

**BÜTÜNLEŞİK OMİK YAKLAŞIMI İLE GELENEKSEL TARHANA
FERMANTASYONU MİKROBİYOMUNUN ARAŞTIRILMASI**

**INTEGRATED OMICS APPROACHES TO INVESTIGATE
THE MICROBIOME OF FERMENTATION OF
TRADITIONAL TARHANA**

ÖZLEM IŞIK DOĞAN

PROF. DR. REMZİYE YILMAZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Ocak 2024

Cumhuriyetimizin 100'üncü yaşına ithafen...

ÖZET

BÜTÜNLEŞİK OMİK YAKLAŞIMI İLE GELENEKSEL TARHANA FERMANTASYONU MİKROBİYOMUNUN ARAŞTIRILMASI

Özlem IŞIK DOĞAN

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

Ocak 2024, 223 sayfa

Tarhana tahıllar, süt ürünleri, çeşitli sebzeler ve baharatların karıştırılması ve ardından elde edilen hamurun laktik ve alkolik fermantasyonu ile hazırlanan geleneksel bir üründür. Ticari olarak ya da çoğunlukla hanelerde bölgelere göre değişen geleneksel bileşenler, fermantasyon, kurutma ve öğütme aşamaları ile üretilen tarhana, farklılaşan tariflere bağlı olarak çeşide özgü özelliklere sahiptir. Bu çalışmada, Isparta, Maraş, Bursa, Kastamonu ve Uşak illerine ait reçetelerle hazırlanan tarhana hamurlarının fermantasyon süreçleri sırasında alınan 19 adet farklı örneğe kimyasal, mikrobiyolojik, metagenomik ve metabolomik analizler uygulanarak bu tarhana çeşitlerinin mikrobiyotaları ve oluşan metabolitler arasındaki ilişkiler değerlendirilmiştir. Yapılan kimyasal analizler ile çalışmaya konu olan tarhana çeşitlerinin pH, toplam asitlik, toplam yağ, protein, kül ve kuru madde miktarları belirlenmiş, tarhana fermantasyon prosesinin doğru olarak ilerlemesi kontrol edilmiştir. Klasik kültürel yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen mikrobiyolojik analizler sonucu fermantasyon süreçlerinde mikroorganizma yükleri belirlenmiş ve saf kültürler izole edilmiştir. İzole edilen saf kültürler Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Süresi (MALDI-TOF) teknolojisini kullanan otomatik bir kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır. Ayrıca örneklerin bakteriyel ve

fungus mikrobiyotası yüksek çıktılı dizileme analizleri ile ortaya konmuştur. Tarhana hamurlarının fermantasyon süreci boyunca içerdiği laktik, süksinik, asetik, sitrik, pirüvik, ürik, okzalik ve formik asit miktarları bir DAD dedektör (Agilent, G1315A, Santa Clara, California, ABD) ve bir InertSustain AQ-C18 (3 µM, 4.0x 150 mm (UP)) kolona sahip yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazında (HPLC) cihazında tespit edilmiştir. Tarhana hamurlarında bulunan etanol miktarının fermantasyon süresince değişimi ise DB-624, 30m x 0,53mm kolon kullanılarak FID dedektör ile gaz kromatografisi (GC) cihazında belirlenmiştir. Tarhana türüne ve üretim farklılığına göre dağılımını ortaya çıkarmak üzere tüm tarhana örneklerinin mikrobiyotaları ve metabolitleri arasındaki ilişkiler temel bileşen analizleri, ısı haritaları ve korelasyon analizleri ile değerlendirilmiştir. Fermantasyon başlangıcında (pH 5,41) ve sonunda (pH 4,72) en yüksek pH değerlerine Bursa çeşidi sahipken; en düşük başlangıç (pH 4,02) ve bitiş (pH 3,86) pH değerlerine Kastamonu tarhanası sahiptir. Metagenomik analizler sonucunda ise, Bursa tarhanasında en yüksek bağıl varlıkta *Pediococcus acidilactici*, Kastamonu tarhanasında *Lactiplantibacillus plantarum*, Uşak tarhanasında *Levilactobacillus namurensis* ve *Levilactobacillus zymae* tespit edilmiştir. Fungal mikrobiyotada ise, Isparta ve Maraş çeşitlerinde *Kluyveromyces*, Bursa tarhanasında *Saccharomyces* ve Kastamonu çeşidinde *Issatchenkia* cinslerinin en yüksek bağıl varlıkta bulunduğu belirlenmiştir. Uşak tarhanası, diğer çeşitlere kıyasla daha yüksek miktarda laktik, süksinik ve asetik asit içerirken; bu üç organik asit sırasıyla tüm çeşitler için majör organik asitlerdir. Uygulanan bütünleşik analizler de tarhana tipine ve üretim prosesi farklılıklarına göre tarhana çeşitlerinin biyoçeşitliliğinin belirgin şekilde kümeler oluşturduğunu göstermiştir. Bu çalışmada fermantasyon süresi ve tarhana çeşidine bağılı olarak Isparta, Maraş, Bursa, Kastamonu ve Uşak tarhana çeşitlerinin temel kimyasal analiz profillerinin yanı sıra hem mikrobiyel açıdan hem de metabolik açıdan biyokimyasal parmak izi ortaya konmuştur. Çalışma sonunda yapılan istatistiksel karşılaştırmalar ile her çeşit tarhana için fermentasyon süresine bağılı olarak kendine özgü nitelik ve nicelikler bütünleşik omik teknolojileri ile tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tarhana, Fermantasyon, Metagenomik, Illumina, Metabolomik.

ABSTRACT

INTEGRATED OMICS APPROACHES TO INVESTIGATE THE MICROBIOME OF FERMENTATION OF TRADITIONAL TARHANA

Özlem IŞIK DOĞAN

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

January 2024, 223 pages

Tarhana is a traditional product prepared by mixing cereals, dairy products, various vegetables, and spices, followed by the lactic and alcoholic fermentation of the resulting dough. Commercially or mostly in households, traditional ingredients varying by region, along with fermentation, drying, and grinding stages, result in tarhana with specific characteristics depending on the recipe. In this study, 19 different samples obtained during the fermentation process of tarhana doughs prepared with recipes from the provinces of Isparta, Maraş, Bursa, Kastamonu, and Uşak were evaluated for their microbiota and relationships between metabolites using chemical, microbiological, metagenomic, and metabolomic analyses. Chemical analyses determined pH, total acidity, total fat, protein, ash, and dry matter amounts for the tarhana varieties under investigation, ensuring the correct progression of the tarhana fermentation process. Microbiological analyses, conducted using classical cultural methods, identified

microbial loads during fermentation processes, and pure cultures were isolated. The isolated pure cultures were identified using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) technology. Additionally, high-throughput sequencing analyses revealed the bacterial and fungal microbiota of the samples. The amounts of lactic, succinic, acetic, citric, pyruvic, uric, oxalic, and formic acids in tarhana doughs during the fermentation process were detected using a high-performance liquid chromatography device (HPLC) with a Diode Array Detector (DAD) and an InertSustain AQ-C18 column (3 μ M, 4.0x 150 mm (UP)). The change in ethanol content in tarhana doughs during fermentation was determined by gas chromatography (GC) using a DB-624, 30m x 0.53mm column with a Flame Ionization Detector (FID). To reveal the distribution based on tarhana type and production differences, relationships between the microbiota and metabolites of all tarhana samples were evaluated using principal component analyses, heatmaps, and correlation analyses. Bursa variety had the highest pH values at the beginning (pH 5.41) and end (pH 4.72) of fermentation, while Kastamonu tarhana had the lowest initial (pH 4.02) and final (pH 3.86) pH values. Metagenomic analyses indicated the highest relative abundance of *Pediococcus acidilactici* in Bursa tarhana, *Lactiplantibacillus plantarum* in Kastamonu tarhana, *Levilactobacillus namurensis*, and *Levilactobacillus zymae* in Uşak tarhana. In the fungal microbiota, *Kluyveromyces* in Isparta and Maraş varieties, *Saccharomyces* in Bursa tarhana, and *Issatchenkia* in Kastamonu variety were found to have the highest relative abundance. Uşak tarhana contained higher amounts of lactic, succinic, and acetic acids compared to other varieties, with these three organic acids being major organic acids for all varieties, respectively. Integrated analyses also demonstrated that tarhana varieties formed distinct clusters based on the type and production process differences. In this study, the biocultural fingerprints of Isparta, Maraş, Bursa, Kastamonu, and Uşak tarhana varieties were revealed both microbiologically and metabolically, depending on fermentation time and tarhana type. Statistical comparisons at the end of the study identified unique qualitative and quantitative characteristics for each type of tarhana based on fermentation time, utilizing integrated omic technologies.

Keywords: Tarhana, Fermentation, Metagenomics, Illumina, Metabolomics.

TEŞEKKÜR

Tüm Doktora eğitimim sürecince beni yönlendiren, destekleyen, her zaman yanımda olduğunu hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Remziye YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez jürimde bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK ve Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER'e yorumları ve katkıları için teşekkür ederim.

Analizlerimi gerçekleştirdiğim, çalıştığım kurum olan Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'ndeki çalışma arkadaşlarıma süreç boyunca destekleri için teşekkür ederim.

Bu uzun ve zorlu süreçte desteklerini her zaman hissettiğim, başardığım her adımda emekleri olan annem Asuman IŞIK, babam İrfan IŞIK ve kardeşim Eda IŞIK KOÇBOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam sürecinde hep yanımda olan eşim Suray DOĞAN ve bu uzun yolculuktaki en yakın ortağım kızım Doğa Bilge DOĞAN'a teşekkür ve sevgilerimle...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tahıl Fermantasyonları	4
2.2. Tarhana.....	5
2.2.1. Tarhananın Kimyasal Özellikleri	10
2.3. Bazı Geleneksel Tarhana Çeşitleri	11
2.3.1. Isparta Tarhanası	11
2.3.2. Maraş Tarhanası	12
2.3.3. Bursa Tarhanası.....	12
2.3.4. Kastamonu Tarhanası.....	13
2.3.5. Uşak Tarhanası.....	13
2.4. Tarhana Fermantasyonu	14
2.4.1. Laktik Asit Bakterileri.....	17
2.4.2. Mayalar.....	28
2.4.3. Fermente Gıdalarda Laktik Asit Bakterileri (LAB) ve Mayalar Arasındaki Etkileşimler	32
2.5. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektrometresi (MALDI TOF MS)	34
2.6. Metagenomik Amplikon Dizileme Analizleri.....	40
2.7. Biyoinformatik Analizler	46
2.8. Metabolomik Yaklaşımlar ve Tarhananın Organik Asit ve Etanol İçeriği	50

2.8.1. Organik Asitlerin Yapısı	52
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	59
3.1. Farklı Tarhana Tiplerinin Laboratuvar Ortamında Üretilmesi	59
3.1.1. Malzemeler	59
3.1.2. Tarhana Hamurlarının Hazırlanması ve Fermantasyonu	59
3.1.3. Isparta Tarhanası Hazırlanması ve Fermantasyonu	60
3.1.4. Maraş Tarhanası Hazırlanması ve Fermantasyonu	61
3.1.5. Bursa Tarhanası Hazırlanması ve Fermantasyonu.....	61
3.1.6. Kastamonu Tarhanası Hazırlanması ve Fermantasyonu.....	62
3.1.7. Uşak Tarhanası Hazırlanması ve Fermantasyonu.....	64
3.1.8. Tarhana Hamurlarından Örnek Alınma Planı	65
3.2. Kimyasal Analizler	66
3.2.1. pH ve Asitlik Tayini	66
3.2.2. Yağ Miktarı Tayini	66
3.2.3. Protein Miktarı Tayini	67
3.2.4. Kül Miktarı Tayini	67
3.2.5. Kuru madde miktarı	67
3.3. Klasik Mikrobiyolojik Yaklaşımlar Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi	68
3.3.1. Kimyasal Malzemeler	68
3.3.2. Tarhana Örneklerinde Mikroorganizmaların Sayımı ve İzolasyonu	69
3.4. Kültüromik Yaklaşımlar (MALDI TOF MS) Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi.....	70
3.4.1. Kimyasal Malzemeler	70
3.4.2. Ribozomal Proteinlerin Ekstraksiyonu ve Mikroorganizmaların Tanımlanması	71
3.5. Metagenomik Yaklaşımlar Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi 74	
3.5.1. Kimyasal Malzemeler	74
3.5.2. Genomik DNA Ekstraksiyonu	74
3.5.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	75
3.5.4. Amplikon Temelli Metagenomik Analizler için DNA Dizilemesi.....	76

3.5.5. Biyoinformatik Analizler	76
3.6. Metabolomik Yaklaşımlar Kullanılarak Tarhana Örneklerinde Bulunan Bazı Organik Asitlerin ve Etanol Miktarlarının Belirlenmesi	77
3.6.1. Kimyasal Malzemeler	77
3.6.2. Organik Asit Analizleri	77
3.6.3. Etanol Analizleri	78
3.7. Veri Analizi	79
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	80
4.1. Kimyasal Analiz Sonuçları.....	81
4.1.1. pH ve Asitlik Tayini Sonuçları.....	81
4.1.2 Yağ Miktarı Tayini Sonuçları	86
4.1.3. Protein Miktarı Tayini Sonuçları.....	88
4.1.4. Kül Miktarı Tayini Sonuçları	91
4.1.5. Kuru Madde Miktarı Sonuçları	93
4.2. Klasik Mikrobiyolojik Yaklaşımlar Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi.....	95
4.2.1. Fermantasyon Süresi Boyunca Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Sayısında Görülen Değişimler.....	96
4.2.2. Fermantasyon Süresi Boyunca Laktobasillerin Sayısında Görülen Değişimler	98
4.2.3. Fermantasyon Süresi Boyunca Laktik Streptokokların ve Laktokokların Sayısında Görülen Değişimler	101
4.2.4. Fermantasyon Süresi Boyunca Streptokokların Sayısında Görülen Değişimler.....	103
4.2.5. Fermantasyon Süresi Boyunca Enterokokların Sayısında Görülen Değişimler	105
4.2.6. Fermantasyon Süresi Boyunca Maya ve Küf Sayısında Görülen Değişimler	107
4.3. Kültüromik Yaklaşımlar (MALDI TOF MS) Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi	109
4.4. Metagenomik Yaklaşımlar Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi	122

4.4.1. Genel Bakış.....	122
4.4.2. Mikroorganizmalar: Cins ve tür seviyesinde	140
4.4.3. Farklı Tarhana Çeşitleri Mikrobiyotasının Genel Değerlendirmesi	161
4.5. Metabolomik Yaklaşım ile Tarhana Örneklerinde Bulunan Bazı Organik Asitlerin ve Etanol Miktarlarının Belirlenmesi.....	167
4.5.1. Laktik asit	170
4.5.2. Süksinik asit.....	172
4.5.3. Asetik asit	175
4.5.4. Sitrik asit	177
4.5.5. Pirüvik asit	179
4.5.6. Ürik asit.....	181
4.5.7. Okzalik asit	183
4.5.8. Formik asit	186
4.5.9. Etanol	187
4.6. Bütünleştirici Analizler: Sınıflandırma, Kümeleme ve Korelasyon Analizleri.	189
4.6.1. Sınıflandırma Analizleri	189
4.6.2. Kümeleme Analizleri	193
4.6.3. Korelasyon Analizleri	195
5. YORUM.....	200
6. KAYNAKLAR	205
EKLER.....	218
EK 1 – Tez kapsamında izole edilen suşların saklanması hakkında resmi yazı.....	218
EK 4 - Tezden Türetilmiş Yayınlar	220
EK 5 - Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	221
EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	222
ÖZGEÇMİŞ	223

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tarhana üretimi akım şeması.	6
Şekil 2.2. Glikozun homolaktik fermantasyon ile kullanılması (glikoliz, Embden-Meyerhof-Parnas izyolu) [59].	22
Şekil 2.3. Glikozun heterolaktik fermantasyon ile kullanılması (6-fosfoglukonat/fosfoketolaz (6-PG/PK) izyolu) [59].	24
Şekil 2.4. Laktik asit bakterilerinde galaktoz metabolizması [67].	25
Şekil 2.5. Pirüvatın alternatif kullanım izyolları, noktalı çizgiler enzimatik olmayan reaksiyonları göstermektedir, enzimler sırasıyla: 1:diasetil sentez, 2:asetolaktat sentez, 3:pirüvat format liyaz, 4:pirüvat dehidrogenaz, 5:pirüvat oksidaz, 6:asetat kinaz [59].	27
Şekil 2.6. Heterofermentatif laktobasillerde glukoz ve sitrattan süksinik asit üretimi [59].	28
Şekil 2.7. MALDI metodu çalışma prensibi, analit-matriks kristallerinin lazer ışınları ile uyarılması sonucu analit moleküllerinin ve proteinlerin salınması [91].	36
Şekil 2.8. Uçuş zamanı analizörü ile MALDI çalışması [91].	37
Şekil 2.9. MALDI TOF MS hedef slaydının cihaza yüklenmesi.	38
Şekil 2.10. MALDI TOF MS İş Akış Şeması	40
Şekil 2.11. Yüksek çıktılı dizileme metotlarının gıda ürünlerinde uygulanma akış şeması [99].	42
Şekil 2.12. Illumina kütüphane hazırlığı işlemlerinden örnek.	43
Şekil 2.13. Illumina kütüphane örneği.	43
Şekil 2.14. Akış hücresi (Flow cell) örneği.	44
Şekil 2.15. Köprü amplifikasyon yaklaşımı ile şablon oluşumu [101].	45
Şekil 2.16. FASTQC yazılımı çalışma ekranı görüntüsü.	46
Şekil 2.17. MultiQC yazılımı çalışma ekranı görüntüsü.	47
Şekil 2. 18. İleri ve geri yönlü okumaların birleştirilmesi [114].	48
Şekil 2.19. Laktik asit stereoizomerlerinin kimyasal yapısı [135].	53
Şekil 2.20. Süksinik asitin kimyasal yapısı [136].	53
Şekil 2.21. Asetik asitin kimyasal yapısı [138].	54
Şekil 2.22. Sitrik asitin kimyasal yapısı [139].	54

Şekil 2.23. Pirüvik asidin kimyasal yapısı [140].	55
Şekil 2.24. Formik asidin kimyasal yapısı [142].	55
Şekil 2.25. Ürik asidin kimyasal yapısı [145].	56
Şekil 2.26. Okzalik asidin kimyasal yapısı [146].	56
Şekil 2.27. Etanolün kimyasal formülü [151].	57
Şekil 3.1. Isparta tarhanası.	60
Şekil 3.2. Maraş tarhanası üretimi.	61
Şekil 3.3. Bursa tarhanası üretimi.	62
Şekil 3.4. Kastamonu tarhanası üretimi.	63
Şekil 3.5. Kastamonu tarhanası üretimi, yoğurt harcı aşaması bitimi.	63
Şekil 3.6. Uşak tarhanası üretimi.	64
Şekil 3.7. Tarhana hamurlarından örnek alma planı.	65
Şekil 3.8. Hedef mikroorganizmalar, kullanılan besiyerleri ve inkübasyon koşulları.	70
Şekil 3.9. Mikrobiyolojik ekimler için kullanılan besiyerleri.	70
Şekil 3.10. MALDI TOF MS Hazırlık İstasyonu, örnek çalışma.	73
Şekil 3.11. MALDI TOF MS tanımlama penceresi, renk skorları örneği.	74
Şekil 4.1. Tez çalışmasının grafik özeti.	81
Şekil 4.2. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca pH değişimi.	85
Şekil 4.3. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca % toplam asitlik değişimi.	86
Şekil 4.4. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca % toplam yağ miktarı değişimi.	88
Şekil 4.5. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca % protein miktarı değişimi.	90
Şekil 4.6. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca % kül miktarı değişimi.	93
Şekil 4.7. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca % kuru madde miktarı değişimi.	95
Şekil 4.8. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca TMAB sayısı değişimi (log10 kob/g).	98
Şekil 4.9. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca laktobasil sayısı değişimi (log10 kob/g).	100

Şekil 4.10. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca laktik streptokok ve laktokok sayısı değişimi (\log_{10} kob/g).	103
Şekil 4.11. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca streptokok sayısı değişimi (\log_{10} kob/g).	105
Şekil 4.12. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca enterokok sayısı değişimi (\log_{10} kob/g).	107
Şekil 4.13. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca maya-küf sayısı değişimi (\log_{10} kob/g).	109
Şekil 4.14. MALDI TOF MS ile analiz edilen izolatların tarhana çeşitlerine göre dağılımı.	110
Şekil 4.15. 16S rRNA dizilemesine ait ortalama Q skoru grafiği (MultiQC raporundan alınmıştır).	125
Şekil 4.16. 18S rRNA dizilemesine ait ortalama Q skoru grafiği (MultiQC raporundan alınmıştır).	125
Şekil 4.17. Bursa F0 örneği için bakteriyel mikrobiyotaya ait baz dizisi başına kalite grafiği (FastQC raporundan alınmıştır).	126
Şekil 4.18. Bursa F0 örneği için fungal mikrobiyotaya ait baz dizisi başına kalite grafiği (FastQC raporundan alınmıştır).	127
Şekil 4.19. MultiQC raporu sonucu 16S rRNA dizilemesi için kalite kontrol analizleri sonuçları, yeşil renk: tamamen normal, turuncu: hafif anormal, kırmızı: oldukça beklenmedik.	129
Şekil 4.20. MultiQC yazılımı ile 18S rRNA dizilemesi için kalite kontrol analizleri sonuçları, yeşil renk: tamamen normal, turuncu: hafif anormal, kırmızı: oldukça beklenmedik.	130
Şekil 4.21. Bakteriyel mikrobiyota için OTU ısı haritası tablosu.	131
Şekil 4.22. Fungal mikrobiyota için OTU ısı haritası tablosu.	132
Şekil 4.23. Tarhana örneklerine ait seyrekleşme eğrileri (bakteriyel komünite için Observed, Shannon ve Simpson)	137
Şekil 4.24. Tarhana örneklerine ait seyrekleşme eğrileri (fungal komünite için Observed, Shannon ve Simpson).	138
Şekil 4.25. Bakteriyel mikrobiyotaya ait cins ve tür seviyesinde Krona grafiği.	139
Şekil 4.26. Fungal mikrobiyotaya ait cins ve tür seviyesinde Krona grafiği.	140

