sciences,* vol. 61, no. 1, pp. 65-75, 2016.

[128] A. Y. Bustos, L. Saavedra, G. F. de Valdez, R. R. Raya ve M. P. Taranto, "Relationship between bile salt hydrolase activity, changes in the internal pH and tolerance to bile acids in lactic acid bacteria," *Biotechnology letters,* vol. 34, pp. 1511-1518, 2012.

[129] G. Bongaerts *vd.* , "Lactobacilli and acidosis in children with short small bowel," *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition,* vol. 30, no. 3, pp. 288-293, 2000.

[130] M. E. Sanders, "Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health," *The Journal of nutrition,* vol. 130, no. 2, pp. 384S-390S, 2000.

[131] S. A. Moser ve D. C. Savage, "Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli," *Appl. Environ. Microbiol.,* vol. 67, no. 8, pp. 3476-3480, 2001.

[132] C. P. de Lima, G. M. P. Dias, M. T. C. V. Soares, L. M. Bruno ve A. L. F. Porto, "Coalho cheese as source of probiotic lactic acid bacteria," *Research, Society and Development,* vol. 9, no. 8, pp. e266984958-e266984958, 2020.

[133] L. Noriega, I. Cuevas, A. Margolles ve G. Clara, "Deconjugation and bile salts hydrolase activity by Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile," *International dairy journal,* vol. 16, no. 8, pp. 850-855, 2006.

[134] C. Mishra ve J. Lambert, "Production of anti-microbial substances by probiotics," *Asia Pacific journal of clinical nutrition,* vol. 5, pp. 20-24, 1996.

[135] G. Reid, A. W. Bruce, N. Fraser, C. Heinemann, J. Owen ve B. Henning, "Oral probiotics can resolve urogenital infections," *FEMS Immunology & Medical Microbiology,* vol. 30, no. 1, pp. 49-52, 2001.

[136] R. D. Rolfe, "The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health," *The Journal of nutrition,* vol. 130, no. 2, pp. 396S-402S, 2000.

[137] P. Shokryazdan *vd.* , "Probiotic potential of Lactobacillus strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains," *BioMed research international,* vol. 2014, 2014.

[138] D. Mitić-Ćulafić, B. S. Vuković-Gačić, J. B. Knežević-Vukčević, S. Stanković ve D. M. Simić, "Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (Salvia officinalis L.)," *Archives of Biological Sciences,* vol. 57, no. 3, pp. 173-178, 2005.

[139] B. Karska-Wysocki, M. Bazo ve W. Smoragiewicz, "Antibacterial activity of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)," *Microbiological research,* vol. 165, no. 8, pp. 674-686, 2010.

[140] C. Yang ve T. Yu, "Characterization and transfer of antimicrobial resistance in lactic acid bacteria from fermented dairy products in China," *The Journal of Infection in Developing Countries,* vol. 13, no. 02, pp. 137-148, 2019.

[141] G. Başbülbül, M. Özteber ve H. H. Biyik, "Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dairy products and boza," *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences,* vol. 2021, pp. 513-517, 2021.

[142] F. Clementi ve L. Aquilanti, "Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria," *Anaerobe,* vol. 17, no. 6, pp. 394-398, 2011.

[143] G. F. M. Gad, A. M. Abdel-Hamid ve Z. S. H. Farag, "Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products," *Brazilian journal of Microbiology,* vol. 45, no. 1, pp. 25-33, 2014.

[144] P. A. Maragkoudakis, G. Zoumpopoulou, C. Miaris, G. Kalantzopoulos, B. Pot ve E. Tsakalidou, "Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products," *International Dairy Journal,* vol. 16, no. 3, pp. 189-199, 2006.

[145] U. Filiz ve A. Akyildiz, "Meyve Suyu Sanayiinde Enzimaktik Uygulamalar," *Gıda,* vol. 37, no. 6, pp. 363-370, 2012.

[146] S. Rafiq *vd.* , "Development of probiotic carrot juice," *Journal of Nutrition & Food Sciences,* vol. 6, no. 4, pp. 1-5, 2016.