Şekil 4.27. Isparta tarhanası bakteriyel ve fungal mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0 (bakteriyel), b) F1 (bakteriyel), c) F0 (fungal)ve d) F1 (fungal).	142
Şekil 4.28. Maraş tarhanası bakteriyel ve fungal mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0 (bakteriyel), b) F1 (bakteriyel), c) F0 (fungal)ve d) F1 (fungal).	144
Şekil 4.29. Bursa tarhanası bakteriyel mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7 ve d) F10.	147
Şekil 4.30. Bursa tarhanası fungal mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7 ve d) F10.	148
Şekil 4.31. Kastamonu tarhanası bakteriyel mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7, d) F10 ve e) F15.	151
Şekil 4.32. Kastamonu tarhanası fungal mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7, d) F10 ve e) F15.	154
Şekil 4.33. Uşak tarhanası bakteriyel mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7, d) F10, e) F15 ve f) F21.	157
Şekil 4.34. Uşak tarhanası fungal mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7, d) F10, e) F15 ve f) F21.	160
Şekil 4.35. Farklı tarhana çeşitlerinin fermantasyon sürecinde tespit edilen bakteri cinsleri.	161
Şekil 4.36. Farklı tarhana çeşitlerinin fermantasyon sürecinde tespit edilen fungal cinsler.	167
Şekil 4.37. Organik asit analizlerinde kullanılan kalibrasyon grafiği; $Y=493,387X-11.823,4$, $r^2 = 0,9970316$, $r= 0,9985147$	168
Şekil 4.38. Organik asit standartlarına ait geliş zamanları ve okuma kanalları.	168
Şekil 4.39. Uşak F0 (a), Uşak F1 (b) ve Uşak F21 (c) örneklerinin laktik asit içeriklerine ait kromatogramlar.	169
Şekil 4.40. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca laktik asit içeriği değişimi.	172
Şekil 4.41. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca süksinik asit içeriği değişimi.	174
Şekil 4.42. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca asetik asit içeriği değişimi.	177
Şekil 4.43. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca sitrik asit içeriği değişimi.	179

Şekil 4.44. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca pürivik asit içeriği değişimi.	181
Şekil 4.45. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca ürik asit içeriği değişimi.	183
Şekil 4.46. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca okzalik asit içeriği değişimi.	185
Şekil 4.47. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca formik asit içeriği değişimi.	187
Şekil 4.48. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca etanol içeriği değişimi.	189
Şekil 4.49. Farklı tarhana çeşitlerinin bakteriyel OTU'larının fermantasyon sürecinde cins seviyesinde değişimi, küre:F0, karo:F1, halka:F7, koni:F10, yirmiyüzlü:F15, yıldız:F21; mavi:Isparta, yeşil:Maraş, kırmızı:Bursa, turuncu:Kastamonu, mor:Uşak.	191
Şekil 4.50. Farklı tarhana çeşitlerinin fungal OTU'larının fermantasyon sürecinde cins seviyesinde değişimi, küre:F0, karo:F1, halka:F7, koni:F10, yirmiyüzlü:F15, yıldız:F21; mavi:Isparta, yeşil:Maraş, kırmızı:Bursa, turuncu:Kastamonu, mor:Uşak.	193
Şekil 4.51. Tarhana hamuru örneklerinin ısı haritası oluşturulması yöntemiyle elde edilen kümeleme analizi sonuçları.	194
Şekil 4.52. Tarhana hamuru örneklerinin korelasyon analizi sonucu elde edilen pozitif ve negatif yönlü ilişkiler; beyazdan kırmızıya doğru pozitif yönlü artan ve beyazdan maviye doğru negatif yönlü artan korelasyonlar.	198

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Türkiye’de üretilen farklı tarhana türleri [24].	8
Çizelge 2.2. Ticari olarak hazırlanan tarhanaların ortalama içeriği [32].	11
Çizelge 2.3. Tahıl fermantasyonların izole edilen bazı LAB türlerinin fermantasyon yolları [61].	19
Çizelge 3.1. Çalışmada hazırlanacak tarhana çeşitlerinin fermantasyon süreleri.....	59
Çizelge 3.2. Isparta tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.	60
Çizelge 3.3. Maraş tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.	61
Çizelge 3.4. Bursa tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.	62
Çizelge 3.5. Kastamonu tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.....	63
Çizelge 3.6. Uşak tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.....	64
Çizelge 4.1. Tarhana hamur çeşitlerine ait pH analizi sonuçları.	82
Çizelge 4.2. Tarhana hamur çeşitlerine ait asitlik tayini analizi sonuçları	82
Çizelge 4.3. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca toplam yağ miktarı değişimi (%).	87
Çizelge 4.4. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca protein miktarı değişimi (%).	89
Çizelge 4.5. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca kül miktarı değişimi (%).	91
Çizelge 4.6. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca kuru madde miktarı değişimi (%).	94
Çizelge 4.7. PCA besiyerinde günlere göre Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri sayıları (log10 kob/g).	97
Çizelge 4.8. MRS Agar besiyerinde günlere göre laktobasil sayıları (log10 kob/g)	99
Çizelge 4.9. M17 Agar besiyerinde günlere göre laktik streptokokların ve laktokokların sayıları (log10 kob/g).	102
Çizelge 4.10. NRLC Agar besiyerinde günlere göre streptokokların sayıları (log10 kob/g).	104
Çizelge 4.11. KAA Agar besiyerinde günlere göre enterokokların sayıları (log10 kob/g).	106
Çizelge 4.12. DRBC besiyerinde günlere göre maya sayıları (log10 kob/g).	108

Çizelge 4.13. Tarhana örneklerinden saflaştırılan izolatların besiyeri ve fermantasyon gününe göre dağılımı.....	111
Çizelge 4.14. Tarhana örneklerinden izole edilen bakteri suşlarının MALDI TOF MS ile tanımlama sonuçları.	113
Çizelge 4.15. Tarhana örneklerinden izole edilen maya ve küflerin MALDI TOF MS ile tanımlama sonuçları.	120
Çizelge 4.16. Metagenomik çalışmaya ait özet istatistik verileri (Bakteriyel DNA)....	123
Çizelge 4.17. Metagenomik çalışmaya ait özet istatistik verileri (Fungal DNA).	124
Çizelge 4.18. MultiQC raporu sonucu bakteriyel türlere ait genel istatistikler tablosu.	127
Çizelge 4.19. MultiQC raporu sonucu fungal türlere ait genel istatistikler tablosu.....	128
Çizelge 4.20. Tarhana örneklerinde bulunan bakteriyel popülasyonların varlık ve çeşitlilik indeksleri.	133
Çizelge 4.21. Tarhana örneklerinde bulunan fungal popülasyonların varlık ve çeşitlilik indeksleri.	135
Çizelge 4.22. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca laktik asit içeriği değişimi (g/100 g).	171
Çizelge 4.23. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca süksinik asit içeriği değişimi (g/100 g).	174
Çizelge 4.24. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca asetik asit içeriği değişimi (g/100 g).	176
Çizelge 4.25. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca sitrik asit içeriği değişimi (g/100 g).	179
Çizelge 4.26. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca pirüvik asit içeriği değişimi (g/100 g)	180
Çizelge 4.27. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca ürik asit içeriği değişimi (g/100 g)	183
Çizelge 4.28. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca okzalik asit içeriği değişimi (g/100 g).	185
Çizelge 4.29. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca formik asit içeriği değişimi (g/100 g).	186
Çizelge 4.30. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca etanol içeriği değişimi (g/100 g).	188

Çizelge 2.1. Türkiye’de üretilen farklı tarhana türleri [24].	8
Çizelge 2.2. Ticari olarak hazırlanan tarhanaların ortalama içeriği [32].	11
Çizelge 2.3. Tahıl fermantasyonların izole edilen bazı LAB türlerinin fermantasyon yolları [61].	19
Çizelge 3.1. Çalışmada hazırlanacak tarhana çeşitlerinin fermantasyon süreleri.....	59
Çizelge 3.2. Isparta tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.	60
Çizelge 3.3. Maraş tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.	61
Çizelge 3.4. Bursa tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.	62
Çizelge 3.5. Kastamonu tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.....	63
Çizelge 3.6. Uşak tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.....	64
Çizelge 4.1. Tarhana hamur çeşitlerine ait pH analizi sonuçları.	82
Çizelge 4.2. Tarhana hamur çeşitlerine ait asitlik tayini analizi sonuçları	82
Çizelge 4.3. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca toplam yağ miktarı değişimi (%).	87
Çizelge 4.4. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca protein miktarı değişimi (%).	89
Çizelge 4.5. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca kül miktarı değişimi (%).	91
Çizelge 4.6. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca kuru madde miktarı değişimi (%).	94
Çizelge 4.7. PCA besiyerinde günlere göre Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri sayıları (log10 kob/g).	97
Çizelge 4.8. MRS Agar besiyerinde günlere göre laktobasil sayıları (log10 kob/g)	99
Çizelge 4.9. M17 Agar besiyerinde günlere göre laktik streptokokların ve laktokokların sayıları (log10 kob/g).	102
Çizelge 4.10. NRLC Agar besiyerinde günlere göre streptokokların sayıları (log10 kob/g).	104
Çizelge 4.11. KAA Agar besiyerinde günlere göre enterokokların sayıları (log10 kob/g).	106
Çizelge 4.12. DRBC besiyerinde günlere göre maya sayıları (log10 kob/g).	108
Çizelge 4.13. Tarhana örneklerinden saflaştırılan izolatların besiyeri ve fermantasyon gününe göre dağılımı.	111

Çizelge 4.14. Tarhana örneklerinden izole edilen bakteri suşlarının MALDI TOF MS ile tanımlama sonuçları.	113
Çizelge 4.15. Tarhana örneklerinden izole edilen maya ve küflerin MALDI TOF MS ile tanımlama sonuçları.	120
Çizelge 4.16. Metagenomik çalışmaya ait özet istatistik verileri (Bakteriyel DNA)....	123
Çizelge 4.17. Metagenomik çalışmaya ait özet istatistik verileri (Fungal DNA).	124
Çizelge 4.18. MultiQC raporu sonucu bakteriyel türlere ait genel istatistikler tablosu.	127
Çizelge 4.19. MultiQC raporu sonucu fungal türlere ait genel istatistikler tablosu.	128
Çizelge 4.20. Tarhana örneklerinde bulunan bakteriyel popülasyonların varlık ve çeşitlilik indeksleri.	133
Çizelge 4.21. Tarhana örneklerinde bulunan fungal popülasyonların varlık ve çeşitlilik indeksleri.	135
Çizelge 4.22. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca laktik asit içeriği değişimi (g/100 g).	171
Çizelge 4.23. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca süksinik asit içeriği değişimi (g/100 g).	174
Çizelge 4.24. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca asetik asit içeriği değişimi (g/100 g).	176
Çizelge 4.25. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca sitrik asit içeriği değişimi (g/100 g).	179
Çizelge 4.26. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca pirüvik asit içeriği değişimi (g/100 g)	180
Çizelge 4.27. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca ürik asit içeriği değişimi (g/100 g)	183
Çizelge 4.28. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca okzalik asit içeriği değişimi (g/100 g).	185
Çizelge 4.29. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca formik asit içeriği değişimi (g/100 g).	186
Çizelge 4.30. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca etanol içeriği değişimi (g/100 g).	188

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	Gram
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
nm	Nanometre
log	Logaritma

Kısaltmalar

LAB	Laktik Asit Bakterileri
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
GC	Gaz Kromatografisi
PCA	Temel Bileşen Analizleri
MALDI TOF MS	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektrometresi
TCA	Trikarboksilik Asit Döngüsü
KOB	Koloni oluşturan birim
TAMB	Toplam mezofilik aerobik bakteri
NGS	Yeni Nesil Sekanslama
HTS	Yüksek Çıktılı Dizileme
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas izyolu
ETS	Elektron Taşıma Sistemi

1. GİRİŞ

İnsanlığın kullandığı en eski gıda işleme tekniklerinden biri olan fermantasyon prosesi çeşitli hayvansal ve bitkisel gıdaları dönüştürüp, elde edilen ürünlere orijinal materyalden daha farklı özellikler kazandırmasıyla dünyanın birçok yerinde gıda üretiminde önemli bir yer teşkil etmiştir [1]. Fermantasyon prosesinin orijinal amacı gıdaları korumak olsa da günümüzde bu proses kazandırdığı tat, aroma ve tekstür özellikleri nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Bunların yanında, fermantasyon işlemi raf ömrünü uzatmak ve mikrobiyolojik kaliteyi arttırmak için de gıda teknolojileri açısından önemlidir.

Geleneksel bir gıda, belirli bir coğrafik bölgede yaşayan insanların tarihi kültürel mirasının bir parçasıdır [2]. Tarhana geleneksel bir Türk fermente tahıl ürünüdür. Tarhana üretiminde kullanılan tahıl unları, yoğurt, çeşitli sebzeler gibi bileşenler vitaminler, mineraller, organik asitler ve serbest amino asitler gibi önemli besin öğelerinin kaynakları olduğundan tarhana her yaş grubunun beslenmesinde önemli bir yere sahiptir [3]. Geleneksel olarak farklı bölgelerde farklı tariflerle, farklı fermantasyon sürelerinde ve sıcaklıklarında üretilen tarhana fermantasyonunda hem laktik asit bakterileri (LAB) hem de mayalar görev almakta ve laktik asit ve alkolik fermantasyon aynı anda gerçekleşmektedir.

Geleneksel fermente ürünlerin oluşumunda daha çok hammaddeden ya da çevreden kaynaklanan doğal suşlar görev almaktadır [2]. Bu doğal suşlar hem starter kültürlerden hem de starter olmayan laktik asit bakterilerinden oluşmaktadır. Tarhana gibi birçok farklı bileşen içeren fermente bir gıdanın besleyici ve duyuşal karakterlerinin oluşmasında kompleks bir mikrobiyota rol oynayacağından bu özelliklerin değerlendirilmesinde mikrobiyotanın tam ve net olarak ortaya koyularak fermantasyon sürecinde gerçekleşen ilişkilerin incelenmesi önem arz etmektedir.

Tarhana fermantasyonu sırasında hamura uygulanan kimyasal analizlerle pH ve % toplam asitlik ölçümlerinin yapılması fermantasyon prosesinin takip edilmesini sağlamaktadır [4]. Bunun yanında incelenen %protein, %toplam yağ, %kül, %kuru madde miktarı gibi

diğer kimyasal parametreler ile de bir gıda ürünü olarak tarhana çeşitlerinin besinsel özellikleri değerlendirilebilmektedir [3].

Fermantasyon süreci boyunca tarhana hamurlarının klasik mikrobiyolojik yöntemlerle takip edilmesi hem proses boyunca mikrobiyolojik ilişkilerin incelenmesini hem de saf kültürlerin izole edilmesini sağlamaktadır. Bu saf izolatların kültüromik yaklaşımlarla hızlı ve güvenilir şekilde tanımlanması ise kültüromik yaklaşımın araçlarından biri olan Matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon (MALDI) spektrometresi (MS) sistemi ile gerçekleştirilebilmektedir [5].

Çevresel bir örnekten izole edilen genetik materyalin analiz edilmesi prensibine dayanan metagenomik yaklaşımlar hem ortamdaki mikrobiyal profilin yüksek doğrulukta hem de klasik mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak izole edilemeyen mikroorganizmaların tanımlanmasını sağlamaktadır [6]. Bu yaklaşım sayesinde bir örnekte bulunan yalnızca dominant mikroorganizmalar değil, ender ya da düşük yaygınlıkta bulunanlar da tespit edilebilmektedir [7]. Metagenomik analizler kapsamında birçok uygulama bakteriyel türlerin tanımlanmasında etkili bir gösterge olan 16S rRNA geninin analizine dayanırken, fungal türlerin tanımlanmasında 18S rRNA genlerinin ITS2 bölgesi kullanılmaktadır [8,9]. Bu yüksek çıktılı dizileme yöntemleri ile elde edilen verilere çeşitli biyoinformatik analizler uygulanarak gıda örneğinde bulunan mikroorganizmaların taksonomileri ve örnekteki bağıl varlıkları ortaya konmaktadır.

Fermente gıdalarda tat ve aroma oluşumu organik asitler, serbest amino asitler ve asetaldehit ve diasetil gibi karbonil bileşikleri sonucu oluşmaktadır [10]. Tarhana hamurunda bulunan organik asitler fermantasyon prosesinin başlangıcında hamurda yer alan bileşenlerden kaynaklanmakla birlikte, süreç boyunca laktik asit bakterileri (LAB) ve mayaların metabolik aktiviteleri sonucu oluşmaktadır. Tarhana hamurunda doğal olarak bulunan homofermentatif LAB'ı başlıca laktik asit oluşumdan sorumluyken; diğer bazı organik asitler ve etanol de heterofermantatif LAB ve maya aktiviteleri sonucunda meydana gelmektedir [10]. Gıda bilimi kapsamında metabolomik ise, gıda proseslerindeki ayırıcı kimyasal uzayın karakterizasyonu için verilen bir sistemin

metabolik profillerinin araştırılmasında kullanılan çok disiplinli bir omik yaklaşımdır [11]. Tarhana hamurunda bu mikroorganizmaların faaliyetleri sonucu oluşabilecek ya da doğal olarak hammaddelerden kaynaklanabileceği düşünülen laktik, süksinik, asetik, sitrik, pürivik, formik, okzalik ve ürik asit varlık ve miktarları da metabolomik yaklaşımlar kullanılarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve etanol varlık ve miktarı gaz kromatografisi sistemlerinde belirlenebilmektedir.

Metagenomik ve metabolomik analizler sonucu elde edilen veriler çeşitli bütünleştirici analizler uygulanarak değerlendirilebilmektedir. Bu bütünleştirici analizlerden biri olan Temel Bileşen Analizleri (Principal Component Analyses, PCA) farklı geleneksel tariflerle ve yerel hammaddelerle hazırlanan tarhana çeşitlerinin bakteriyel ve fungal mikrobiyotalarının fermantasyon süresince değişimleri göz önüne alınarak sınıflandırılmasında kullanılabilir. Ayrıca ısı haritaları oluşturularak, tarhana çeşitlerinde fermantasyon boyunca oluşan değişimler metabolik ve mikrobiyom gibi farklı başlıkların aynı anda kümelenme analizleri ile gerçekleştirebilir. Tarhana gibi fermente gıdalarda yer alan mikroorganizmaların ve metabolitlerin kendi içlerinde ve birbirleriyle negatif ve pozitif yönlü değişimleri de korelasyon analizleri ile incelenebilmektedir.

Geleneksel gıda fermantasyonunu incelemedeki son teknolojik gelişmeler, substrat seçimi ve arzu edilen özelliklere yol açan fermantasyon koşulları gibi gıda fermantasyonu uygulamasındaki eski bilgeliğe dair yeni bilgiler sağlamaktadır. Bu çalışma, geleneksel fermente bir gıda olan tarhananın verimli ve sürdürülebilir bir şekilde üretilmesi için fermantasyon süreci ve ilgili mikrobiyomları omik teknolojiler kullanılarak araştırmayı amaçlamaktadır. Sonuçta, moleküler araçlar ve entegre çoklu omik yaklaşımdaki son gelişmelerin geleneksel bilgi birikimine olası katkısı vurgulanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tahıl Fermantasyonları

Fermantasyon prosesi, bozulabilir hayvansal ve bitkisel gıdaları korumak, gıda materyalinin hacmini azaltmak, çiğ ürünlerdeki istenmeyen özellikleri uzaklaştırmak, gıda ürününün besinsel değerini arttırmak ve daha güvenli bir gıda sağlamak özellikleri ile M.Ö. 6000 yıllarından bu yana dünyanın birçok yerinde gıda üretiminde önemli bir yer teşkil etmiştir [1,3,4].

Gıda fermantasyonları, gıda materyallerinin stabilizasyonu ve dönüşümü için mikroorganizmaların gelişimi ve metabolik aktivitelerini kullanan bir gıda işleme yöntemi olarak tanımlanmaktadır [12]. Mikroorganizmaların fermantasyon prosesindeki rolü bilinmeden önce, zanaatkarlar tarafından yerel tariflerle küçük komünitelerde üretilen fermente gıdalar; 19. yüzyılda endüstri devrimi ve mikrobiyoloji alanında görülen gelişmelerle daha kontrollü ve etkin bir şekilde üretilmeye başlanmıştır [1,2]. Böylece bir önceki mayanın kullanılması ya da doğal fermantasyon olmadan fermente gıdaların büyük ölçekli üretimi sağlanabilmiştir [1]. Ancak, tarhana gibi geleneksel fermente gıdalar halen geleneksel tariflerle ve yöntemlerle hanelerde üretilmeye devam etmektedir.

Dünya nüfusunun üçte birinin beslenmesinde yer alan tahıl temelli gıdaların en popüler olanları ekmek ve bira olarak sayılabilmektedir [13]. Tahıllara mikrobiyal fermantasyon işlemi uygulanması ile de bu ürünlerin besinsel değeri, lezzeti, görünüş özellikleri ve güvenliği artmaktadır [14,15]. Bu yolla fitik asit gibi anti-besleyici özellikte bileşenler azalarak minerallerin biyo-alımı artarken, doğal bir şekilde esansiyel amino asitler ve vitaminler sentezlenmektedir [15–17].

Mikroorganizmaların ve bunların enzimlerinin aktiviteleri sonucu gerçekleşen fermantasyon işlemi, biyokimyasal olarak karbonhidratların ve ilgili bileşiklerin harici bir elektron akseptörü yokluğunda enerji salınımıyla kısmen okside olması şeklinde tanımlanır [1,18]. Bu durumda son elektron alıcıları da karbonhidratların parçalanmasıyla ortaya çıkan organik bileşiklerdir. Depolanmış durumdaki tahıl taneleri düşük su

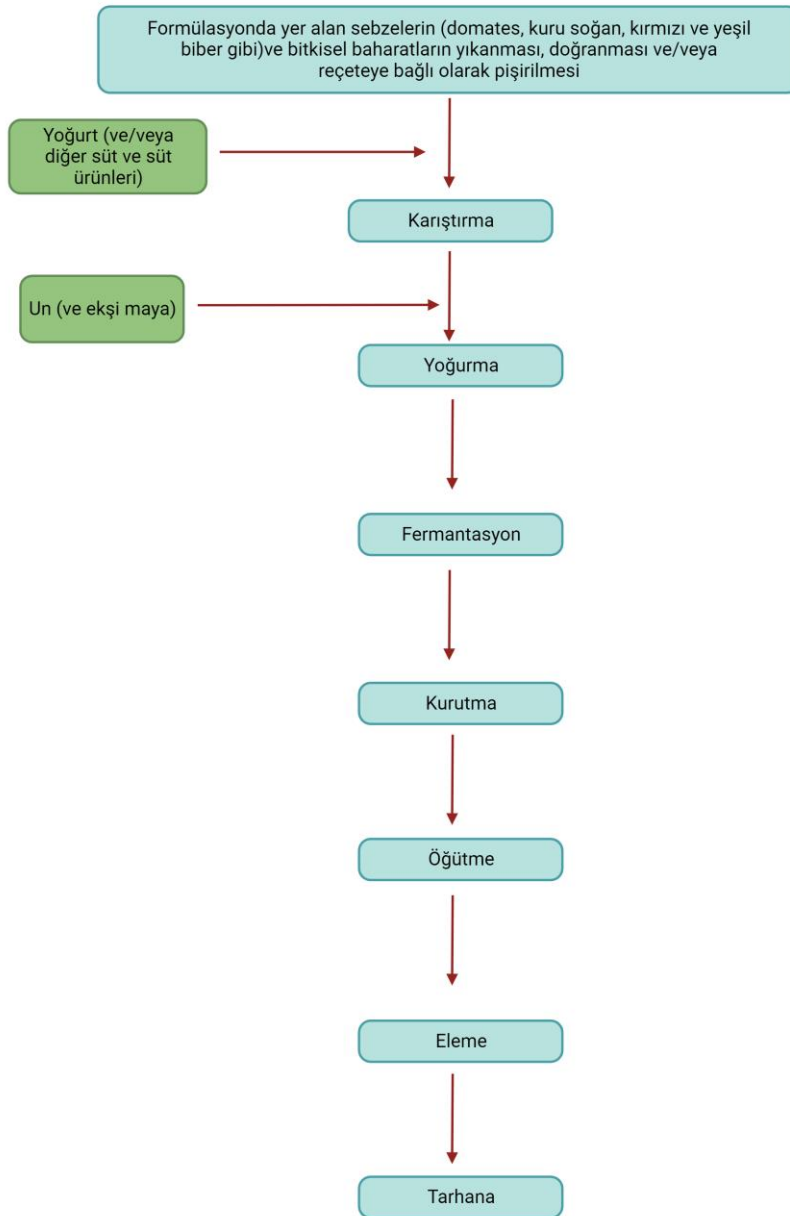
aktivitesiyle kontrol edilen dinlenme durumunda gıda ürünleri olduğundan, mikroorganizma faaliyetleri açısından uygun substratlar değildirler. Tahıllarda bulunan fermente edilebilir karbonhidratların ortaya çıkması için ihtiyaç duyulan hidrolitik aktivitelerin yönetilmesinde kullanılan dört temel yaklaşım maltlama, koji teknolojisi, harici enzim kaynakları ve hamur fermantasyonu olarak sayılabilmektedir [14]. Bu yöntemlerle su aktivitesinin arttırılmasının etkisiyle solunum ile redoks potansiyeli ve pH düşecek ve endojen enzim aktiviteleri ve mikroorganizmaların fizyolojik aktiviteleri sonucu substratlar kullanılabilir hale gelecektir [14]. Esas olarak gerçekleşen proses böyle olsa da kullanılan tahılın türü, fermente edilen karbonhidratların miktarı ve kalitesi, nitrojen kaynakları ve mikroorganizmaların kullandığı diğer besin ögelerini etkilemektedir. Bu açıdan yaklaşıldığında bir hamur fermantasyonu olan tarhana üretiminde kullanılan un ve tahıl çeşidinin fermantasyon sonucu elde edilen ürünün özelliklerini etkileyeceği açıktır.

Doğal fermente tahıl temelli gıdalarda metabolik aktivite, LAB, mayalar ve küfler gibi farklı türler ya da mikrobiyal grupların tek tek ya da kompleks metabolik kapasitelerini ve prosesin teknolojik özelliklerini yansıtarak meydana gelen gıdanın duyuşal özelliklerini etkilemektedir [19,20]. Böyle bir gıda ürününde karışık kültürler arasında gerçekleşen mikrobiyal etkileşimler son ürünün özellikleri üzerinde çok çeşitli etkilere sahip olabilmektedir.

2.2. Tarhana

Tarhana tahıllar, süt ürünleri, çeşitli sebzeler ve baharatlardan, yoğurt bakterileri ve ekmek mayası kullanılarak elde edilen geleneksel fermente bir gıda ürünüdür. Tarhana hamuru un, yoğurt, tuz, ekmek mayası, çeşitli sebzeler ve baharatların karıştırılıp yoğurulmasından sonra 1-7 gün arasında laktik ve alkolik fermantasyona bırakılmasıyla hazırlanır [3,10,21]. Bileşime yoğurt eklenmesiyle temelde laktik asit fermantasyonu gerçekleşirken; bazı yörelerde ekmek mayası ilave edilmesiyle gerçekleşen alkolik fermantasyon ise son üründe arzu edilen tarhanaya özgü bileşiklerin oluşmasını sağlar. Fermantasyon süresi sonunda elde edilen ürün 'ıslak tarhana' olarak adlandırılır ve güneş altında ya da kurutucularda topak, külçe ya da ince tabaka haline getirilerek nem içeriği %6-10 aralığına gelecek şekilde kurutulur [13]. Ardından, 1 mm'den küçük olacak

şekilde toz haline getirilerek saklanır [21]. Ancak, tarhana fermantasyon sonunda kurutulmadan saklanarak, kurutma sonrasında toz haline getirmeden ya da toz formunda çorba olarak tüketilebilir ve asidik ve ekşi bir tada sahiptir [10,22]. Tarhana üretimi akım şeması genel adımlarıyla Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Tarhana üretimi akım şeması.

Tarhana, TS 2282 [23]'ye göre "buğday unu, kırmısı, ırmik veya bunların karışımı ile yoğurt, biber, tuz, soğan, domates ve tat, koku verici, sağlığa zararsız bitkisel maddelerin

karıştırılıp yoğurulduktan ve fermente edildikten sonra kurutulması, öğütülmesi ve elenmesiyle elde edilen bir besin maddesidir' şeklinde tanımlanmıştır. Türk Standartları'na göre göce tarhanası, ırmık tarhanası ve karışık tarhana olmak üzere 4 gruba ayrılan tarhana çeşitlerinin sahip olması gereken özellikler aşağıdaki gibidir:

- Protein miktarı kuru maddede en az %12 olmalı,
- Rutubet miktarı en fazla %10 olmalı,
- Tuz miktarı kuru maddede en fazla %10 olmalı,
- %67'lik etil alkole geçen asitlik derecesi en az 15 en fazla 40 olmalı,
- Külün %10'luk hidroklorik asitle çözünmeyen kısmı, tuz hariç en fazla %0,2 olmalı,
- Tarhanalar kendine özgü sarıdan kırmızıya değişen renk tonlarında, koku, tat ve görünüşte olmalı, acılaşmış, kokuşmuş, küflenmiş olmamalı, yabancı bir tat ve koku içermemelidir [3,23].

Tarhananın Türk mutfağı açısından tarihinin Orta Asya'da 'kurut' adı verilen, çökelek, tuz, un, kurutulmuş et ile hazırlanan kışlık bir yiyeceğe dayandığı belirtilmektedir [24]. Orta Asya'dan Anadolu'ya gelişinin Türkler ve Moğollar sayesinde olduğu ve Osmanlı Devleti döneminde ise başka ülkelere ve kültürlere yayıldığı kabul edilmektedir [24,25]. Tarhana benzeri ürünler Mısır, Suriye ve Lübnan'da kishk, Irak'da kushuk, Yunanistan'da trahana ve Macaristan ve Finlandiya'da tahonya/talkuna olarak sıralanabilir [3,26].

Tarhana hamurunun içeriği ve hazırlanmasında standart bir prosedür olmayıp, yörelere özgü geleneksel tariflerle üretilmekte; besinsel ve kimyasal özellikleri de bu prosedürlere göre değişmektedir [3,27]. Tarhana ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalarda hazırlanan hamurun bileşimi farklılık göstermekle birlikte formülasyonda buğday unu, baklagil unları, yoğurt, domates ve/veya domates salçası, kapy biber, kuru soğan, tuz ve baharat karışımları kullanıldığı görülmektedir [10,28,29]. Bunun yanında tarhana hamurunda genellikle beyaz buğday unu kullanıldığı ve un-yoğurt oranının 1:1 ya da 1:0,5 olarak tercih edildiği de belirtilmiştir [4,30]. Fermantasyon süresi de çalışmalar arasında farklılık gösterse de bu bileşenlerle hazırlanan hamurun, laktik asit miktarı %1-1.5 olana kadar bekletilmesi olarak ifade edilmiştir [28].

Tarhana son dönemlerde ticari olarak üretilip satışa sunulsa da halen çoğunlukla geleneksel tariflerle ev ölçekli olarak üretilmektedir. Coşkun [24] tarafından yapılan çalışmada Türkiye’de hazırlanan farklı tarhana türleri derlenmiş ve Çizelge 2.1.’de gösterilmiştir. Bu tarhana çeşitleri kullanılan un tipine göre de ayrılabilir. Örneğin; Çorum, Amasya, Kahramanmaraş, Nevşehir, Gaziantep, Aydın, Afyon, Muğla gibi şehirlerde kabuğu uzaklaştırılmayan buğday kırmızı kullanılırken, birçok başka şehirde buğday unu ile tarhana hazırlanmaktadır [31]. Diğer yandan Tekirdağ, Edirne, Sinop, Tokat gibi bazı şehirlerde hamura süt katılırken, bazı Ege Bölgesi şehirlerinde hamura un yanında bazı kuru baklagiller eklenmekte ve bazı diğer şehirlerde de hamura ekşi maya katılmaktadır [31].

Çizelge 2.1. Türkiye’de üretilen farklı tarhana türleri [24].

Tarhana çeşidi	Bileşenler	Tüketim tipi
Ege tarhanası	Buğday unu, domates, kırmızı salçalık biber, kuru soğan, süzme yoğurt, baharatlar	Kurutularak
Göce tarhanası (Ankara, Muğla, Aydın, Maraş)	Buğday yarması, torba yoğurdu, nane	Kurutularak
Top tarhana (Isparta)	Dövülmüş buğday, dereotu, tuz, yoğurt, nane, maydonoz	Kurutularak
Trakya tarhanası	Un, yoğurt, kırmızı tarhanalık biber, kuru soğan, ekşi hamur, tuz, domates, salça ile bağlı olarak et suyu, tereyağı, peynir	Kurutularak
Ak tarhana (Kütahya)	Un, maya, yoğurt, kırmızıbiber, nane, tuz, acı biber, domates	Kurutularak
Gediz tarhanası	Kırmızıbiber, yoğurt, tuz, soğan, nane, un, ekşi maya	Kurutularak
Kıymalı tarhana (Trakya)	Kırmızı salçalık biber, domates, kuru soğan, süt, kıyma, tuz, peynir, yoğurt, ekmeç mayası, ekşi maya, un	Kurutularak
Beyşehir tarhanası	Göce, ayran, tereyağı, süt ve su	Taze ya da kurutulularak

Kiren tarhanası (Kastamonu, Kütahya, Bolu, Bursa, Zonguldak)	Un veya göçe, kızılıcık	Kurutularak
Göçmen tarhanası	Buğday unu, yoğurt, lor, domates, salça, yeşilbiber, yumurta, tuz, ekmeç mayası, baharatlar	Yaş ya da kurutulularak
Kastamonu tarhanası	Yeşilbiber, soğan, dereotu tohumu, doğranmamış salatalık, doğranmamış ayva, buğday unu, yoğurt, tuz	Yaş olarak
Sivas tarhanası	Domates, yeşilbiber, kırmızı salçalık biber, soğan, maydonoz, isteğe bağlı olarak reyhan, dereotu, kimyon, yumurta, nohut, maya, elma, armut, havuç, ayva	Kurutularak
Maraş tarhanası	Dövme, yoğurt, nane	Kurutularak
Şalgamlı tarhana	Maraş tarhanasının şalgamla pişirilmesi ve nohut eklenmesi	Kurutularak

Tarhana hamurunda bulunan gıda bileşenlerinin çeşitliliği tarhananın B vitaminleri, mineraller, organik asitler ve serbest amino asitler açısından zengin olmasını sağlamaktadır. Bu özellikleriyle tarhana yaşlıların ve çocukların beslenmesinde önemli ve sağlıklı bir gıda olarak değerlendirilmektedir [3,32]. Ayrıca, tarhana üretimi sırasında organik asitlerin oluşumu ve nem oranının %10'nun altına düşmesi bakteriyostatik etki göstermekte ve raf ömrünün uzamasını sağlamaktadır. Ancak, tarhana üretimi sırasında gıda patojenleri hayatta kaldıklarından, taze ıslak tarhananın üretimden sonraki ilk 7 gün içerisinde tüketilmemesi tavsiye edilmiştir [13]. Bunun yanı sıra tarhananın raf ömrü çeşide göre değişse de genel olarak 2-3 yıl bozulmadan kaldığı daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir [13].

2.2.1. Tarhananın Kimyasal Özellikleri

Geleneksel bir gıda olan tarhananın formülasyonu ve hammadde seçimi haneden haneye değişmektedir. Bunun sonucunda ise hazırlanan son ürünlerin kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinde farklılıklar görülebilmektedir. Bunun yanında fermantasyon prosesinin ardından uygulanan kurutma işleminin süresi ve sıcaklığı da son ürünün özelliklerini etkilemektedir. Daha önceki çalışmalarda tarhananın besinsel özellikleri ortalama % 10,2 nem, % 16 protein, % 60,9 karbonhidratlar, % 5,4 yağ, % 1 ham fiber, % 3,8 tuz, % 6,2 kül olarak belirlenmiştir [3,33].

Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerinden alınan tarhana örneklerinin illere göre bileşenler ve fermantasyon süresi açısından farklılıkları incelendiğinde rutubet miktarlarının ve pH değerlerinin iller arasında $p < 0,01$ düzeyinde, yağ miktarlarının ise $p < 0,05$ düzeyinde farklı olduğu belirlenmiştir [34]. Buna karşın protein ve kül miktarları arasındaki farkların ise $p < 0,01$ düzeyinde önemsiz olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar tarhanaya özgü lezzet oluşumunda etkili bir faktör olan asitliğin, kullanılan bileşenlerden etkilendiğini ve yoğurt ya da domates, biber, salça gibi asitliği artırıcı malzemeler kullanıldığında daha yüksek asitlik değerlerine ulaşıldığını işaret etmiştir [34].

Temiz [4], tarhana bileşiminde kullanılan yoğurt tipinin ve bileşime maya eklenmesinin pH ve asitlik üzerine istatistiksel olarak etkisi olduğu ortaya koymuş ve torba yoğurdu yerine işletme tipi yoğurt kullanılmasının ve bileşimde mayaya yer verilmemesinin asitlik açısından daha olumlu sonuçlar verdiğini belirlemiştir. Başka bir çalışmada ise inek sütünden üretilen yoğurtlarda fermente edilebilir şeker miktarı daha yüksek olduğundan (çoğunlukla laktoz) daha yüksek asitlik değerine ulaşılırken; hamur bileşiminde bitkisel süttten (soya sütü) hazırlanan yoğurt kullanılsa bile yoğurt oranı arttıkça asitlik miktarının arttığı belirlenmiştir [35].

Erbaş [10], 25°C’de 3 gün fermantasyon uyguladığı tarhana hamurlarının pH, titrasyon asitliği, laktik, pürivik, asetik, propiyonik ve sitrik asit ölçümlerinin fermantasyon süresinden belirgin şekilde etkilendiğini bulmuştur. Başka bir çalışmada ise aynı koşullarda hazırlanan tarhana hamurlarında fermantasyon süresinin asit içeriği ve pH

üzerine istatistiksel olarak belirgin şekilde etkili olduğu belirlenmiştir [36]. Fermantasyon süresi ve pH arasındaki ilişki değerlendirildiğinde de fermantasyon başlangıcında asit içeriğinin belirgin şekilde arttığı, daha sonra asit miktarı artışının yavaşladığı ve fermantasyon sonunda neredeyse sabit kaldığı tespit edilmiştir [36]. Ege Bölgesi'nde bulunan 8 farklı noktadan alınan tarhana örneklerinde yapılan pH ölçümleri en kısa fermantasyon süresine sahip (1 ve 3 gün) örneklerin pH değerinin diğer örneklerle göre daha yüksek olduğunu göstermiştir [37]. Bunun yanında en düşük pH değerine sahip 15 ve 21 günlük fermantasyon süresine sahip, her gün yeniden yoğurt eklenerek yoğurulan tarhana hamurlarında en düşük pH değerine ulaşılması fermente edilebilir substrat miktarı, fermantasyon süresi ve sıcaklığının oluşan laktik asit miktarında önemli olduğunu göstermektedir [37]. Ayrıca, Erbaş [36] fermantasyon süresinin kuru madde ve ham fiber miktarı üzerine etkisi olmadığını belirlemiştir. Ticari olarak hazırlanan tarhanaların ortalama besinsel içeriği Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir [32].

Çizelge 2.2. Ticari olarak hazırlanan tarhanaların ortalama içeriği [32].

Bileşen	Miktar
Nem (%)	6-10
Ham protein (%)	12-20
Ham kül (%)	1.5-4.0
Ham yağ(%)	1-9
Ham karbonhidrat (%)	40-75
Titrasyon asitliği (%)	1.5-2.5
pH	3.5-5.0

2.3. Bazı Geleneksel Tarhana Çeşitleri

2.3.1. Isparta Tarhanası

Isparta ilinde farklı geleneksel tariflerle hazırlanan tarhana çeşitleri bulunmaktadır [38]. Ancak bu çalışmada, bir göçe tarhanası çeşidi olan Top tarhana incelenmiştir. Top tarhana hazırlanması sırasında dövme buğday, dereotu ve tuz kaynatılarak pişirilir ve ardından soğumaya bırakılır. Soğuduktan sonra süzme ev yoğurdu ile nane ve maydanoz eklenerek yoğurulur. Yumurta boyutunda parçalar hazırlanarak bir bez üzerinde kurumaya bırakılır [24,38].

2.3.2. Maraş Tarhanası

Farklı tüketim şekillerine sahip olan Maraş tarhanası, çeşitli fonksiyonel ve fizyolojik özellikler içeren tahıl bazlı fermente geleneksel bir üründür. Maraş tarhanası, yapım sırasında uygulanan bazı farklı işlem basamakları ve tüketilme alışkanlıkları açısından ülkemizdeki diğer tarhana tiplerinden ayrılmaktadır. Besinsel açıdan sahip olduğu önemli özelliklerle yaygın olarak çorba tüketilen tarhana, Kahramanmaraş'ta normalden farklı şekilde kurumadan ya da yarı kurumuş olan firik halinde, kurumuş halde çerez olarak, çorba olarak, et suyuna ıslanarak, yağda kızartılarak, soğanla kavrulularak ve sac üzerinde kavrulularak tüketilebilir [39,40]. Bunların yanında coğrafi işaret tescili alan bir ürün olması sebebiyle, son yıllarda endüstriyel bir boyut ve kimlik kazanmıştır [41]. Maraş tarhanası için coğrafi işaret başvurusu çalışmaları 2009 yılında başlamış ve Maraş tarhanası Coğrafi İşaret Tescil Belgesi 2011 yılında verilmiştir [41]. Ayrıca Maraş tarhanasının Avrupa Birliği'nden (AB) coğrafi işaret tescili aldığı “Korunan menşe işaretleri ve korunan coğrafi işaretler (Maraş tarhanası (PGI)) kayıt defterine bir ismin girilmesine ilişkin 27 Kasım 2023 tarih ve (AB) 2023/2706 sayılı Komisyon Uygulama Tüzüğü” ile bildirilmiştir [42]

Maraş tarhanası üretiminde yoğurt ve dövme ismi verilen buğday yarması kullanılır [40]. Önce dövme su ile pişirilir, ardından kekik, çörek otu ve yoğurt eklenir. Bu sayede yoğurt içerisinde bulunan probiyotik bakteriler zarar görmemekte ve dövme ile gelen prebiyotikler ile birlikte aktivite göstermektedir [41,43]. Maraş tarhanasına kendine has özellik kazandıran faktörlerden birisi de kurutma sırasında yöredeki sazlık çubuklarla dokunmuş hasır, sergi türü çığ adı verilen sergiler kullanılmasıdır [40].

2.3.3. Bursa Tarhanası

Göçmen tarhanası ya da Muhacir tarhanası olarak isimlendirilen ve Balkan ülkelerinden göçen Türkler tarafından geleneksel olarak hazırlanan tarhana çeşidinin formülasyonu Balıkesir, Bursa ve Trakya yörelerinde farklı şekillerde hazırlanmaktadır [44]. Bu tarhana çeşidi kurutulularak toz formda saklanabildiği gibi genellikle fermantasyon sonunda yaş haliyle tüketilir. Bileşiminde buğday unu ve yoğurt dışında; süt, lor peyniri, domates, salça, yeşilbiber, yumurta, tuz, ekmek mayası ve çeşitli baharatlar yer alabilmektedir

[24,44]. Yine kullanılan geleneksel reçeteye göre, elde edilen hamur 10-15 gün süreyle fermantasyona bırakılır ve süreç boyunca 2 günde bir yoğurulur [44].

2.3.4. Kastamonu Tarhanası

Kastamonu iline ait geleneksel tarhana çeşidi olan Yaş tarhananın diğer çeşitlerden en önemli farkı, fermantasyon prosesi sonunda kurutma işlemi uygulanmadan cam kavanozlarda saklanmasıdır. Yaş tarhana hazırlanmasında kullanılan malzemeler buğday unu, yoğurt, Tarhana otu (*Echiophora sibthorpiana*), Darak otu (tohumları üzerindeyken kurutulmuş dereotu sapları (*Anethum graveolens* L.)), çeşitli sebzeler, otlar ve baharatlardır [45–47]. Kastamonu Yaş tarhanasının formülasyonunda yer alan sebzeler ve baharatlar değişebilir de, mutlaka Darak otu kullanılmaktadır [46]. Tarhana üretimi sırasında ise sebzeler yıkanıp temizlendikten sonra yoğurt ile karıştırılarak 3-4 gün fermantasyona bırakılır ve süreç sonunda süzülüp un eklenerek hamur hazırlanır. Bu hamur da her gün karıştırılarak 1 hafta daha fermantasyona bırakılır [47].

2.3.5. Uşak Tarhanası

Uşak tarhanası, un tarhanaları sınıfında yer alır ve 21 günlük fermantasyon süresine sahiptir. Uşak tarhanasının taşınması gereken özellikler Türk Patent Enstitüsü'nün 2017 yılında verdiği Coğrafi İşaret Belgesi ile belirlenmiştir [48]. Buna göre Uşak tarhanası, iklim koşulları nedeniyle fermantasyonun daha düşük sıcaklıkta ve daha uzun sürede gerçekleşmesi sonucu fermantasyonda görev alan mikroorganizma çeşitliliğinin daha fazla olması ve formülasyonda diğer bölgelere kıyasla daha yüksek miktarda biber kullanılması özellikleriyle diğer tarhana çeşitlerinden ayrılmaktadır [48].

Uşak tarhanası fermantasyonunun ortalama 22°C'de gerçekleşmesi sebebiyle LAB ve mayaların gelişimi daha yavaş olmaktadır. Bunların yanında mikroflorada *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Levilactobacillus brevis* suşları hakimken, ayırıcı olarak *Companilactobacillus alimentarius* suşu ve maya olarak da *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia kudriavzevii* yer almaktadır [48]. İçerik açısından bir diğer ayırıcı özellik ise Uşak tarhanasında %42 oranında sebze kullanılması ve bu sebzelerin pişirilmeden hamura eklenmesidir [48].