[147] T. V. Fonteles, M. G. M. Costa, A. L. T. de Jesus ve S. Rodrigues, "Optimization of the fermentation of cantaloupe juice by Lactobacillus casei NRRL B-442," *Food and Bioprocess Technology,* vol. 5, pp. 2819-2826, 2012.

[148] B. J. Muhialdin, H. Kadum, M. Zarei ve A. S. M. Hussin, "Effects of metabolite changes during lacto-fermentation on the biological activity and consumer acceptability for dragon fruit juice," *Lwt,* vol. 121, p. 108992, 2020.

[149] T. V. T. Do ve L. Fan, "Probiotic viability, qualitative characteristics, and sensory acceptability of vegetable juice mixture fermented with lactobacillus strains," *Food and Nutrition Sciences,* vol. 10, no. 04, p. 412, 2019.

[150] R. R. Maldonado *vd.* , "Application of soluble fibres in the osmotic dehydration of pineapples and reuse of effluent in a beverage fermented by water kefir," *Lwt,* vol. 132, p. 109819, 2020.

[151] P. Chand, M. D. Kumar, A. K. Singh, G. K. Deshwal, P. S. Rao ve H. Sharma, "Influence of processing and packaging conditions on probiotic survivability rate, physico-chemical and sensory characteristics of low calorie synbiotic milk beverage," *Journal of Dairy Research,* vol. 89, no. 1, pp. 94-99, 2022.

[152] Y. Men, P. Zhu, Y. Zhu, Y. Zeng, J. Yang ve Y. Sun, "The development of low-calorie sugar and functional jujube food using biological transformation and fermentation coupling technology," *Food Science & Nutrition,* vol. 7, no. 4, pp. 1302-1310, 2019.

[153] D. Güney ve M. Güngörmüşler, "Development and comparative evaluation of a novel fermented juice mixture with probiotic strains of lactic acid bacteria and Bifidobacteria," *Probiotics and Antimicrobial Proteins,* vol. 13, pp. 495-505, 2021.

[154] M. M. Zandi, M. Hashemiravan ve S. Berenjy, "Production of probiotic fermented mixture of carrot, beet and apple juices," 2016.

[155] Z. Mousavi, S. Mousavi, S. Razavi, Z. Emam-Djomeh ve H. Kiani, "Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria," *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* vol. 27, pp. 123-128, 2011.

[156] D. Dimitrovski, E. Velickova, T. Langerholc ve E. Winkelhausen, "Apple juice as a medium for fermentation by the probiotic Lactobacillus plantarum PCS 26 strain," *Annals of Microbiology,* vol. 65, no. 4, pp. 2161-2170, 2015.

[157] É. Resende Oliveira, M. Caliari, M. Soares Soares Júnior, A. Ribeiro Oliveira, R. Cristina Marques Duarte ve E. Valério de Barros Vilas Boas, "Assessment of chemical and sensory quality of sugarcane alcoholic fermented beverage," *Journal of food science and technology,* vol. 55, pp. 72-81, 2018.

[158] S. Yeğin ve A. Üren, "Biogenic amine content of boza: A traditional cereal-based, fermented Turkish beverage," *Food Chemistry,* vol. 111, no. 4, pp. 983-987, 2008.

[159] J. A. M. Manga, S. C. D. Zangué, M. Zargar, E. Albert ve M. Bayat, "Producing probiotic beverage based on raffia sap fermented by Lactobacillus fermentum and Bifidobacterium bifidum," *Research on Crops,* vol. 20, no. 3, pp. 629-634, 2019.

[160] E. Kwaw *vd.* , "Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice," *Food chemistry,* vol. 250, pp. 148-154, 2018.

[161] A. Navruz, M. Türkyılmaz ve M. Özkan, "Colour stabilities of sour cherry juice concentrates enhanced with gallic acid and various plant extracts during storage," *Food chemistry,* vol. 197, pp. 150-160, 2016.