Uşak tarhanası üretiminde tam buğday unu, %3.8'den fazla yağ içeren tam yağlı yoğurt, tarhanalık kırmızıbiber, soğan, salçalık domates ve nane kullanılmaktadır [48]. Bu sebzeler ve kuru nane kıyıldıktan sonra tam yağlı yoğurt ile karıştırıldıktan sonra bir gün fermente edilir ve tarhana ezesi elde edilir. Ertesi günü ekşi hamur ve buğday unu eklenerek yoğurulur ve 21 gün fermantasyona bırakılır. Başlangıçta pH değeri 4.5-5.0 aralığındayken fermantasyon sonunda 3.70'e kadar düşer ve titrasyon asitliği değeri 10-35 aralığında olmalıdır [48].

2.4. Tarhana Fermantasyonu

Homo- ve heterofermantatif LAB ile mayaların birlikte gerçekleştirdiği fermantasyon ile hazırlanan tarhananın besinsel özellikleri, aroma ve flavoru bu mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu oluşmaktadır. Gıda zincirleri gibi besinsel etkileşimler birçok grup organizmanın sınırlı kaynaklar üzerinde bile hayatta kalmasını sağlamakta ve doğal döngüleri yürüterek komünitenin çeşitliliğini arttırmaktadır [49]. Tarhana hamuru fermantasyonu spontan fermantasyon yolu ile gerçekleşmektedir. Bu durumda fermantasyon süreci hammaddelerde bulunan mikroorganizma çeşitliliği ve bunların ilk yükünden etkilenmektedir. Bu sebeple bazı yörelerde tarhanaların üretiminde bir önceki seneden kalan tarhana hamura eklenerek fermantasyon kontrol edilmeye çalışılmaktadır.

Tarhana hamuru mikrobiyotasında baskın olarak yer alan LAB; *Lactiplantibacillus plantarum*, *Companilactobacillus alimentarius*, *Companilactobacillus farciminis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* ve *Weissella cibaria* ve mayalar da *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Candida glabrata* ve *Pichia kudriavzevii* olarak belirlenmiştir [21]. Fermantasyon sırasında mikroorganizmaların proteolitik, lipolitik ve amilolitik enzim aktiviteleri sonucu oluşan metabolitler meydana gelen gıda ürünün özelliklerini belirlemektedir. Fermantasyon prosesinin başlangıcında tarhana hamurunda yer alan yoğurt ve sebzeler sebebiyle önemli miktarda organik asit bulunmakla birlikte, tarhananın flavor ve lezzeti fermantasyon sonucu oluşan organik asitler, serbest amino asitler ve karbonil bileşiklerinden etkilenmektedir [10,21].

Settanni [50], buğday unu, kırmızıbiber, soğan, domates, çeşitli baharatlar ve ekmekek mayası kullanılarak hazırlanan tarhana hamurlarının ve 30°C ve 40°C'de 8 gün fermantasyonu sonunda 40°C'de fermente edilen hamurda *Pediococcus acidilactici* varlığının laktobasillere baskın olduğunu ve 30°C'de fermente edilen hamurda ise *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Levilactobacillus brevis* suşlarının diğer türlere baskın olduğu belirlemiştir. Başka bir çalışmada ise farklı bölgelerden alınan tarhana hamurlarında yer alan homofermantatif kokların, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus thermophilus* ve *Enterococcus faecium*; homofermantatif rodların, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lacticaseibacillus casei* ve *Lactiplantibacillus plantarum* ve heterofermantatif rodların, *Limosilactobacillus fermentum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc citreum* ve *Weissella cibaria* suşları olduğu saptanmıştır [37]. Mikroorganizmaların tanımlanması sonucunda ise tarhanada yer alan LAB çeşitliliğinin hammadde, fermantasyon süresi ve üretimde kullanılan teknikten etkilendiği belirlenmiştir [37].

Ev ölçekli ve endüstriyel olarak üretilen 8 tarhana örneğinden 5 farklı fermantasyon zamanında numune alınarak LAB çeşitliliğinin araştırılması sırasında izole edilen 37 grup mikroorganizmadan 16 tanesi *Lactiplantibacillus plantarum*, 6 tanesi *Levilactobacillus brevis*, 3 tanesi *Lactococcus lactis*, 3 tanesi *Levilactobacillus namurensis*, 2 tanesi *Companilactobacillus farciminis*, 1 tanesi *Leuconostoc mesenteroides*, 1 tanesi *Pediococcus acidilactici*, 1 tanesi *Lactiplantibacillus fabifermentans*, 1 tanesi *Companilactobacillus alimentarius*, 1 tanesi *Lacticaseibacillus casei*, 1 tanesi *Companilactobacillus mindensis* ve 1 tanesi de *Companilactobacillus paralimentarius* olarak tanımlanmıştır [16]. Ev tipi ve ticari olarak üretilen tarhana mikrobiyotasının karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise izole edilen LAB'ı *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus durans*, *Pediococcus* spp., *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lacticaseibacillus paracasei* olarak tanımlanırken, mayalar ise *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia mexicana* (current name *Yamadazyma mexicana*), *Pichia angusta* (current name, *Ogataea angusta*), *Debaryomyces hansenii*, *Candida sorboxylosa*, *Candida fluviatilis* ve *Kluyveromyces marxianus* olarak belirlenmiştir [51].

Tarhana mikrobiyotasının yedi günlük fermantasyon sürecinde değişiminin incelendiği başka bir çalışmada fermantasyon süresi boyunca *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ve *Lactiplantibacillus plantarum* florada yer alırken, fermantasyon başlangıcında ortamda bulunan *Lactobacillus acidophilus* daha sonraki günlerde tespit edilememiş, *Levilactobacillus brevis* suşları ise sadece fermantasyonun birinci ve ikinci günlerinde bulunmuştur [52]. *Pediococcus* spp. suşları ise fermantasyonun üçüncü gününde ortaya çıkmış ve fermantasyon sonuna kadar ortamda yer almıştır. Fermantasyonun son günü olan yedinci günde ise *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* tespit edilmiştir. Maya florasının incelenmesi sonucunda ise fermantasyonun sıfırncı gününden bitimine kadar *Kluyveromyces marxianus* ve *Yarrowia lipolytica* ortamda tespit edilmiştir. Ayrıca fermantasyonun beşinci gününden itibaren *Saccharomyces cerevisiae* tarhana mikroflorasında yer almaktadır. Bunların yanında fermantasyon süreci boyunca *Pichia membranifaciens*, *Pichia mexicana* (current name *Yamadazyma mexicana*), *Pichia angusta* (current name *Ogataea angusta*), *Debaryomyces hansenii*, *Candida sorboxylosa*, *Candida fluviatilis* ve *Geotrichum terrestre* tespit edilmiştir [52].

Tarhana benzeri bir ürün olan ve Yunanistan’da üretilen “trahana” fermentasyonunda yer alan LAB’nin *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus acidophilus* olduğu belirlenmiştir [53].

İran’a ait tarhana benzeri bir ürün olan “tarkhineh” üzerine yapılan bir çalışmada buğday harcı, ‘doogh’ (İran kökenli yoğurttan yapılmış fermente içecek), turp, maya ve tuz eklenerek hazırlanan hamur mikrobiyotasında *Liquorilactobacillus nagelii*, *Loigolactobacillus bifermentans*, *Leuconostoc cremoris*, *Fructobacillus fructosus*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus intestinalis*, *Ligilactobacillus agilis* ve *Ligilactobacillus acidipiscis* suşları tanımlanırken; izolatların yaklaşık %1’de tanımlanamamıştır [54].

Tahıl fermantasyonları en iyi şekilde geleneksel ekşi hamur fermantasyonu ile temsil edilmektedir ve bu proses her zaman LAB ve mayalar tarafından gerçekleştirilir [14]. Bu proses sırasında LAB aktivitesi sonucu asitlik oluşurken, mayaların ve laktik asit bakterilerinin aktiviteleri sonucu gaz oluşturma, flavor ve tekstür oluşumu gibi özellikler kazandırılır. Bu açılardan değerlendirildiğinde tarhana hamuru fermantasyonuna benzeyen ekşi hamur fermantasyonu mikrobiyotası ayrıntılı olarak daha önceki çalışmalarda incelenmiştir. [55].

Hammes [14], ekşi hamur fermantasyonunda görevli 46 LAB türü tespit etmiş ve bunların 30 tanesinin *Lactobacillus* türü olduğunu belirlemiştir. Ayrıca, tespit edilen mayalardan fermente edici özellikte olmayanların bile yüksek sayıda bulduklarında aroma gelişimine katkıda bulunduğu ifade edilmiştir [14]. Geleneksel olarak üretilen ekşi hamurlar incelendiğinde mikrobiyota, un ve çevresel etkenlerden etkilense bile en önemli maya türü olarak *Candida humilis* belirlenmiştir [14].

Corsetti [56], 25 farklı ekşi hamur örneğinin mikrobiyotasının incelenmesi sonucunda LAB:maya oranının farklı hamurlar arasında 1:1000–1:10 arasında değiştiğini görmüştür. Ayrıca LAB profili incelendiğinde izolatların %30'u *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, %20'si *Companilactobacillus alimentarius*, %14'ü *Levilactobacillus brevis*, %12'si *Leuconostoc citreum*, %7'si *Lactiplantibacillus plantarum*, % 6'sı *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, %4'ü *Limosilactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus acidophilus*, %2'si *Weissella confusa* ve %1'i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* olarak tanımlanırken; mikrobiyotada *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus* (current name *Kazachstania exigua*) ve *Candida krusei* (current name *Pichia kudriavzevii*) tespit edilmiştir [56].

2.4.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri geleneksel olarak gıda ve yem fermantasyonlarıyla ilişkilendirilmiş olan ve genellikle insan sağlığına yararlı olarak kabul edilen türlerden oluşmaktadır. Orla-Jensen'in 1919 yılında hücre morfolojisi, glukoz fermantasyon şekli, büyüme sıcaklık aralıkları ve şeker kullanma yolları kriterlerine göre *Lactobacillus*, *Leuconostoc*,

Pediococcus ve *Streptococcus* cinsleri olarak belirlediği LAB, modern moleküler biyoteknoloji teknikleriyle genişlemiştir.

Laktik asit bakterileri tipik olarak mezofilik, Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmayan, mutlak fermentatif, aerotolerant kok ya da çubuk şeklinde, zor gelişen, sitokramları olmayan, aside dayanıklı, G+C oranı %50 mol'den düşük olan (*Bifidobacteria* hariç) ve karbonhidrat metabolizmasının ana ürünü laktik asit olan bakteriler grubudur [57–59]. LAB genellikle süt, et, içecekler, sebzeler gibi besin öğeleri açısından zengin gıdalarda bulunmakla birlikte memelilerin ağız, bağırsak ve vajina normal mikroflorasından da izole edilmişlerdir. Wright [57], LAB cinslerinin *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetrageonococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Fructobacillus*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* ve *Streptococcus*'dan oluştuğunu belirtmiştir.

Hücre için gerekli enerji üretimini substrat düzeyinde fosforilasyon ile sağlamak zorunda olan LAB, heksoz metabolizması sırasında homofermentatif ya da heterofermentatif izyollarından birini tercih etmektedir. *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus* cinsleri ile *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Limosilactobacillus reuteri* türleri zorunlu heterofermentatiftir [57]. Pentozları metabolize edemeyen zorunlu homofermentatif türler ise *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* ve *Ligilactobacillus salivarius*'dur [57]. Homofermentatif olarak heksozları ve aynı zamanda heterofermentatif olarak da pentozları kullanabilen fakültatif heterofermentatif türler ise *Lacticaseibacillus casei*, *Latilactobacillus curvatus*, *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Latilactobacillus sakei*'dir [57]. Tarhana ve ekşi hamur gibi tahıl fermantasyonu proseslerinden izole edilen LAB türlerinin fermantasyon yolları Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.

Fermantasyon prosesini yöneterek ve hızlandırarak fermente gıdaların üretilmesinde görev alan ve en az bir mikroorganizmanın birçok hücresinden oluşan mikrobiyal kütle starter kültür olarak adlandırılmaktadır. Starter kültür olarak görev yapan mikroorganizmaların birçoğunu bir grup LAB oluşturmaktadır. LAB'nin fermantasyon

prosesindeki işlevleri, temel olarak laktik asit olmak üzere organik asit üreterek ham maddelerin hızlı bir şekilde asitlenmesidir. Bunun yanı sıra bu bakterilerin ürettiği asetik asit, etanol, aroma bileşikleri, bakteriyosinler, ekzopolisakkaritler ve çeşitli enzimler de raf ömrünü uzatıp mikrobiyal güvenliği sağlamak, tekstürü geliştirmek ve duyuşal profile katkıda bulunmak suretiyle fermantasyon işlemine katkı sağlamaktadır [15,19,60]. Ayrıca LAB yüksek-zincirli karbonhidratların ve bazı sindirilemeyen poli- ve oligosakkaritlerin seviyelerini düşürerek gıdaların daha kolay sindirilebilmesini sağlamaktadır. Bunun yanı sıra demir, çinko ve kalsiyum gibi mikro besin elementlerinin alınabilirliğini artırmaktadır [15].

Tarhananın mikrobiyolojik stabilitesi de LAB varlığından etkilenmektedir. LAB'ı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite ile fermente ürünlerin mikrobiyolojik kontaminasyonunun da önüne geçmektedir. LAB'nin ürettiği antimikrobiyallar laktik asit, asetik asit, formik asit, fenilalanik asit ve kaproik asit gibi organik asitler, karbondioksit, hidrojen peroksit, diasetil, etanol, bakteriyosinler ve reuterin sayılabilir [60].

Çizelge 2.3. Tahıl fermantasyonlarının izole edilen bazı LAB türlerinin fermantasyon yolları [61].

Zorunlu heterofermentatif	Fakültatif heterofermentatif	Zorunlu homofermentatif
<i>Levilactobacillus acidifarinae</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	<i>Companilactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>	<i>Companilactobacillus farciminis</i>
<i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	<i>Companilactobacillus mindensis</i>
<i>Limosilactobacillus frumenti</i>		<i>Lactobacillus crispatus</i>

Lentilactobacillus hilgardii

Lactobacillus johnsonii

Limosilactobacillus panis

Lactobacillus amylolyticus

Limosilactobacillus pontis

Limosilactobacillus reuteri

Furfurilactobacillus rossiae

Fructilactobacillus

sanfranciscensis

Furfurilactobacillus siliginis

Levilactobacillus spicheri

Levilactobacillus zymae

Tarhanadan izole edilen LAB cinslerinden olan *Lactococcus* için bitkiler doğal ortamlardan biridir. Bu ortamlarda yaşayabilmek için *Lactococcus* cinsi bitkilerde en yüksek oranda bulunan selüloz, sükröz ve nişasta gibi bitki şekerlerini indirgemek ve bunları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmak zorundadır [62].

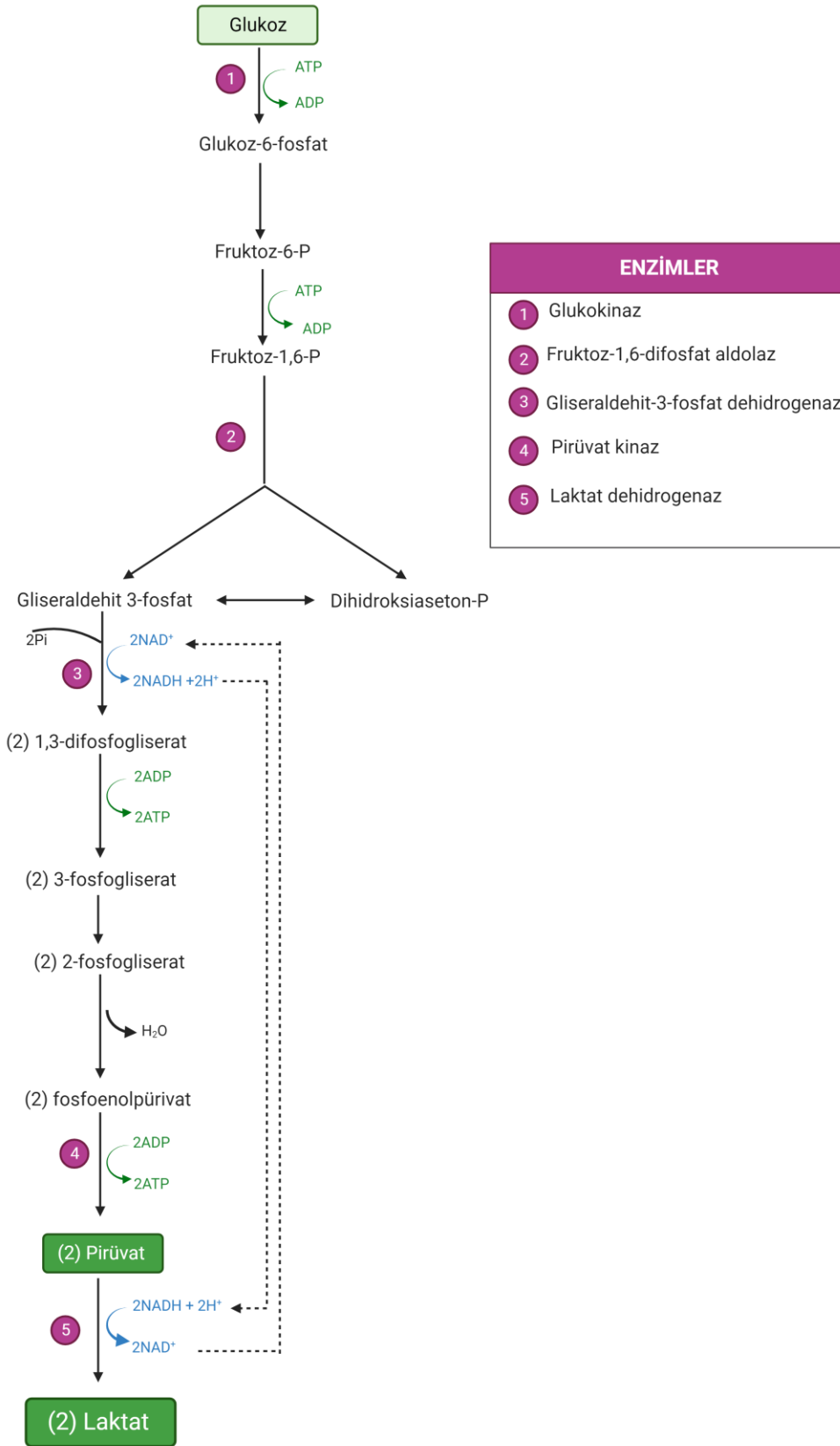
Çoğunlukla *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* cinsleri ile birlikte bitki fermantasyonu proseslerinden izole edilen *Pediococcus* spp., türlerinden *Pediococcus acidilactici* ve *Pediococcus pentosaceus* olmak üzere yalnızca iki tanesi süt ürünleriyle ilişkili olarak bulunmuştur [63]. Glukoz ve laktozu fermente edebilen bu türlerden *Pediococcus pentosaceus* metabolizması sonucu eşmolar miktarlarda laktat ve asetat oluşturmaktadır.

Bitkilerde doğal olarak bulunan *Leuconostoc* cinsi bakterilerin de iki türü, *Leuconostoc pseudomesenteroides* ve *Leuconostoc mesenteroides* türleri sütte tespit edilmiştir [64]. Sütte gelişme gösterebilmek için, ortamda proteolitik aktivitesi yüksek başka mikroorganizmaların peptit metabolitleri üretmesine ihtiyaç duyan bu bakteriler; metabolizmaları sonucu asetaldehit, asetat ve laktat üretebilirler [64].

2.4.1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Metabolizması

Tüm LAB heksozlardan laktik asit üretebilmektedir ve ETS zincirine bağlı fonksiyonel bir heme ve fonksiyonel bir Krebs döngüsüne sahip olmadıklarından substratları homo- ve heterofermentatif olarak iki yolla kullanmaktadır [1]. Bakterilerin ilk aşama olarak heksozları hücreye taşınması ve bunların fosforilasyonu 2 farklı yolla gerçekleşebilir. Bunlardan ilki serbest şekerlerin sitoplazmaya taşınması ve ATP'ye bağlı bir glukokinaz (permeaz sistemi) ile fosforilasyonu iken diğer yol ise fosfoenolpirüvatın fosforil donörü olduğu fosfoenolpirüvat:fosfotransferaz sistemi (PTS) kullanılmasıdır [65].

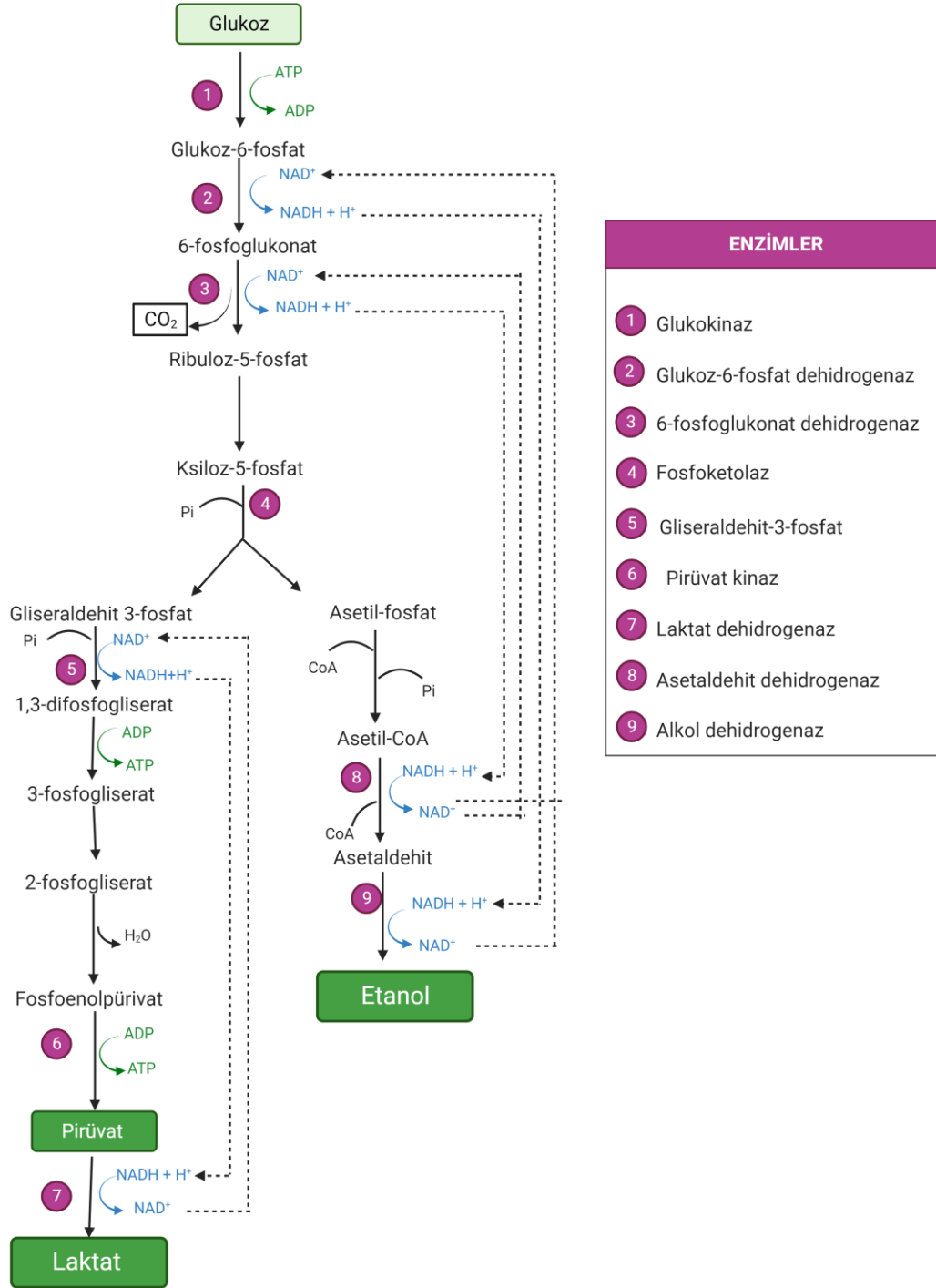
Heksoz fermentasyonunda kullanılan ana izyollarından biri olan homolaktik fermantasyon Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) izyolu (glikoliz) ile gerçekleşmektedir. Glukozdan oluşan fruktoz-1,6-difosfat molekülü, fruktoz-1,6-difosfat aldolaz enzimi ile dihidroksiasetonfosfat (DHAP) ve gliseraldehit-3-fosfat (GAP)'a ayrılmaktadır (Şekil 2.2). Hem oluşan hem de DHAP molekülünün GAP molekülünü dönüşmesiyle elde edilen GAP molekülleri substrat seviyesinde fosforilasyonun gerçekleştiği bir dizi metabolik aktivite sonucu pirüvata dönüşmektedir [59,66]. Normal koşullar altında, NAD⁺'a bağlı bir laktat dehidrogenaz enzimi ile pirüvat laktik aside indirgenmektedir. Böylece glikolitik yolun önceki basamaklarında oluşan NADH molekülleri yeniden okside olmaktadır. Bu metabolizma sırasında son ürün olarak yalnızca laktik asit üretilmekte ve kullanılan her mol glukoz için 2 mol ATP üretilmektedir.



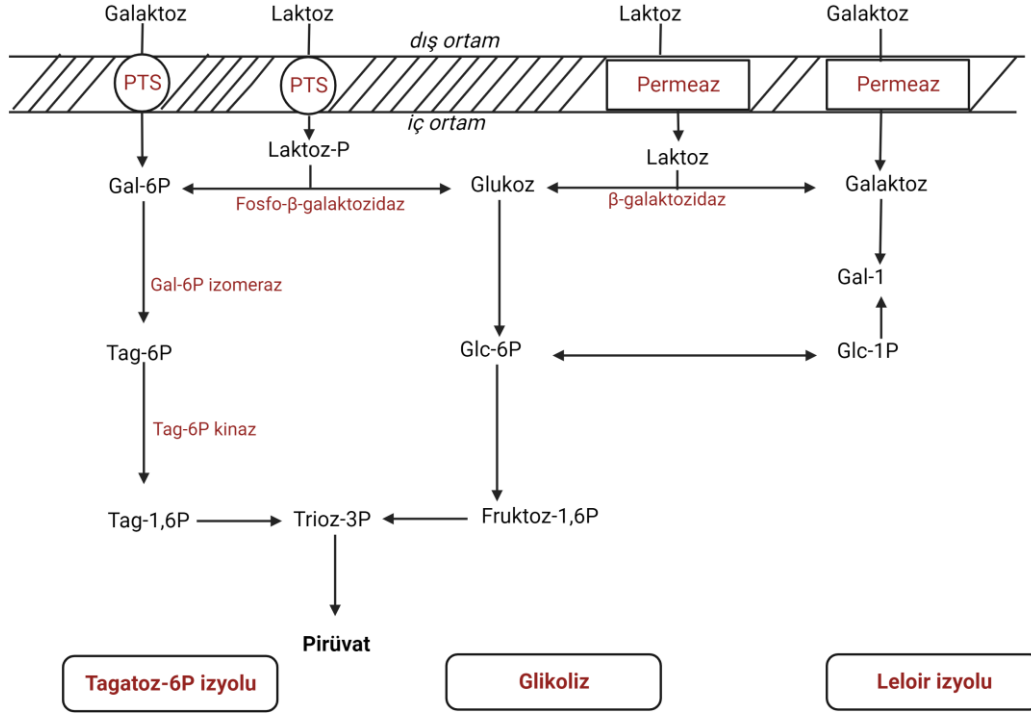
Şekil 2.2. Glukozun homolaktik fermantasyon ile kullanılması (glikoliz, Embden-Meyerhof-Parnas izyolu) [59].

Heksoz fermentasyonu sırasında kullanılan diğ er ana izyolu olan heterolaktik fermantasyon ise 6-fosfoglukonat/fosfoketolaz (6-PG/PK) izyolu ile gerçekleşmektedir. 6-PG/PK izyolu sırasında glukozdan çeşitli dehidrogenasyon adımları ile elde edilen 6-fosfoglukonat dekarboksilasyona uğramaktadır [59]. Dekarboksilasyon adımı sonucu oluşan pentoz-5-fosfat, fosfoketolaz enzimi ile GAP ve asetil fosfata dönüşmektedir. GAP molekülünden de glikolitik izyolu ile aynı şekilde laktik asit oluşmaktadır (Şekil 2.3). Ortamda başka bir elektron alıcısı olmadığı durumlarda asetil fosfat molekülü, asetil CoA ve asetaldehit aracılığı ile etanole indirgenmektedir [59,66]. Heterofermentatif yolda ara ürün olarak üretilen asetil fosfat etanole indirgenirse tüketilen her mol glukoz için 1 ATP üretilmektedir [57].

Mannoz, galaktoz ve fruktoz gibi glukoz dışındaki heksozlar birçok LAB tarafından fermente edilebilmektedir. Glukoz dışındaki heksoz molekülleri de çeşitli izomerizasyon ve/veya fosforilasyon aşamalarından sonra glukoz-6-fosfat ya da fruktoz-6-fosfat olarak bu izyollarından birine girmektedir [59]. Ancak, galaktoz metabolizması sırasında, galaktozun hücreye alınması sırasında PTS sistemi kullanılmakta ve PTS tarafından oluşturulan galaktoz-6-fosfat molekülü, tagatoz-6-fosfat izyolu ile metabolize edilmektedir [59]. Şekil 2.4’de görüldüğü gibi tagatoz izyolu GAP seviyesinde glikoliz izyolunu takip etmektedir [67]. Bunun yanında, galaktozu fermente edebilen birçok LAB türü galaktozu taşımak için permeazları kullanır ve galaktoz molekülünü glukoz-6-fosfata dönüştürmek için Leloir izyolunu takip eder [57,59].



Şekil 2.3. Glikozun heterolaktik fermantasyon ile kullanılması (6-fosfoglukonat/fosfoketolaz (6-PG/PK) izyolu) [59].



Şekil 2.4. Laktik asit bakterilerinde galaktoz metabolizması [67].

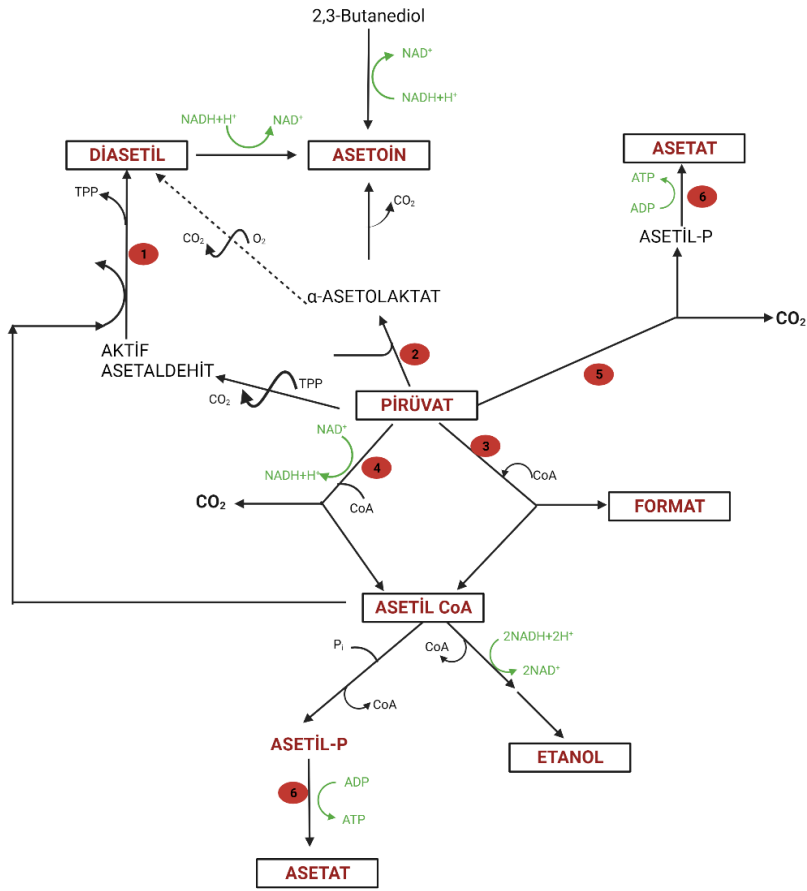
Pentozların LAB tarafından kullanılması sırasında genellikle spesifik permeazlar şekerleri hücre içine taşımak için kullanılır. Hücre içine alınan pentozlar, epimerazlar ya da izomerazlar ile fosforlanarak ribuloz-5-fosfat ya da ksiloz-5-fosfata dönüştürülür. Daha sonra Şekil 2.5’de görüldüğü gibi bu moleküller 6-PG/PK izyolunun son kısmı ile metabolize edilir [59]. 6-PG/PK izyolu heterolaktik LAB tarafından kullanılsa da, grup 1 laktobasiller dışında kalan tüm LAB’i pentozu metabolize edebilirler [59]. Pentozların heterolaktik fermentasyonu sırasında karbondioksit ve etanol oluşmamaktadır. Bu izyolunda asetil fosfat molekülünün etanole dönüşmesi gerekmediğinden; asetil fosfat, asetil kinaz enzimi tarafından substrat-seviyesinde fosforilasyonda kullanılarak asetat ve ATP üretilmektedir. Bu durumda son ürün olarak laktik ve asetik asit oluşmaktadır.

Fermentasyon izyolları sırasında önemli bir rolü olan pirüvat, laktik asit oluşumunda elektron akseptörü olarak görev alır ve hücre içindeki yükseltgenme-indirgenme dengesini kontrol eder. Ancak, LAB türüne bağlı olarak ve bazı büyüme koşulları altında

pirüvatın kullanılma yolları değişebilir ve laktik asitten farklı maddeler oluşabilir. Bu izyollarından bir tanesi olan diasetil/asetoin izyolu birçok LAB'de görülebilir. Bu izyolu, hücrede NAD^+ rejenarasyonu ihtiyacı kadar pirüvat fazlalığı olması gerekirken, gelişme ortamında fermente olan karbonhidrattan başka bir pirüvat kaynağı bulunması ya da ortamda elektron alıcısı olarak başka bir bileşik olması nedeniyle, fermantasyon sonucu oluşan pirüvatın fazlalık olarak kalması sonucu meydana gelir [59]. Sütte sitratın parçalanması sonucu oluşan pirüvatın bu görevi gerçekleştirmesi için, sitrat öncelikle sitrat permeaz enzimi ile hücreye taşınmaktadır ve sitrat liyaz enzimi ile okzaloasetat ve asetata dönüşmektedir. Oluşan okzaloasetat da okzaloasetat dekarboksilaz enzimi ile pirüvat ve karbondioksite dönüşmektedir. Ardından Şekil 2.5'de görüldüğü gibi 2 alternatif yoldan biri kullanılarak pirüvat diasetile dönüşmektedir.

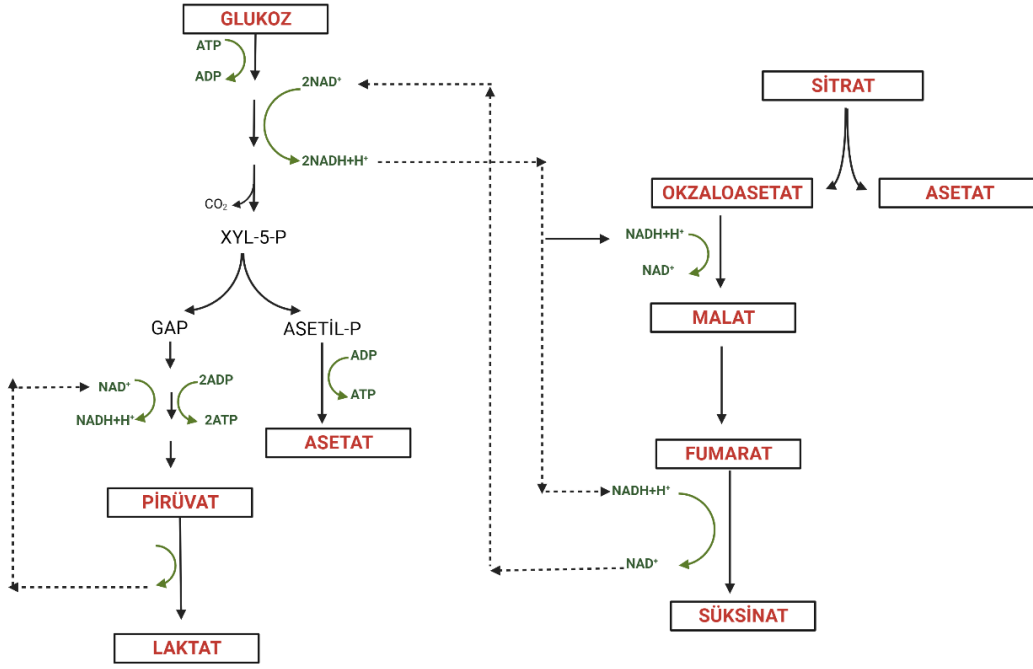
Alternatif izyollarından biri olan format-liyaz sisteminde pirüvat-format liyaz enzimi, pirüvat ve CoA reaksiyonunu katalizleyerek format asetil CoA oluşturur. Oluşan asetil CoA elektron alıcı olarak kullanılarak etanol oluşumunda ya da asetil fosfat aracılığıyla substrat seviyesinde fosforilasyonda öncü olarak kullanılır (Şekil 2.5). Bu izyolu sınırlı substrat varlığında ve anaerobik koşullarda bazı LAB'inde homolaktik fermantasyondan heterolaktik fermantasyona dönüşme sebep olarak karışık asit fermantasyonuyla sonuçlanır [59]. İzyolunun son ürünleri laktat, asetat, format ve etanoldür.

Pirüvat oksidaz izyolunda, oksijen varlığı altında hücre pirüvatı, pirüvat oksidaz ile asetat ve karbondioksite dönüştürürken hidrojen peroksit oluşturmaktadır (Şekil 2.5). *Lactiplantibacillus plantarum* suşlarında pirüvat oksidaz aerobik solunumda görev almakta ve metabolizma sonucunda önemli miktarda asetik asit meydana gelmektedir [57]. Özellikle laktokoklarda fonksiyonel durumda olan pirüvat dehidrogenaz izyolunda ise pirüvat, asetil CoA'ya okside olurken karbondioksit ve NADH oluşmakta ve bu izyolunun son ürünü genelde asetat olmaktadır (Şekil 2.5) [57].



Şekil 2.5. Pirüvatın alternatif kullanım izyolları, noktalı çizgiler enzimatik olmayan reaksiyonları göstermektedir, enzimler sırasıyla: 1:diasetil sentez, 2:asetolaktat sentez, 3:pirüvat format liyaz, 4:pirüvat dehidrogenaz, 5:pirüvat oksidaz, 6:asetat kinaz [59].

LAB arasında oksijenin harici elektron alıcı olarak görev almasını sağlayan NADH oksidaz enzimleri de yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enzimler genellikle oksijen varlığında uyarılmaktadır. Elektron transferini yöneten enzimin varlığına göre reaksiyonun son ürünleri NAD⁺ ve hidrojen peroksit ya da NAD⁺ olmaktadır [59]. LAB metabolizmasında oksijen dışında harici elektron alıcı olarak görev alan organik bileşikler de bulunmaktadır. Bu organik moleküllerden birisi olan sitrat, doğrudan elektron alıcı olarak kullanılmaz, ancak başka elektron alıcı moleküllere öncüdür. İlk adım olarak sitrat liyaz enzimi ile sitrattan asetat ve okzaloasetat oluşurken, farklı LAB'de bu ürünlerin farklı şekillerde metabolize edildiği görülmektedir [59]. Örneğin; *Lactiplantibacillus plantarum*'da mannitolün anaerobik olarak fermente edilmesi sırasında okzaloasetatan süksinik asit oluşmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Heterofermentatif laktobasillerde glukoz ve sitrattan süksinik asit üretimi [59].

2.4.2. Mayalar

Mayalar, eşeysiz büyümesi çoğunlukla tomurcuklanma veya bölünmeden kaynaklanan ve üreme durumlarını meyve veren bir gövde içinde veya üzerinde oluşturmayan mantarlar olarak tanımlanabilir [68]. Mayalar tek hücreli, küresel, oval, eliptik, limon, silindirik ya da ipliksi görünümde, 2-8 mikron çapında, optimum gelişme pH'ları 4,5-5 ve optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C arasında olan mikroorganizmalardır.

Gıda ürünlerinin saklanması, korunması ve duyu özelliklerinin zenginleştirilmesi için yüzyıllardır kullanılan fermantasyon tekniğinde görev alan mikroorganizmalardan olan mayalar çoğunlukla tek hücreli organizmalar halinde bulunan, ökaryotik fungusların heterojen bir grubudur. Farklı mayaların belirli şekerleri kullanabilmeleri ve bunları kullanma iz yolları moleküler tekniklerin ortaya çıktığı döneme kadar bir sınıflandırma yöntemi olarak kullanılmıştır. Bu iz yolları farklı mayalar arasında büyük oranda korunmuş olsa da, bu metabolizmaların regülasyonunda görülen farklılıklar türler arasında önemli değişimler gösterebilmektedir.

2.4.2.1. Mayaların Metabolizması

Mayalar tüm enerji ve karbon kaynağı ihtiyaçlarını organik bileşenlerden elde eden kemohetrotrofik canlılardır. Bilinen bütün mayalar şekerleri kullanabilirken; alkoller, organik asitler, amino asitler, n-alkanlar ve lipidler gibi çok çeşitli karbon kaynakları üzerinde gelişebilirler [69,70].

Maya hücrelerinin karbonhidrat metabolizması sırasında çeşitli düzenleyici mekanizmalar görülmektedir. Bunlardan Crabtree etkisi aerobik koşullar altında solunum yerine şekerlerin alkolik fermantasyonunun gerçekleşmesidir [71,72]. Pasteur etkisi ise maya hücresinin yüksek şeker konsantrasyonlarında ve aerobik koşullar altında solunum gerçekleştirirken, glukoz miktarı önemli olmaksızın oksijensiz ortamda fermantasyona dönmesidir [72,73]. Diğer bir düzenleyici mekanizma olan Custers etkisi ise anaerobisis ile fermentasyonun inhibe olmasıdır [74]. Kluver etkisi de hücrenin bazı disakkaritleri anerobik olarak metabolize etme yeteneği yokken; bu disakkaritleri oluşturan monosakkaritleri aynı koşullarda kullanabilmesidir [75].

Karbonhidrat metabolizmasının ilk adımı olan şekerlerin hücreye alınması sırasında plazma membranında yer alan taşıyıcı proteinler tamamlayıcı rol oynamaktadır. Heksozların hücre içine taşınması sırasında *Saccharomyces cerevisiae*'da kolaylaştırılmış diffüzyon görev alırken, farklı maya türlerinde farklı sistemler görülebilmektedir. Disakkaritlerin metabolizması sırasında ise maya türüne ve şekerin doğasına bağlı olarak disakkaritin hidrolizi hücre membranının dışında, periplazmik boşlukta ya da hücre içinde gerçekleşebilir [70].

Hücre içine alınan heksozların glikolitik yola girebilmesi için ilk adım olarak glukoz, fruktoz ve mannozların heksokinazlar tarafından fosforilasyona uğraması gerekmektedir. Ardından fosfoglukoz izomeraz, iki glukoz ve früktoz-6 fosfatı birbirine dönüştürür. Fosfofruktozkinaz enzimi de fruktoz-6-fosfata ikinci bir fosfat grubu ekleyerek fruktoz-1,6-bifosfat oluşturur. Aldolaz enzimi ile fruktoz-1,6-bifosfat molekülü açılarak dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat oluşur. Bu moleküller trioz fosfat izomeraz enzimi ile birbirlerine dönüştürülebilir. Oluşan gliseraldehit-3-fosfat, NAD⁺ molekülünün indirgenmesi ile aynı anda gerçekleşen bir reaksiyon ile

gliseraldehit-3-fosfat enzimi aracılığıyla 1,3-bifosfogliserat oluşturur. Bu fosforil grubu fosfogliserat kinaz ile ADP molekülüne transfer edilerek ATP ve 3-fosfogliserat üretilir. 3-fosfogliserat molekülü, fosfogliserat mutaz ile 2-fosfogliserata ve daha sonra enolaz ile fosfoenolpirüvata dönüştürülür. Ardından bir tane daha fosforil transfer reaksiyonu pirüvat kinaz ile katalizlenerek pirüvat ve ATP oluşur [69,70].

Glikoliz sırasında gerçekleşen önemli yan yollardan birisi gliserol biyosentezidir [69]. Aldolaz enzimi ile elde edilmiş olan dihidroksiaseton fosfat molekülü, trioz fosfat izomeraz enzimi ile gliseraldehit-3-fosfata dönüşerek glikolize girebileceği gibi gliserol-3-fosfat dehidrogenaz ile gliserol-3-fosfata indirgenebilir. Bu sırada NADH molekülü NAD^+ molekülüne okside olur. Oluşan gliserol-3-fosfat da gliserol-3-fosfataz ile gliserole dönüştürülür. Oluşan gliserol, maya hücrelerini osmotik streslere karşı koruduğu için mayalar için önemlidir [76].

Glikolitik yol sonucunda elde edilen pirüvatın katabolik olarak kullanılması, etanole fermente edilmesi ya da sitrik asit döngüsü ile karbondioksite okside edilmesi şeklinde iki yolla gerçekleşmektedir [69]. Fermantasyon sırasında pirüvat, pirüvat dekarboksilaz enzimi ile asetaldehit ve karbondioksite ayrılmaktadır. Oluşan asetaldehit alkol dehidrogenaz enzimi ile etanole indirgenirken NADH molekülü de okside olmaktadır. Asetaldehit molekülü, asetaldehit dehidrogenaz ve asetil-CoA sentez enzimleri ile lipidlerin ve amino asitlerin biyosentezinde kullanılan sitozolik asetil-koenzim A'ya dönüşebilmektedir [77]. Bunun yanında maya hücreleri karbon kaynağı olarak asetati da kullanabilmektedir. Asetat metabolizması sırasında asetat, asetil-CoA sentez enzimi ile asetil-CoA'ya dönüştürülmektedir [70].