[162] K. Ertan, M. Türkyılmaz ve M. Özkan, "Effects of natural copigment sources in combination with sweeteners on the stability of anthocyanins in sour cherry nectars," *Food chemistry,* vol. 294, pp. 423-432, 2019.

[163] C. Wu, T. Li, J. Qi, T. Jiang, H. Xu ve H. Lei, "Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice," *Lwt,* vol. 122, p. 109064, 2020.

[164] H. Sina *vd.* , "Phytochemical composition and in vitro biological activities of Morinda citrifolia fruit juice," *Saudi journal of biological sciences,* vol. 28, no. 2, pp. 1331-1335, 2021.

[165] W. Laosee, D. Kantachote, W. Chansuwan ve N. Sirinupong, "Effects of Probiotic Fermented Fruit Juice-Based Biotransformation by Lactic Acid Bacteria and Saccharomyces boulardii CNCM I-745 on Anti-Salmonella and Antioxidative Properties," 2022.

[166] E. L. de Souza, T. M. R. de Albuquerque, A. S. Dos Santos, N. M. L. Massa ve J. L. de Brito Alves, "Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties

and food functionalities–A review," *Critical reviews in food science and nutrition,* vol. 59, no. 10, pp. 1645-1659, 2019.

[167] H. E. Verón *vd.* , "Cactus pear (Opuntia ficus-indica) juice fermented with autochthonous Lactobacillus plantarum S-811," *Food & Function,* vol. 10, no. 2, pp. 1085-1097, 2019.

[168] A. L. dos Santos Filho *vd.* , "Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage," *Lwt,* vol. 99, pp. 371-378, 2019.

[169] V. M. Burin, L. D. Falcão, L. V. Gonzaga, R. Fett, J. P. Rosier ve M. T. Bordignon-Luiz, "Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice," *Food Science and Technology,* vol. 30, pp. 1027-1032, 2010.

[170] B. Aşkın ve A. Atik, "Color, phenolic composition, and antioxidant properties of hardaliye (fermented grape beverage) under different storage conditions," *Turkish Journal of Agriculture and Forestry,* vol. 40, no. 6, pp. 803-812, 2016.

[171] S. Li *vd.* , "Fermentation of blueberry juices using autochthonous lactic acid bacteria isolated from fruit environment: Fermentation characteristics and evolution of phenolic profiles," *Chemosphere,* vol. 276, p. 130090, 2021.

[172] R. Hu *vd.* , "Fermented carrot juice attenuates type 2 diabetes by mediating gut microbiota in rats," *Food & function,* vol. 10, no. 5, pp. 2935-2946, 2019.

[173] Y. Xu, M. M. Hlaing, O. Glagovskaia, M. A. Augustin ve N. S. Terefe, "Fermentation by probiotic Lactobacillus gasseri strains enhances the carotenoid and fibre contents of carrot juice," *Foods,* vol. 9, no. 12, p. 1803, 2020.

[174] M. H. Johnson, M. Wallig, D. A. L. Vital ve E. G. de Mejia, "Alcohol-free fermented blueberry–blackberry beverage phenolic extract attenuates diet-induced obesity and blood glucose in C57BL/6J mice," *The Journal of Nutritional Biochemistry,* vol. 31, pp. 45-59, 2016.

[175] J. Perjéssy, F. Hegyi, M. Nagy-Gasztonyi, R. Tömösközi-Farkas ve Z. Zalán, "Development of lactic acid fermented, probiotic sour cherry juice," *Progress in Agricultural Engineering Sciences,* vol. 16, no. S1, pp. 19-33, 2020.

[176] T. Luckow ve C. Delahunty, "Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks," *Food Quality and Preference,* vol. 15, no. 7-8, pp. 751-759, 2004.

[177] W. Randazzo *vd.* , "Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms," *Food Microbiology,* vol. 54, pp. 40-51, 2016.

[178] H. Gao *vd.* , "Momordica charantia juice with Lactobacillus plantarum fermentation: Chemical composition, antioxidant properties and aroma profile," *Food Bioscience,* vol. 29, pp. 62-72, 2019.