Oluşan pirüvatın oksidatif yolla katabolize edilmesi, pirüvatın mitokondriye taşınması ve ardından pirüvat dehidrogenazın katalizlemesiyle NAD^+ molekülünün indirgenmesi ile asetil-CoA ve karbondioksite dönüştürülmesi şeklinde gerçekleşmektedir [69]. *Saccharomyces cerevisiae*'nin metabolik aktivitesi sırasında pirüvat dehidrogenaz enziminin pirüvata olan afinitesi pirüvat dekarboksilazdan on kat daha yüksek olmasına rağmen hücre içindeki aktivitesi oldukça düşüktür. Bu yüzden, pirüvat düşük konsantrasyonlarda bulunduğu pirüvat dehidrogenaz ile okside olmaya daha

yatkındır. Maya hücresi yüksek konsantrasyonlarda şeker içeren ortamlarda bulunduğunda pirüvat akışı fazla olmakta ve hücre fermantasyona kayarak etanol üretmektedir [69].

Maya metabolizmasının trikarboksilik asit döngüsünün (TCA) glikoliz ile arasındaki bağ olan asetil-CoA, asetil-CoA sentez enzimi ile etanol ya da asetattan, pirüvat dehidrogenaz enzimi ile pirüvattan ya da yağ asidi oksidasyonundan oluşmaktadır [69,70]. Bu asetil-CoA, sitrat üretmek için sitrat sentez enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile okzaloasetat ile tepkimeye girmektedir. Oluşan sitrattın izositrata izomerizasyonunun ardından ise izositrat molekülü alfa-ketoglutarat molekülüne dönüşmektedir [78]. Oluşan alfa-ketoglutarat molekülünün süksinil-CoA ile süksinata dekarboksilasyonunun ardından fumarata dönüşümü gerçekleşmektedir. Ardından, fumaraz enzimi ile fumarattan oluşan malat, malat dehidrogenaz enzimi ile okzaloasetata okside olmaktadır [69]. Oluşan okzaloasetat seviyesinin yetersiz olması durumunda, TCA döngüsü ara ürünlerinin biyosentetik amaçlarla kullanılması (amino asit sentezlenmesi gibi) sebebiyle, TCA döngüsü gerçekleşmemektedir. Maya hücrelerinde ana anaplerotik reaksiyon pirüvat karboksilaz enzimi aktivitesidir [70,79]. Maya hücrelerinin etanol ya da asetat gibi 3 karbon atomundan az karbon kaynağı içerdiği durumlarda kullandığı anaplerotik reaksiyon ise glioksilat döngüsüdür [69,70]. Bu döngüde izositrat liyaz, izositratın glioksilat ve süksinata dönüşümünü katalizler. Homotetramer olan bu enzimin sentezini etanol tetiklerken, glukoz baskılamaktadır. Bu döngünün ikinci enzimi olan malat sentez ise glikozilat molekülünün asetil-CoA üreterek kondensasyonunu sağlar [69,70].

Pentoz fosfat izyolu, NADPH molekülünün, riboz iskelet yapılarının ve aromatik amino asitlerin sentezi için gerekli eritroz-4-fosfat yapılarının sağlanması gibi birçok metabolik gerekliliğin tamamlanmasında rol oynar [69].

Maya metabolizması sırasında okzalik asit sentezlenmesi ise üç farklı yolla gerçekleşebilmektedir. Bunlardan ilkinde sitoplazma, pirüvat karboksilaz enzimi ile karbondioksit molekülünün pirüvat molekülüne fiksasyonu gerçekleşir ve böylece okzaloasetat oluşur. Daha sonra ise okzaloasetat asetilhidrolaz enzimi ile bu molekül okzaloasetat ve asetat bileşiklerine ayrılır [80]. TCA ve glioksilat izyollarında ise pirüvat

bu izyollarına girebilmek için ilk olarak pirüvat dehidrogenaz multienzim kompleksiyle asetil CoA'ya okside olur. Ardından TCA döngüsünde, sitoplazmik döngüde olduğu gibi okzaloasetattan, okzaloasetat hidrolaz enzimi ile okzalik asit üretilirken; glioksilat izyolunda ise sitratın glioksilat dehidrogenaz enzimi ile glioksilata hidrolizinden elde edilir [80].

Tarhana hamurlarında büyük oranda tespit edilen *Kluyveromyces marxianus* ve *Saccharomyces cerevisiae* türü mayaların ikisi de solunum-fermantasyon tipi metabolizma göstermektedir. Bu mayalar oksidatif fosforilasyonu takiben TCA döngüsü ile enerji üretmenin yanında şekerleri etanole çevirerek fermentasyon da yapabilmektedir. Ancak, *Saccharomyces cerevisiae* aerobik koşullar altında bile olsa yüksek şeker konsantrasyonlarında fermentasyonu tercih etmekte ve pirüvatı etanol üretimine yönlendirmektedir. *S. cerevisiae* türünün tercih ettiği bu metabolizma şekline pozitif Crabtree etkisi denmektedir [81]. Aksine, *Kluyveromyces marxianus* Crabtree etkisini pozitiften negatife bir spektrum arasında göstermekte ve bulunduğu prosese göre kullanacağı metabolizma izyolunu tercih edebilmektedir [82].

Tarhana fermentasyonu sırasında hamurun reçetesi, bu reçetede yer alan bileşenlerin kaynakları, fermentasyon süresi ve sıcaklığı mikrobiyotayı oluşturan LAB ve maya çeşitliliğini ve miktarını etkileyebilir. Örneğin, De Vuyst [55], düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen fermentasyon prosesinde maya gelişiminin desteklenerek etanol üretimi ve aroma oluşumunun arttığını belirlemiştir. Bu sebeplerle, farklı tarhana çeşitleri mikrobiyotasında maya cinslerinin varlığını ve bu metabolik yolları kullanarak oluşturabilecekleri metabolitlerin son ürüne etkilerini incelemek önemlidir.

2.4.3. Fermente Gıdalarda Laktik Asit Bakterileri (LAB) ve Mayalar Arasındaki Etkileşimler

Mayalar ve LAB arasındaki metabolik etkileşimler birçok fermente gıda üretiminde kullanılmaktadır. Fermente gıdaların mikrobiyotasında bulunan LAB'i organik asitler üreterek pH'ı düşürüp patojen mikroorganizmaların gelişimini önlerken maya gelişimini ise teşvik etmektedir [83]. Mayaların ise LAB için vitaminler ve çözünür nitrojen gibi

besin ögeleri sağlamanın yanı sıra aroma gelişiminde önemli olan çeşitli hücre dışı enzimler ürettiği de bilinmektedir. Örneğin, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Lacticaseibacillus casei* ürün mikrobiyotasında birlikte bulunduğu; *Saccharomyces cerevisiae*, *Lacticaseibacillus casei* gelişimi için elzem olan riboflavini sağlamaktadır [83]. Ayrıca, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Lactiplantibacillus plantarum* türlerinin asidik koşullarda glikoz-sitrat içeren ortamlarda birlikte bulunması durumunda *Saccharomyces*'lerin *Lactobacillus* tarafından üretilen laktik asit miktarını azaltarak pH'ı stabilize ettiği ve sitrat fermantasyonunu arttırdığı belirlenmiştir [84].

Gıda ürünlerinde mayalar ve laktik asit bakterilerinin etkileşimleri sırasında maya türlerinin bu etkileşimlere olan katkıları; amino asitler ve vitaminler gibi zorunlu gelişim metabolitlerini sağlamaları, metabolizma sonucu üretilen toksik son ürünleri uzaklaştırmaları, pH'ı düşürerek istenmeyen mikroorganizmaları yok etmeleri, karbondioksit ve alkol üretmeleri ya da organik asitleri kullanarak pH'ı yükseltmeleri sonucu starter kültür gelişimini desteklemeleri olarak sayılabilir [83].

Ekşi hamur fermantasyonunda asitlik oluşumundan LAB, taneli ve elastik ekmek içi yapısının oluşumundan homofermentatif LAB, flavor oluşumu ve kabarmadan heterofermentatif LAB ve mayalar sorumludur [55,85]. Ekşi hamur üretiminde *Lactobacillus* türleri karbonhidratlardan maltozu parçalayarak, maltoz kullanamayan *S. exiguus* türleri için gerekli glukozu sağlarken; maltozu metabolize edebilen *S. cerevisiae* türleri ile de yarışmaktadır [83].

Fermente bir Afrika tahıl ürünü olan ogi fermantasyonunda yer alan mayalar ve bunların ürettikleri enzimler incelendiğinde *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* ve *Geotrichum candidum* suşlarının fitaz üretme kabiliyetleri değişmekle birlikte, fitatı parçalayabildikleri belirlenmiştir [86]. Diğer enzimlerin aktiviteleri açısından ise tüm *Candida* sp. izolatlarının test edilen diğer mayalardan daha yüksek lipolitik aktivite gösterirken; *Saccharomyces cerevisiae* izolatlarının ise diğer türlerden daha yüksek esteraz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir [86]. *Candida* türleri için laktik asit iyi bir büyüme faktörü olduğundan, LAB, mayalar için uygun

gelişme ortamını sağlarken; mayalar da *Lactiplantibacillus plantarum* için gerekli vitaminleri sağlamaktadır [87].

Tahıl fermantasyonunun ilk basamaklarında *Leuconostoc* ve *Lactococcus* spp.'nin baskın olduğu bir ortamda, aşırı organik asit üretimi nedeniyle maya gelişiminin inhibe olduğu; ancak fermantasyon devamında besin öğelerinin azalmasıyla *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Candida* spp.'nin süreci devam ettirerek dengeye ulaştığı tespit edilmiştir [88].

Ponomarova [49], *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactococcus lactis* ve *Lactiplantibacillus plantarum* içeren bir model ortamda, LAB türlerinin gelişme göstermek için amino asitler ve vitaminler gibi besin öğelerine ihtiyaç duyarken mayaların daha basit ortamlarda gelişebildiğini tespit etmiştir. Ayrıca, mayalar birlikte ya da yalnız başına iken gelişme gösterebildiği halde; bu iki LAB'nin de maya varlığı olmadan gelişme gösteremediği saptanmıştır [49]. Çalışma sonucunda mayaların LAB gelişimini destekleyen difüze olabilir faktörler ürettiği, etkileşim için maya ve LAB'nin etkileşim halinde olmasının zorunlu olmadığı ve büyümeyi teşvik eden faktörleri salgılamamanın mayalara ait içsel bir özellik olduğu ve gerçekleşmesi için bakterilere ihtiyaç olmadığı anlaşılmıştır [49].

Tarhana hamurunda maya kaynağı olarak ekşi hamur kullanılmakta ve farklı tarhana kaliteleri ekşi mayanın kompleks mikroflorasından etkilenmektedir. Tarhana hamuruna kontrollü maya inokülasyonunun fermantasyona etkilerinin incelendiği bir çalışmada, %1 oranında maya ilavesinin hızlı bir asitlik artışı sağlayarak fermantasyon süresini kısalttığı ve daha kısa fermantasyon süresinde daha iyi duyuşsal özellikler oluştuğu belirlenmiştir [22]. Benzer bir çalışmada da maya varlığının tarhana hamurunda duyuşsal özellikleri arttırdığı tespit edilmiştir [21].

2.5. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektrometresi (MALDI TOF MS)

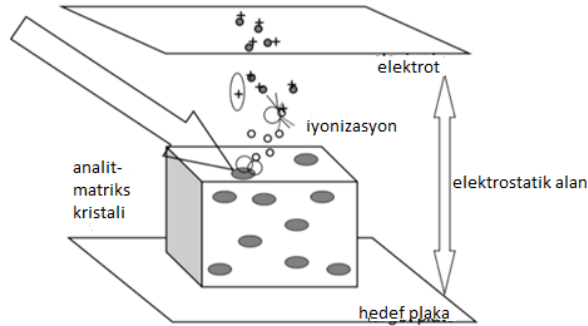
Mikroorganizmaların geniş çeşitliliği ve bilimin farklı dallarındaki gelişmeler sayesinde mikrobiyolojik tanımlama analizlerinde farklı tanımlama metotlarının gelişmesi

sağlanmıştır. Bu tanımlama metotları en başta fenotipik olarak mikroskobik/makroskobik metotlar, kültür temelli metotlar ve fizyolojik/biyokimyasal metotlar olarak geliştirilmiştir. Kültüromik yaklaşımın ortaya çıkmasıyla ise modern mikrobiyota araştırmalarındaki yaygın uygulamalar iddiasız ve karmaşık mikrobiyolojik gelenek yerine genomik ve yapısal çalışmalara bırakmıştır [5]. Kültüromik yaklaşımın genomik araçları metagenomik çalışmalar alanında kalırken; yapısal çalışmalar Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) spektrometresi (MS) cihazıyla gerçekleştirilmektedir [5]. Bu yöntemle yapılan çalışmalarda ise metagenomik yaklaşımlardan farklı olarak besiyeri ortamlarında geliştirilebilen mikroorganizmalar kullanıldığı için; çalışmalar sırasında makul miktarda saf kültürler elde etmek kritik bir noktadır.

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan metotlar basit, güvenilir, yüksek derecede spesifik olmalı, çeşitli mikroorganizma gruplarının analizinde birlik göstermeli ve mümkün olduğunca uygun maliyetli olmalıdır [89,90]. Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon spektrometresi, bakterilerin hızlı ve doğru şekilde tanımlanması için son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıdalarda mikroorganizmaların tanımlanması gıdayı bozan bakteriler, patojenler, starter kültürler ve probiyotikler açısından önemlidir. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında rutin olarak yapılan işlemlerde halen geleneksel kültüre bağlı yöntemler kullanılmakta ve bu analizler en azından iki gün sürmektedir. Buna karşın yüksek derecede hassas ve spesifik yöntemler olan genotipik tanımlama analizleri yüksek maliyetli olmanın yanında büyük ölçüde uzmanlık gerektirmektedir. Bu iki farklı yaklaşımın arasında MALDI TOF MS ile bakteriyel tanımlama hem güvenilirliği hem de rutin analizlere eklenebilmesiyle önem taşımaktadır.

MALDI TOF MS ile tanımlama işlemi örnekte çok miktarda bulunan proteinlerin parmak izlerinin oluşturulması ve bu parmak izlerinin, veri tabanında bulunan referans spektra ile karşılaştırılması ile gerçekleşmektedir. Bütün kütle spektrometresi metotlarının temel prensibi nötral bir molekülün iyonizasyonu ve oluşan birincil iyonların ve bunların yüksek vakumdaki bozulma ürünlerinin hatasız tespitine dayanmaktadır [91].

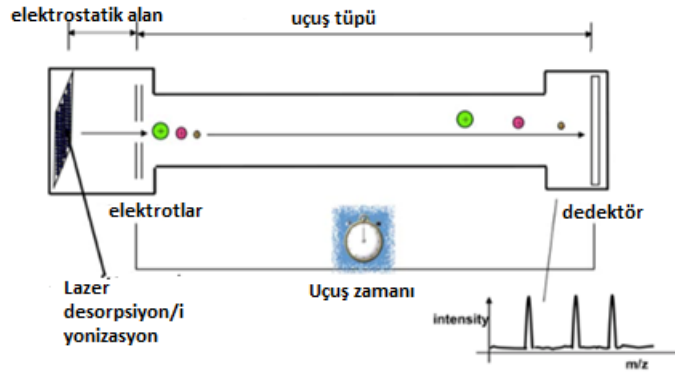
Tipik bir kütle spektroskopisi bir iyon kaynağı, bir kütle analiz edici ve bir detektör olmak üzere 3 parçadan oluşmaktadır. MALDI, biyomolekülleri bozulmaya uğratmadan, onları küçük organik bileşiklerin kristallerine gömerek iyonize etmektedir [91]. Analit öncelikle bir matris içerisinde kristalize olmaktadır. Protein analizi için uygun olan matrisler 2,5-dihidroksibenzoik (DHBA) α - siyano-4-hidroksisünamik asit (CHCA) ya da 3,5-dimetoksi-4- hidroksisünamik asit (sinapinic acid, SA) olarak sıralanabilir. Bu küçük organik molekül UV lazerden radyasyonu absorbe eder ve enerjisini proteinlere taşır. Böylece proteinler bozulmadan iyonize olur. MALDI'deki iyonizasyon aşaması birincil ve ikincil iyonizasyon olarak 2 adımlı bir mekanizma olarak açıklanabilir. Lazer atışındaki enerji sadece matris tarafından absorbe edilirken; matris buharlaşır ve iyonları analite transfer eder. Bu da analitin desorpsiyonuna neden olur. Bu iyonizasyon her tür molekülden sadece tek yüklü iyonlar oluşturur (Şekil 2.7). Gaz fazına geçtikten sonra, yüklü moleküller elektrik alan içerisinde hızlanır ve kütle/yük oranına göre kütle analiz edicide ayrılır. Son olarak dedektör tarafından değerlendirilir [91]. Tespit edilen her molekül, moleküler kütlesi, yükü, kütle/yük oranı ve sinyalin bağıl yoğunluğu açısından değerlendirilir [92].



Şekil 2.7. MALDI metodu çalışma prensibi, analit-matris kristallerinin lazer ışınları ile uyarılması sonucu analit moleküllerinin ve proteinlerin salınması [91].

MALDI TOF-MS'de yer alan TOF analizörü aynı elektrik alanında hızlandırılan tüm iyonların aynı kinetik enerjiye sahip olduğu prensibine dayanmaktadır. Bu iyonlar elektrik alanını terk ettikten sonra alanın olmadığı uçuş tüpüne girerek kütlelerine göre

farklı hızlar kazanmaktadır (Şekil 2.8). Daha büyük iyonlar uçuş tüpünü daha uzun sürede geçmektedir [91].



Şekil 2.8. Uçuş zamanı analizötürü ile MALDI çalışması [91].

Mikroorganizmaların kütle spektroskopisine dayanan tanımlanması, belirli bir anda bir hücrede bulunan proteinlerin tam seti anlamına gelen proteoma bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bir hücrenin proteomu farklı büyüme koşullarına göre farklılık göstermektedir. Bakteriler için ribozomal proteinlerin tanımlanmasına dayalı olan bu yöntem inkübasyon sıcaklığı, besiyeri ve inkübasyon süresine bağlı olduğundan tekrar edilebilir sonuçların elde edilebilmesi için bu değişkenlerin mümkün olduğunca sabit tutulması gerekmektedir [89,91,93]. Ribozomal proteinlerin farklı kütleleri, güdümsüz hiyerarşik kümelenme yaklaşımlarının uygulanmasını ya da model inşa metotlarının uygulanmasını sağlayan spesifik parmak izleri oluşturmayı sağlamaktadır [93]. Bunların yanında ribozomal proteinler besin yetersizliğinden ve soğuk stresinden etkilendiğinden MALDI TOF MS analizlerinde taze örneklerle çalışmak önemlidir. Ayrıca her ne kadar ribozomal proteinlerin amino asit dizileri büyük ölçüde korunmuş olsa da alt tür seviyesinde ve suş seviyesinde hafif amino asit dizilimi değişimleri olabilmektedir [89].

MALDI TOF MS analizlerinde doğruluk ve tekrarlanabilirliğin sağlanması için örnek hazırlama aşaması önem taşımaktadır. Ön zenginleştirme aşamaları dışında, MALDI TOF MS analizi doğrudan tek koloniden gerçekleştirilebilmektedir. Etkili bir tanımlama

yapabilmek için, protein ekstraksiyon metoduna bağlı olmak üzere 10^5 - 10^7 hücre gerekmektedir [93]. Genel olarak hücrenin parçalanması için 3 farklı yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar; doğrudan bulaştırma, hedef ekstraksiyonu ve etanol ile saflaştırmanın ardından asetonitril/formik asit ekstraksiyonu metotlarıdır. Katı ortamdaki yapıları nedeniyle sürmenin zor olduğu bazı izolatlar sıvı besiyerinde geliştirilerek etanol-formik asit ekstraksiyonu uygulanabilir [89,91].

MALDI TOF MS ile ölçüm gerçekleştirilirken, önce geliştirici tarafından tavsiye edilen *E. coli* referans suşlarından biri kullanılarak; cihaz veri tabanındaki ortalama kütlelerle; analiz edilen kalibrasyonda kullanılan suşun ortalama kütleleri kıyaslanarak cihaz kalibrasyonu gerçekleştirilir. Hedef slayt üzerinde matriks ve analit birlikte kristalize olduktan sonra hedef slayt cihaz içerisine yerleştirilir. Örneğin kalitesi ve saflığına, veri tabanının genişliği, veritabanı içindeki referans spektra sayısına bağlı olarak izolatin tanımlanması birkaç saniyeden birkaç dakikaya varan sürede gerçekleşir [89]. Tanımlama kütle/yük (m/z) oranına göre gerçekleştirilir ve m/z değeri elde edilen pikin kütle merkezidir [92]. Entegre edilmiş olan yazılım, en benzer parmak izlerini logaritmik skor değerlerine göre sıralayarak bir sonuç listesi hazırlar. Sonuçların kesinliğini arttırmak için sadece belli sayıda yüksek yoğunluklu tekrar edilebilir pikler değerlendirilir [91].

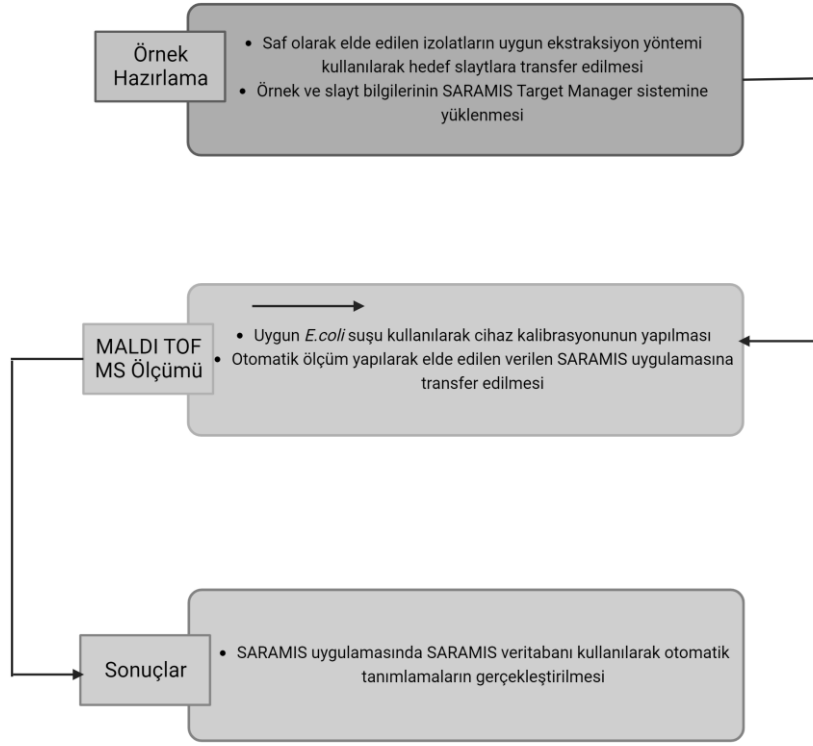


Şekil 2.9. MALDI TOF MS hedef slaydının cihaza yüklenmesi.