[179] H. C. Fonseca, D. de Sousa Melo, C. L. Ramos, A. G. T. Menezes, D. R. Dias ve R. F. Schwan, "Sensory and flavor-aroma profiles of passion fruit juice fermented by potentially probiotic Lactiplantibacillus plantarum CCMA 0743 strain," *Food Research International,* vol. 152, p. 110710, 2022.

[180] M. N. Nierop Groot ve J. A. de Bont, "Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in Lactobacillus plantarum," *Applied and Environmental Microbiology,* vol. 64, no. 8, pp. 3009-3013, 1998.

[181] P. Ballance, "Production of volatile compounds related to the flavour of foods from the Strecker degradation of DL-methionine," *Journal of the Science of Food and Agriculture,* vol. 12, no. 7, pp. 532-536, 1961.

[182] A. Buettner ve P. Schieberle, "Evaluation of aroma differences between hand-squeezed juices from Valencia late and Navel oranges by quantitation of key odorants and flavor reconstitution experiments," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* vol. 49, no. 5, pp. 2387-2394, 2001.

[183] A. Buettner ve P. Schieberle, "Evaluation of key aroma compounds in hand-squeezed grapefruit juice (Citrus paradisi Macfayden) by quantitation and flavor reconstitution experiments," *Journal of Agricultural and food chemistry,* vol. 49, no. 3, pp. 1358-1363, 2001.

[184] S.-G. Fu, Y. Yoon ve R. Bazemore, "Aroma-active components in fermented bamboo shoots," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* vol. 50, no. 3, pp. 549-554, 2002.

[185] L. Dwiarti, E. Ali ve E. Y. Park, "Enhancement of lipase catalyzed-fatty acid methyl esters production from waste activated bleaching earth by nullification of lipase inhibitors," *Bioresource technology,* vol. 101, no. 1, pp. 14-20, 2010.

[186] T. Raghavendra, D. Sayania ve D. Madamwar, "Synthesis of the ‘green apple ester’ethyl valerate in organic solvents by Candida rugosa lipase immobilized in MBGs in organic solvents: Effects of immobilization and reaction parameters," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* vol. 63, no. 1-2, pp. 31-38, 2010.

[187] G. Bayramoğlu, B. Hazer, B. Altıntaş ve M. Y. Arıca, "Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis," *Process biochemistry,* vol. 46, no. 1, pp. 372-378, 2011.

[188] R. Ravanbakhshian ve M. Behbahani, "Cytotoxic and antibacterial activities of fermented and non-fermented extracts of garlic," *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences,* vol. 27, no. 156, pp. 38-49, 2018.

[189] M. Vaithilingam *vd.* , "Fermentation of beet juice using lactic acid bacteria and its cytotoxic activity against human liver cancer cell lines HepG2," *Current Bioactive Compounds,* vol. 12, no. 4, pp. 258-263, 2016.

[190] J. Priyadharshini, "Fermentation of Malus domestica using Lactobacillus rhamnosus to enhance the bioavailability of total phenolic content and its anti-oxidant and anti-neoplastic activity against MCF-7 Cell Line " 2020.

[191] K. Ozkan, A. Karadag ve O. Sagdic, "The effects of drying and fermentation on the bioaccessibility of phenolics and antioxidant capacity of Thymus vulgaris leaves," *Acta Alimentaria,* 2022.

[192] K. Dogan, P. K. Akman ve F. Tornuk, "Role of non-thermal treatments and fermentation with probiotic Lactobacillus plantarum on in vitro bioaccessibility of bioactives from vegetable juice," *Journal of the Science of Food and Agriculture,* vol. 101, no. 11, pp. 4779-4788, 2021.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Akman, P. K., Törnük, F., & Yetim, H., (2019). *Production of fruit based drinks as carriers of probiotic bacteria Lactobacillus rhamnosus sp.* . 10th Probiotics, Prebiotics & New Foods (pp.84). Rome, Italy

Makaleler

1. Akman, P. K., Özülkü, G., Törnük, F., & Yetim, H., (2021). Potential probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented gilaburu and shalgam beverages. *LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY* , vol.149, 111705.