Geleneksel fermente bir üründen izole edilen laktik asit bakterilerini tanımlamak için MALDI TOF MS ile (GTG)₅-PCR parmak izi tekniğini karşılaştırarak kullandığı bir çalışmada laktik asit bakterilerini tanımlamada MALDI TOF MS'in suş seviyesinde etkin olarak kullanılabileceği ve cihazın ayırıcı gücünün taksona bağlı olduğu belirtilmiştir [89]. Ayrıca bir Fransız peynirinden izole edilen 197 LAB kolonisinin tanımlanmasında,

izolatların %80.2'si tür seviyesinde yüksek olasılıkla, %17.26'sı cins seviyesinde yüksek olasılıkla ve %2.54'ü tür seviyesinde muhtemel olasılıkla tanımlanmıştır [90]. Duskova [94] ise gıda örneklerinden izole edilen 148 bakterinin 138 tanesinin MALDI TOF MS BioTyper veri tabanında güvenilir skorla tanımlandığını ve bunların 111 tanesinin *Lactobacillus* spp., 20 tanesinin *Leuconostoc* spp., 3 tanesinin *Weissella* spp., 2 tanesinin *Enterococcus* spp. ve 2 tanesinin *Pediococcus* spp. olduğunu belirtmiştir.

Bu tez çalışmasında izole edilen bakteriler, mayalar ve küflerin tanımlanmasında VITEK MS (Biomerieux, France) Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon İyonlaştırma Uçuş Zamanı Kütle Spektroskopisi sistemi kullanılmıştır. Bu cihazın lazer teknik özellikleri değişmez odaklı 337 nm nitrojen lazeri, saniyede 50 lazer atışı, eksen üstü lazer ışını numune gelişi ve yazılım kontrollü lazer gücü ve lazer hedeflemedir. Analizör özellikleri ise 1.2 m uzunluğunda doğrusal uçuş borusuna sahip olması, 2 adet döner destekli turbo moleküler pompa ile sağlanan emiş ve matriks iyonları gibi istenmeyen yüksek yoğunluklu sinyaller için ışın saptırma özelliği olmasıdır. VITEK MS sistemi, Hazırlık İstasyonu ve Toplama İstasyonu olarak iki parçadan oluşmaktadır. Bu iki istasyon da Myla veritabanına bağlıdır ve elde edilen spektrumların analizi Myla'da gerçekleştirilir. VITEK MS cihazının onaylı veritabanı olan Myla yanında, araştırmacılar tarafından geliştirilmekte olan Launchpad ve SARAMIS veri tabanı da kullanılabilir. Bu çalışmada daha geniş bir veritabanına sahip olduğu için SARAMIS yazılımı ile çalışılmıştır.



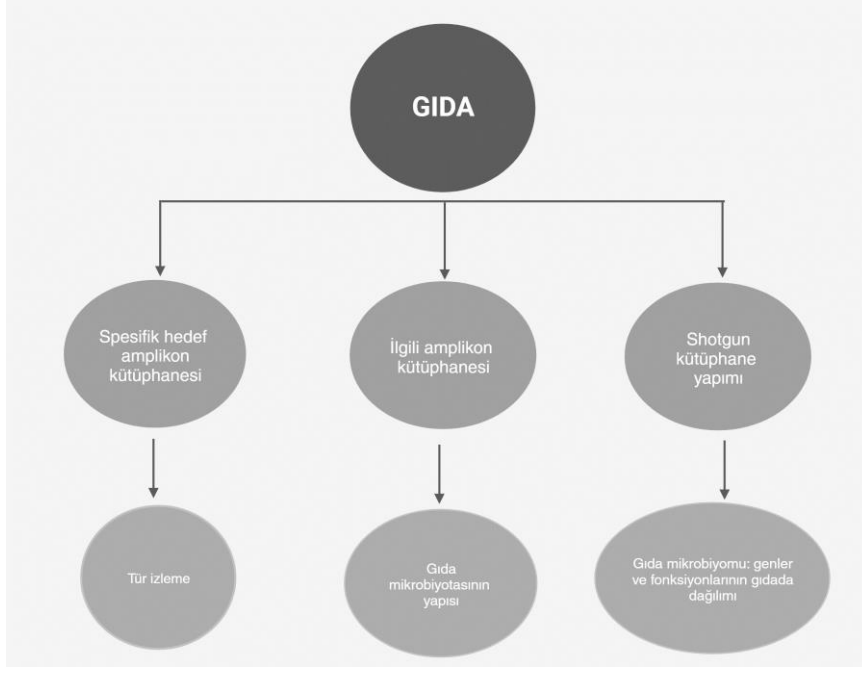
Şekil 2.10. MALDI TOF MS İş Akış Şeması

2.6. Metagenomik Amplikon Dizileme Analizleri

“Great Plate Count Anomaly” olarak isimlendirilen ve Dünya üzerindeki bakterilerin yaklaşık sadece %1’inin *in vitro* olarak kültüre edilebildiğini ifade eden gerçek, standart mikrobiyolojik ekim yöntemlerinin kompleks bakteriyel komünitelerin ortaya konmasında yetersiz kaldığını göstermektedir [95,96]. Metagenom terimi ilk kez 1998 yılında, daha önce tek genomların çalışılmasında kullanılan yaklaşımların çevresel toprak örneklerindeki mikroorganizmaların toplamının genomunun ifade edilmesi için kullanılmıştır [6,97]. Bir başka deyişle metagenomik terimi bir örnekte bulunan hem dominant hem de düşük yoğunluktaki bütün organizmaların genomik materyalinin aynı anda tanımlanması için kullanılan dizileme yöntemleridir [6,7]. Metagenom verileri yüksek çıktılı dizileme metotları kullanılarak elde edilir. Yeni nesil dizileme yöntemlerinin geliştirilmesiyle bireysel genomların dizilenmesinde görülen büyük artış metagenomik dizileme ve analizlerde bir dönüm noktası yaşanmasını sağlamıştır.

Moleküler kültürden bağımsız yöntemlerin geliştirilmesiyle, çevreden ve hayvanlardan alınan örneklerdeki karışık bakteriyel kompozisyon özellikle 16S rRNA genini kodlayan genlerin PCR ile çoğaltılması, saflaştırma için çoğaltılması ve tanımlama için dizilenmesi kullanılarak ortaya çıkarılmaktadır. 1985 yılında Carl Woese'nin rRNA genlerinin evrimsel kronometreler olduğunu gösteren öncü çalışmasının ardından Pace [98]'in 5S ve 16S rRNA gen dizilerini doğrudan analiz etmeleriyle çevresel bir örnekten kültüre etme yöntemleri kullanmadan mikroorganizma çeşitliliği ortaya konmuştur [96]. Bu çalışmalar PCR teknolojisinin ilerlemesi ve neredeyse tüm genin çoğaltılması için primerlerin dizayn edilebilmesiyle çok daha ileri bir noktaya gelmiş ve 1990ların ortalarında 'pyrosequencing' ve 'parallenmiş bağlanma aracılı ve boncuk-temelli dizileme' metotlarının sırasıyla gelişimiyle Yeni Nesil Sekanslama (NGS) teknolojileri geliştirilmiştir [8,96]. Bu teknolojiye görülen ilerlemeler son yıllarda mikrobiyal ekosistemlerin incelenmesinde önemli bir gelişme olan yüksek çıktılı dizileme (HTS) yöntemlerinin oluşturulmasını sağlamıştır.

Birçok metagenomik çalışma rastgele çoğaltılmış DNA parçalarının dizilenmesinden ziyade bakteriyel türlerin tanımlanmasında önemli bir araç olan 16S rRNA geninin analizine dayanmaktadır. Gıda mikrobiyotasında önemli bir yer tutan mayalar ve küflerin tanımlanmasında ise kromozomlarda yer alan ribozomal rRNA'ların küçük alt birim ve büyük alt birim genleri arasında yer alan 'internal transcribed spacer (ITS) bölgesi hedeflenmektedir [8]. Çevresel bir örneğin mikrobiyotası hakkında derinlemesine bilgi sahibi olmayı sağlayan bu yöntemin gıdalarda araştırılması ise geleneksel fermente gıdaların karakterizasyonu, bir gıda ürünüde mikrobiyal komünitenin gelişim ve değişiminin gözlenmesi, bakteriyel bozulmanın tespiti ve durdurulması olarak sayılabilir. Yüksek çıktılı dizileme yaklaşımının gıda ürünlerinde uygulanma metotları ve elde edilebilecek çıktılar 2.11'de gösterilmiştir.



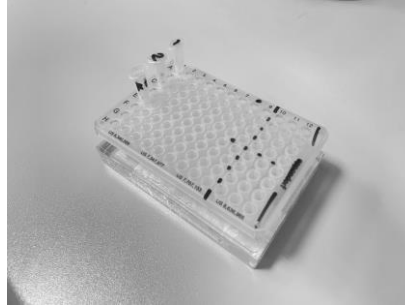
Şekil 2.11. Yüksek çıktılı dizileme metodlarının gıda ürünlerinde uygulanma akış şeması [99].

Yeni nesil dizileme yöntemleri çok sayıda nispeten küçük okuma sonuçlarından büyük miktarda paralel diziler elde etme prensibine dayanmaktadır [100]. Her okuma, yüksek çözünürlüklü dedektörler aracılığıyla bireysel küçük DNA parçalarının gerçek nükleotid kompozisyonlarının belirlenmesini sağlar.

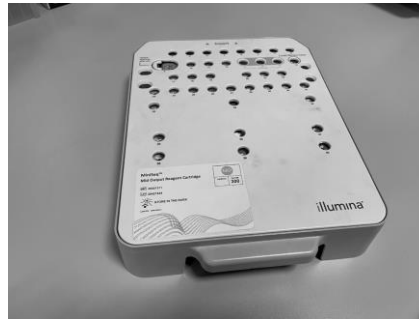
Örnek hazırlama aşaması herhangi bir metagenomik çalışmanın ilk ve en önemli aşamasıdır. Ekstrakte edilen DNA örnekte bulunan tüm hücreleri temsil etmeli ve takip eden kütüphane hazırlama ve dizileme aşamasında kullanılacak yeterli miktarda yüksek kalitede nükleik asitler içermelidir [97]. Günümüzde ekstraksiyonun yapılacağı çevresel örnek tipine göre farklı ekstraksiyon kitleri bulunmaktadır. Hedef komünitenin bir bitki ya da hayvan gibi ev sahibi ile ilişkili olma durumuna göre fraksiyonlama ya da seçici lizis işlemi uygulanabilmektedir [97]. Böylece ev sahibi genomun geniş olduğu durumlarda, bu genomun mikrobiyal komüniteyi alt etmesi önlenmektedir.

DNA elde edilmesi aşamasından sonra dizileme cihazları, cihaz tipine bağlı olarak değişen şekilde, uygun bir kütüphane içerisine bir DNA ön işleme adımı uygulanır. Genel

olarak ilk önce yüksek molekül ağırlıklı DNA, uygun platforma spesifik boyutta kesilir [101,102]. Daha sonra kör uçlu DNA parçaları elde etmek için DNA uçlarına bir parlatma işlemi uygulanır ve spesifik adaptörler bu parçalara bağlanır. Fonksiyonel bir kütüphane 3' ve 5' uçlarına bağlanmış spesifik adaptör dizileri gerektirmektedir [101]. Adaptör bağlama aşamasından sonra kütüphane hemen dizileme işlemine alınabileceği gibi PCR kullanılarak bir ön çoğaltma işlemi uygulanabilir.



Şekil 2.12. Illumina kütüphane hazırlığı işlemlerinden örnek.



Şekil 2.13. Illumina kütüphane örneği.

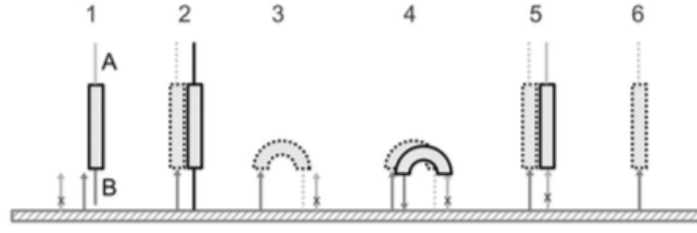
Bu tez çalışmasında kullanılan Illumina HiSeq dizileme sisteminde uygulanan tüm enzimatik prosesler ve görüntüleme işlemleri bir “akış hücresi (flow cell)”nde gerçekleşmektedir. Bu sistem Şekil 2.15’de gösterildiği gibi DNA’nın klonal çoğaltılması sonucu polimer kümesi üretmek için ‘köprü amplifikasyon’ yaklaşımını kullanırken dizileme işlemi de ‘sentezleyerek dizileme’ prensibiyle gerçekleştirilmektedir [101,103].



Şekil 2.14. Akış hücresi (Flow cell) örneği.

Kütüphane hazırlama aşaması sırasında eklenen adaptör dizilerin karşılığı olan ileri ve geri oligosakkaritler akış hücresinin tüm iç yüzeyine bağlanmış durumdadır. Hazırlanan kütüphane akış hücresine yüklenirken çift zincirli DNA parçaları denatüre edilerek tek zincirli hale gelir ve akış hücresi üzerinde bulunan oligonükleotitlerle hibridize olur. Baştaki kütüphane uzaklaştırılır ve kopyalanır. Akış hücresine bağlı olan parçalar ise eşsıcaklıklı amplifikasyon ile özdeş şablon moleküller oluşturmak için kullanılır [101]. Bu proses 60°C’de denatürasyon, bağlanma ve uzatma basamaklarını kontrol eden 3 adet spesifik tamponun halkasal düzenlemeleriyle gerçekleşmektedir ve bu esnada kopyalanan kütüphane moleküllerinin 3’ uçları akış hücresi üzerindeki tamamlayıcı oligosakkaritlerle hibritleşir [101]. Son aşamada ise çift zincirli DNA parçalarının bir zinciri uzaklaştırılır ve dideoksinükleozit trifosfat (ddNTP) kullanılarak zincirlerde yer alan tüm 3’ uçları engellenerek başka kütüphane molekülleri için dizileme primeri olarak davranması önlenir.

Akış hücresi üzerinde gerçekleşen her seferinde bir nükleotid okuması yapılan döngülerde floresan olarak etiketlenmiş deoksiribonükleotidler (dNTP) uzayan DNA zincirine katılır. Bu floresan özellikteki baz dedektör tarafından görüntülendikten sonra uzaklaştırılır ve şablon zincirler bir sonraki döngü için hazır hale getirilir [101,103].



Şekil 2.15. Köprü amplifikasyonu yaklaşımı ile şablon oluşumu [101].

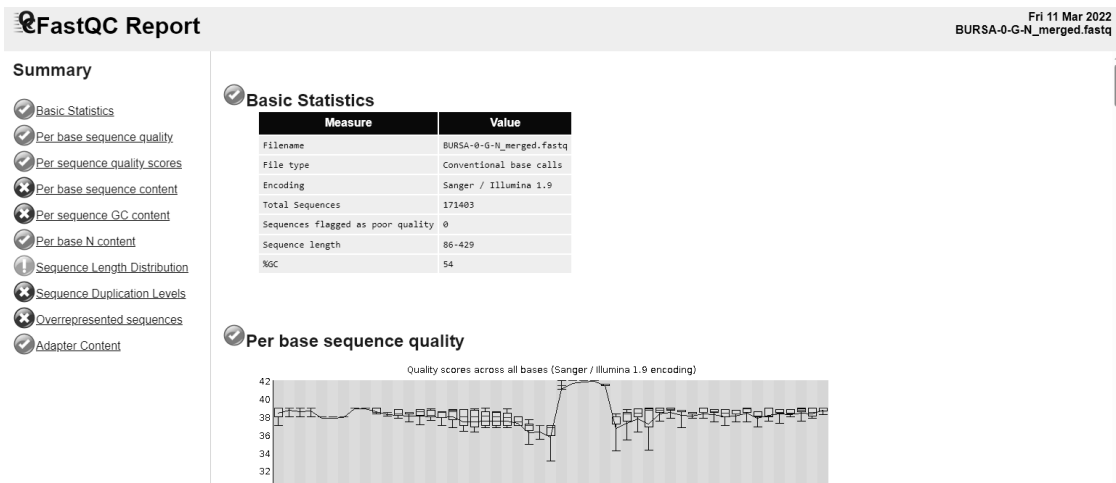
Fermente gıdaların mikrobiyotasının belirlenmesinde yüksek çıktılı dizileme yönteminin kullanılması peynir üzerine yapılan bazı çalışmalarda ([104–106]) değerlendirilmiştir. Metagenomik analizlerin dizilenen fragmanlarının uzunlukları, dizileme çalışmasının derinliği ve DNA ekstraksiyonu ve çoğaltılması aşamasında görülebilen sapmalardan kaynaklanan limitleri olmasına rağmen yapılan çalışmalarda klasik yöntemlerle elde edilen sonuçlardan belirgin farklılıklar göstermiş ve metagenomik sonuçlar daha geniş bir bakteriyel çeşitlilik yakalamıştır [8]. Silveti [107] geleneksel bir peynir çeşidi olan ‘Silter’ peyniri üzerinde yaptıkları araştırmada ekstrakte ettikleri genomik DNA materyalinin 16S rRNA geninin çok değişkenli V3-V4 bölgelerini çoğaltarak teleme ve olgunlaşmış peynir aşamalarında hakim olan mikrobiyotaları karakterize etmişler ve sonuçlarını klasik yöntemlerle karşılaştırarak bu iki yöntemin birbirleriyle çelişen sonuçlar gösterdiğini belirlemişlerdir.

Metagenomik yöntemlerin klasik yöntemlere göre sahip olduğu tüm üstünlüklere karşın çalışmalar sırasında doğru ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için dikkat edilmesi gereken hususlar bulunmaktadır. Öncelikle, belirli bir gıda ürünüde yer alan mikroorganizmaların ve bunların miktarlarının doğru bir profilini oluşturmak için çalışılan numunenin ürünü doğru şekilde yansıttığından emin olunmalıdır. Örnek alındıktan sonra hem nükleik asit ekstraksiyonundan önce hem de sonrasında taşıma, depolama, aerobik ya da anaerobik saklama koşullarına dikkat edilerek mikroorganizma miktarlarının koşullardan etkilenmemesi sağlanmalıdır. Ayrıca analizler sırasında farklı mikrobiyal türler hücre duvarı yapısındaki farklılıklardan dolayı litik ajanlardan farklı hassasiyette etkilendiğinden ekstrakte edilen nükleik asitlerin saflığı farklı olabilmektedir [99]. Bunların yanında gıda gibi ürünlerinde matriks oldukça kompleks olabildiğinden PCR amplifikasyon aşamasını etkileyen safsızlıklar analizleri etkileyebilir [99]. PCR

aşaması ise amplifikasyon amacıyla analizlerde kullanılmakla birlikte, sonuçlarda taraflılık yaratarak mikroorganizmaların miktarlarını orijinal örnektekinden farklı gösterebilmektedir [99]. Dizileme aşamasında göz önüne alınması gereken bu konularla birlikte, elde edilen verilerin uygun biyoinformatik programlarla doğru ve güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi metagenomik çalışmaların kritik bir aşamasıdır.

2.7. Biyoinformatik Analizler

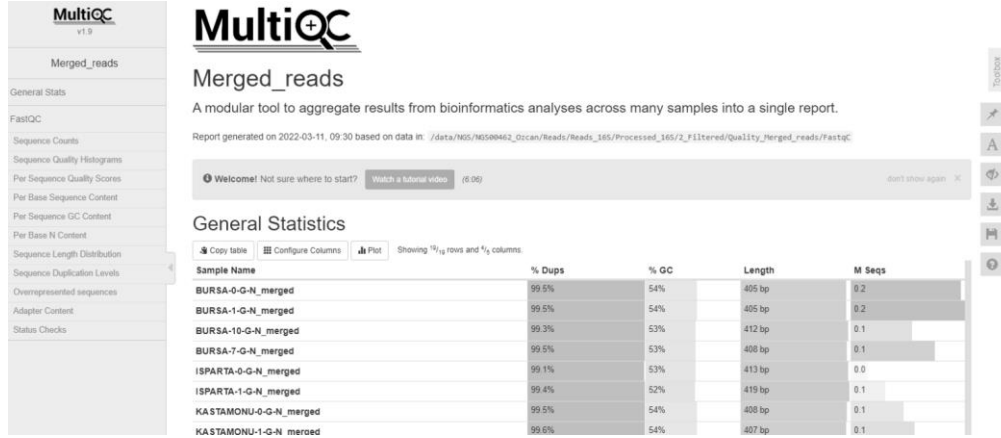
Kullanılan yeni nesil dizileme platformunda yapılan dizileme sonucu elde edilen ham verilerin kalite kontrolünün yapılması için kullanılan yazılımlardan bir tanesi FastQC'dir [108,109]. Bu yazılım ile daha ileri analizlere geçilmeden önce elde edilen verilerde bu ileri analizlerin uygulanmasını engelleyecek problemler olup olmadığı anlaşılabilir. FastQC yazılımının ilk adımı dizileme platformunda “.fastq” dosyası şeklinde bulunan verilerin aktarılmasını sağlamaktır. Daha sonra ana istatistikler, temel dizi başına kalite, dizi başına kalite skorları, dizi başına GC içeriği, dizi başına N içeriği, dizi uzunluğu dağılımı, kopya dizi seviyeleri, aşırı temsil edilen diziler ve adaptör içeriği alanlarından hangilerinde problem olabileceği ile ilgili hızlı genel bakış ve verilerin değerlendirilmesi için özet grafikler ve tablolar (Şekil 2.16) elde edilir [108,110].



Şekil 2.16. FASTQC yazılımı çalışma ekranı görüntüsü.

Biyoinformatik analizler kısmında kullanılan ikinci yazılım olan MultiQC, FastQC aracında elde edilen kalite değerlendirmelerinin çoklu örnekler arasında değişiminin tek

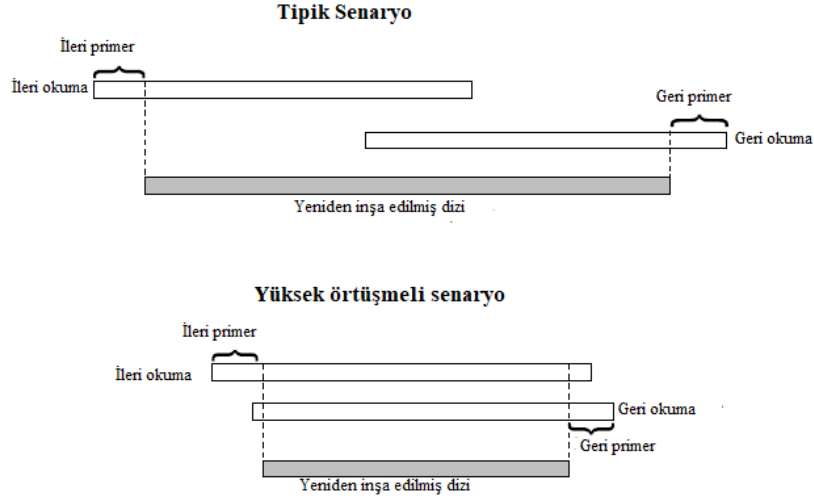
raporda izlenmesini sağlamaktadır. FastQC yazılımı kullanılarak her örnek için ayrı ayrı incelenmiş olan parametreler, MultiQC yardımıyla tüm örnekler için bir araya getirilmekte ve yanıltıcı olabilecek faktörler incelenebilmektedir [111]. Çalışma sonucunda elde edilebilen veri örnekleri Şekil 2.17’de gösterilmiştir.



Şekil 2.17. MultiQC yazılımı çalışma ekranı görüntüsü.

Dizileme analizlerinin kütüphane hazırlama basamağında her DNA ya da RNA molekülünün 3’ ucuna eklenmiş olan adaptör diziler de proses boyunca cihaz tarafından dizilenmektedir. Böylece elde edilen verilerde incelenen molekülle birlikte adaptör dizi de yer almaktadır. Bu amaçla Cutadapt v.1.18. yazılımı kullanılmakta ve adaptör dizilere uzaklaştırılarak daha ileri analizlere yalnızca gerekli veriler iletilmektedir [112]. Ayrıca Cutadapt sayesinde primerler, poly-A kuyrukları ve diğer istenmeyen dizi tipleri de yüksek çıktılı dizileme verilerinden kırılabilir.

İleri ve geri yönlü okumalar şeklinde iki farklı fastaq dosyası halinde elde edilen çift uçlu okumalar bir örtüşmeden yararlanılarak tek bir okuma halinde birleştirilir (Şekil 2.18). Bu çiftin birleştirilmesi sırasında ileri okuma dizisi, geri okuma dizisinin ters-tamamlayıcı dizisine hizalanmaktadır. Usearch yazılımı kullanılarak en az 15 bazlık bir örtüşme eşik değeri belirlenerek birleştirmeler gerçekleştirilebilir [113].



Şekil 2. 18. İleri ve geri yönlü okumaların birleştirilmesi [114].

Fungal türlerin tanımlanabilmesi için moleküler tanımlama tekniklerinde tercih edilen “ribozomal internal transcribed spacer (ITS)” bölgesi iki tane oldukça değişken bölgeye sahiptir. Bu ITS1 ve ITS2 bölgeleri genellikle türlere spesifiktir. Büyük taksonomik ve çevresel veri setlerinden ITS1 ya da ITS2 bölgelerinin ayrılıp tanımlamaların yapılabilmesi için ITSx yazılımı kullanılabilmektedir [115]. ITSx ökaryotlara ait toplam 20 adet grubun geniş düzenlemelerinden hesaplanan “hidden Markov modellerini (HMMs)” kullanır ve dizi ekstraksiyonu, dizilerdeki ribozomal genlerin tahmin edilen pozisyonlarından elde edilir [115].

Birleştirme işlemi tamamlandıktan sonra, kontig ismi verilen bu birleştirilmiş diziler, bu okumaları Operasyonel Taksonomik Ünite (OTU)’lere kümeleyen biyoinformatik araçlarla çalışılmaktadır. Matematiksel taksonominin en küçük birimi olan OTU, organizmaları gözlenen karakteristiklerine (dizi benzerlikleri) göre gruplara ayırarak sınıflandırmak için kullanılan ve bu organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri yansıtan bir yaklaşımdır. Bu çalışmada kullanılan UNOISE algoritması elde edilen okumalardan doğru biyolojik verilerin geri kazanılmasını sağlayarak tek baza kadar çoğunlukla ve iki ya da daha fazla baz için daima farklı dizilerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır [116]. Okumaların düzeltilmesi sırasında hem dizileme işleminde ve PCR nokta hataları hem de krimeralar uzaklaştırılmaktadır [116]. Biyoinformatik analizlerin bir sonraki aşaması da PCR işlemi sırasında ortaya çıkan hatalı DNA kopyaları olan krimeraların uzaklaştırılmasıdır. Aksi halde aynı DNA parçasının iki ya da daha fazla kopyası sürekli

olarak birleşerek tek bir dizi oluşturmasına ve bu dizinin aslında örnekte bulunmayan bir taksona atanmasına sebep olabilir.

Bir OTU'da en az miktarda bulunan örnekler, daha yüksek miktarda bulunan örneklerden çok daha düşük sayılara sahipse bu örnekler muhtemelen çapraz-seslerden kaynaklanmaktadır ve aslında sıfır değerinde olmalıdır. Uygulamalarda nadiren işleme alınan ve okumaların yanlış örneklere atanmasına sebep olan bu durumun engellenmesi için UNCROSS algoritması dizileme sonuçlarına uygulanması gerekir [117].

Yapılan çalışmaların sonunda elde edilen dizilerden taksonomik atamaların yapılabilmesi için hem 16S ribozomal RNA geni hem de fungal ITS bölgesi için USEARCH içinde bulunan Syntax algoritması kullanılabilir [118].

Çalışılan materyale göre değişen çeşitlilik ölçümlerinden olan alfa çeşitlilik indeksi bir habitat içindeki ya da topluluk içindeki çeşitliliği ölçmek için kullanılmaktadır. Bu ölçüm yöntemi tür zenginliği (richness) ve eşitlik (evenness) olarak iki bileşenden oluşurken, heterojenlik indeksleri de bu iki bileşeni bir araya getirerek belirlenir [119,120]. Aynı zamanda çeşitlilik indeksi olarak da bilinen türlerin zenginliği (richness) bileşeni her birim alan ya da örnekteki bireylerin sayısını ve bu alanın tür içeriğini gösterir. Eşitlik indeksi (evenness) ise bir komünitedeki farklı türlerin bağıl varlıklarını dağılımlarının eşitliği açısından ifade etmektedir [119]. Bir ortamda farklı türlere ait eşit sayıda bireyler varken daha yüksek bir eşitlik indeksi hesaplanırken; bireylerin sayısı açısından değerlendirildiğinde bu ortam bir ya da birkaç baskın tür içeriyorsa daha düşük eşitlik indeksi bulunacaktır.

Alfa çeşitliliğinin hesaplanmasında çeşitli indeksler kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında kullanılan modellerden biri olan Shannon çeşitlilik indeksi gözlenen OTU'ların varlığını ölçerken hem zenginlik hem de eşitlik parametreleri hakkında bilgi vermektedir [121,122]. Diğer bir parametre olan Simpson indeksi ise bir örnekten rasgele seçilen iki bireyin aynı türe ait olma ihtimalini ölçmektedir. Shannon indeksi 0'dan sonsuza kadar değer alabilirken sonucun 0 olarak bulunması ortamda sadece bir tür

olduğunu göstermektedir. Simpson indeksi ise 0-1 aralığında değerler almakta ve indeksin 0 olarak hesaplanması sonsuz çeşitlilik olduğunu gösterirken 1 çeşitlilik olmadığını ifade etmektedir. Analizler sırasında hesaplanan son parametre olan “gözlenen türler” (observed species) ise bir örnekte bulunan özgün OTU’ları göstermektedir [121].

Alfa çeşitlilik indeksi karşılaştırmalarında örnekler arasındaki kütüphane büyüklükleri arasındaki farklılıkları düzenlemek için kullanılan yaklaşıma ise “Seyreltme (rarefaction)” denilmektedir [120,123]. Seyreltme işlemi en küçük örnekte yer alan örnek sayısından eşit ya da daha az sayıda olarak belirlenmiş bir örnek sayısı seçip ardından daha büyük örneklerden okumaları rasgele bir şekilde örnek sayısı bu eşik değere eşit olana kadar çıkarmayı içermektedir [120]. Böylece örnek büyüklükleri farklılıklarından bağımsız olarak çalışılan sistemlerin çeşitlilik ölçütleri belirlenebilmektedir. Bir seyreltme eğrisi grafiği plato şekline ulaştığında incelenen komünitenin yeterli ve makul örnekleme ile temsil edildiği kabul edilebilmektedir [124].

2.8. Metabolomik Yaklaşımlar ve Tarhananın Organik Asit ve Etanol İçeriği

Laktik asit bakterileri karbonhidrat metabolizması sırasında şekerleri kullanarak organik asit oluşturmakta ve oluşan çeşitli metabolitler bu mikroorganizmaların gelişimi sırasında kullanılmaktadır. Dolayısıyla, LAB fermantasyonu, insan sağlığına faydalı gıda biyoaktif bileşenlerinin, fonksiyonel ve organoleptik özelliklerinin ve biyolojik kullanılabilirliğinin zenginleşmesi için kullanışlı bir teknik olarak kabul edilmektedir [125]. Metabolomik ise biyolojik örneklerde yer alan çok sayıda metabolitlerin tespit edilmesi ve karşılaştırılması için kullanılan analitik teknikleri kapsamaktadır [126,127].

Gıda ürünlerinde metabolomik yaklaşımlar çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Bunlar; genetik seçim ve modifikasyonların etkisinin incelenmesi, organik ve konveksiyonel tarımın karşılaştırılması, gıda ürünlerinin coğrafik orijinlerinin tespit edilmesi, et, yumurta ve balık ürünlerinin kalitesi üzerine yetiştirme koşullarının etkisinin belirlenmesi, işleme tekniğinin gıda kalitesi üzerine etkisinin belirlenmesi ve belirli gıdalarda besin alımının sindirim üzerine etkilerinin araştırılması olarak sıralanabilir [128]. Bunun yanında fermente gıdalarda bakteriyel aktivite sonucu oluşan metabolitlerin miktar ve değişimlerinin belirlenmesi içinde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [125,129–

131]. Tarhana fermantasyonu sırasında LAB ve maya metabolizmaları ve bunların etkisini sırasında oluşan metabolitlerin değerlendirilmesi amacıyla; meydana gelen bazı organik asitler ve etanolün miktar ve süreç boyunca değişimleri analitik tekniklerle incelenecektir.

Mikrobiyal metabolizmanın tipik bir ürünü olan organik asitler, yapıları karbon iskeletine dayanan ve doğal olarak çeşitli bitkisel ve hayvansal maddelerin yapısında bulunan moleküllerdir. Fermente gıdaların flavor ve lezzetinin, gıdada oluşan organik asitler, serbest amino asitler, ve asetaldehit ve diasetil gibi karbonil bileşiklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [10]. Tarhana benzeri gıdalarda enzimatik ve kimyasal reaksiyonların yanı sıra mikroorganizmalar, bunların birbirleriyle olan etkileşimleri ve proteolitik, lipolitik ya da amilolitik aktiviteleri sonucu son ürünün duyuşsal karakteristiklerini etkilemektedir [21].

Tarhana hamurunda LAB tarafından oluşturulan laktik asit, asetik asit, propiyonik asit gibi organik asitlerin antimikrobiyal etkisi olduğu bilinmektedir. Bu antagonistik etki asitlerin, membran potansiyelinin korunması ile etkileşime giren ve aktif transportu engelleyen bakteriyel sitoplazmik membran üzerindeki aktivitesinden kaynaklanmaktadır [1]. Asetik asit mayalar, küfler ve bakteriler için inhibe edici özellikte iken, propiyonik asit mayalar ve bakterilere karşı antimikrobiyal özellik göstermektedir. Bunlara karşı asetaldehit ve etanolün fermente gıdalarda oluşan miktarı antimikrobiyal etki açısından minimal değerdedir [1].

Tarhana fermantasyonu sırasında hamurda yer alan ana organik asitin laktik asit olduğu; asetik, propiyonik, sitrik ve ve pürivik asitlerin küçük miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir [10,26]. Tarhana hamurunda yer alan laktik, asetik ve propiyonik asit varlığı; yoğurtta yer alan homo- ve heterofermantatif LAB ile unda yer alan laktik, asetik ve propiyonik asit bakterileri ve oluşan laktik asiti substrat olarak kullanan propiyonik asit bakterilerine bağlanmıştır. Ayrıca LAB'nin laktozdan laktik asit üretirken, minör miktarlarda asetik, bütirik, propiyonik, izovalerik, kaprik ve kaproik asitler meydana geldiği belirtilmiştir.

2.8.1. Organik Asitlerin Yapısı

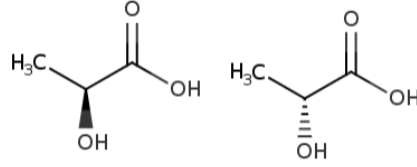
Doymuş düz zincirli monokarboksilik asit içeren organik asitler içerdikleri karboksilik asitlerin sayısına göre sınıflandırılırlar [132]. Bu organik asitlerin türevleri de doymamış, hidroksilik, fenolik ve multikarboksilik asitlerden oluşabilir. Fiziksel özellikleri açısından su içerisinde tamamen disosiyeye olmayan organik asitlerin çoğu, organik çözücüler içerisinde oldukça çözünürdür. Asitlik özellikleri değerlendirildiğinde ise; fenol, enol, alkol, ve tiol grupları içeren organik asitler, karboksilik asitlerden daha zayıf asitlerdir [132].

Bitki ve hayvanlarda doğal olarak üretilen organik asitler, antimikrobiyal aktiviteleri, koruyucu ve düzenleyici özellikleri ile flavor ve kalite üzerine olumlu etkileri sebebiyle gıdalarda doğrudan katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [133]. Mikroorganizmaların da tipik biyokimyasal metabolik proseslerinin ürünü olan organik asitlerin çoğu metabolik orijinine göre TCA ve glikoliz yolları ya da glukozun doğrudan oksidasyonu ile oluşmaktadır [134].

2.8.1.1. Laktik Asit

Bir hidroksi asit olan laktik asit (Şekil 2.19) kiral bir karbon atomu içerir, $C_3H_6O_3$ formülüne sahiptir ve iki adet enantiomerik formu vardır [135]. GRAS olarak sınıflandırılan laktik asit orta derecede güçlü bir asittir ve bitter bir tada sahiptir. Gıdalarda doğal olarak bulunmayan ancak fermantasyon sonucu bazı etler, peynirler, zeytinler ve turşlarda oluşan laktik asidin gıdalarda asitlendirici, flavor ajanı, buffer ajanı ve koruyucu olarak işlevleri vardır.

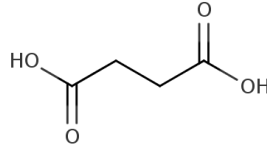
Doğal olarak 2 adet optik izomeri olan laktik asit, D(-)-laktik asit ve L(+)-laktik asit formlarında bulunabilirken, ayrıca bunların rasemik karışımı da çeşitli gıdalarda düzenleyici olarak kullanılabilir [132]. Gıdalarda kullanımı tercih edilen form olan L(+)-laktik asit insan metabolizması ve L-laktat dehidrogenaz enzimi tarafından kullanılabilir [133,134].



Şekil 2.19. Laktik asit stereoizomerlerinin kimyasal yapısı [135].

2.8.1.2. Süksinik Asit

Doğal olarak bitki ve hayvan dokularında bulunan süksinik asit (Şekil 2.20) dört karbon atomlu bir dikarboksilik asittir ve molekül formülü C₄H₆O₄'dır. Canlı organizmalarda anyon formu süksinat halinde bulunan süksinik asit, elektron taşıma zincirinde (ETS) süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından fumarata çevrilerek ve hücrenel metabolik durumu yansıtan bir sinyal molekülü olarak metabolik ara ürün görevleri almaktadır [136]. Gıdalarda kenetleyici, buffer ve nötrleştirme ajanı olarak görev alan bu asit E363 koduyla gıda katkısı olarak piyasada yer almaktadır [133,136].

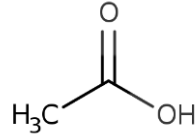


Şekil 2.20. Süksinik asitin kimyasal yapısı [136].

2.8.1.3. Asetik Asit

Bilinen en eski kimyasallardan birisi olan asetik asit (Şekil 2.21) doğal olarak meyvelerin bozulması sırasında oluşur ve yalnızca bir COOH grubuna sahip olan zayıf bir asittir ve C₂H₄O₂ formülüyle gösterilir. [133]. Genel olarak güvenli (GRAS) kabul edilen asetik asit, dünya genelinde gıda katkısı ve koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Asetik asit gıda ürününe güçlü bir aroma profili kazandırmakla birlikte, o üründe bulunan diğer aroma maddelerinin etkinliğini de arttırmaktadır [133]. Zayıf bir asit olan asetik asit mikrobiyal

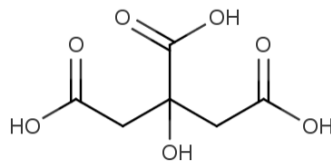
hücrelere hızlı ve kolayca difüze olarak, sitoplazmaya yeterli miktarda proton bırakmakta ve pH'ı önemli ölçüde etkileyerek antimikrobiyal aktivite göstermektedir [137].



Şekil 2.21. Asetik asitin kimyasal yapısı [138].

2.8.1.4. Sitrik asit

Popüler bir asitleştirici olan sitrik asit (Şekil 2.22), üç adet COOH grubuna sahip olan bir hidroksi asittir ve gıdalarda ve ilaç endüstrisinde en yaygın olarak kullanılan organik asitlerden birisidir. Hidrofobik gruplardan iki kat daha fazla hidrofilik gruba sahip olduğu için suya karşı güçlü afinite gösterir. Bu organik asit ortamda bulunan çift değerlikli metal iyonlarını şelatlayarak mikroorganizmaların gelişimini inhibe eden lipofilik, disosiy olmuş bir şelatördür [133]. Bütün aerobik organizmaların metabolizmasında gerçekleşen sitrik asit döngüsünde yer alan bir ara üründür. Fermantasyonun tipik bir ürünü olan sitrik asit, hoş tadı, flavor zenginleştirici karakteristikleri ve yüksek derecede çözünürlüğü ile gıda endüstrisinde önemli bir yer teşkil etmektedir.

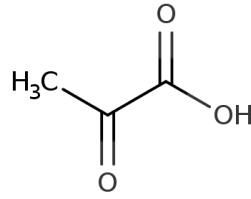


Şekil 2.22. Sitrik asitin kimyasal yapısı [139].

2.8.1.5. Pirüvik Asit

Kimyasal formülü $C_3H_4O_3$ olan pirüvik asit (Şekil 2.23), bir karboksilik asit ve bir keton fonksiyonel grupları içeren en basit alfa-keto asittir [140]. Pirüvik asitin konjuge bazı olan pirüvat hücrede gerçekleşen birçok metabolik aktivitede ara ürün olarak

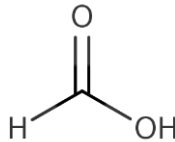
bulunmaktadır. Pirüvik asit glikoliz yoluyla glukozdan oluşabilirken, glukoneojenez ile karbonhidratlara ve asetil-CoA ile reaksiyona girerek yağ asitlerine dönüşebilir [140]. Ayrıca alanin üretiminde kullanılabilir ve fermantasyon yoluyla etanol ya da laktik asite dönüşebilir [140]. Endüstriyel olarak da eczacılık ürünlerinin biyosentezinin başlangıç materyaliyken, tohum koruma ajanı, polimerler, kozmetik ürünleri ve gıda takviyelerinin üretiminde kullanılır [141].



Şekil 2.23. Pirüvik asitin kimyasal yapısı [140].

2.8.1.6. Formik Asit

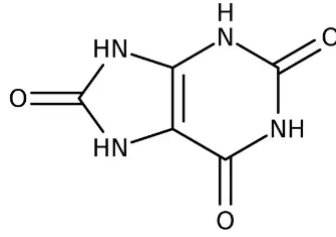
En kısa zincirli organik asit olan formik asit (Şekil 2.24) CH_2O_2 formülü ile gösterilir ve ilk olarak kuru distilasyon ile karıncalardan elde edilmiştir [132]. Aldehidik asitliği ve indirgen özellikleri sayesinde hayvan beslemede kullanılan formik asitin tadı ve buruk kokusu nedeniyle yüksek miktarlarda kullanım olanakları kısıtlıdır [132]. Formik asit ve türevleri hayvan yemleri ve içme sularında antimikrobiyal etki için kullanılmaktadır. Antimikrobiyal etkisi sırasında mikrobiyal hücrelere difüze olarak hızlı bir şekilde birikmekte ve mikrobiyal hücrenin membran pH'nı düşürerek sitoplazmanın asitleşmesine sebep olmaktadır [133].



Şekil 2.24. Formik asidin kimyasal yapısı [142].

2.8.1.7. Ürik Asit

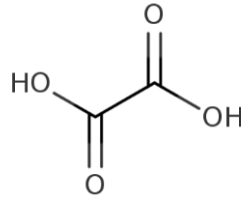
Ürik asit (Şekil 2.25) hayvan ve bitkilerde bulunan en önemli nitrojen bileşiklerinden birisidir ve $C_5H_4N_4O_3$ formülü ile gösterilir. Uygun fizyolojik koşullar altında karşılık gelen ürata dönüşebilen bir keto-enol tautomerizmi şeklinde bulunan bir 2,6,8 trihidroksipürin içerir [143]. Bitkilerde ve hayvanlarda doğal olarak bulunabildiği gibi bakteriler ve mayalar tarafından da üretilebilir. Zayıf bir asit olan ürik asit antioksidan, güçlü bir peroksinitrit ve reaktif oksijen türleri temizleyicisidir [144].



Şekil 2.25. Ürik asidin kimyasal yapısı [145].

2.8.1.8. Okzalik Asit

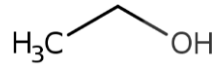
Bitkilerin yeşil yapraklarında yüksek miktarda bulunan ve zeytin meyvesindeki ana asitlerden biri olan okzalik asit (Şekil 2.26) en basit dikarboksilik asittir ve $C_2H_2O_4$ formülü ile gösterilir [146]. Okzalik asidin en önemli kimyasal özelliği çok değerlikli kationlarla şelat oluşturabilmesidir [147]. Doğada kayalarda, mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda serbest asit olarak bulunabilen okzalik asit, daha yaygın olarak ise potasyum ya da kalsiyum tuzu halinde görülmektedir [80,148].



Şekil 2.26. Okzalik asidin kimyasal yapısı [146].

2.8.1.9. Etanol

Primer alkollerin ikinci üyesi olan etanol (Şekil 2.27), C₂H₅OH formülü ile gösterilir. Hem alkan ethandan türemiş hidrofobik bir kısım hem de polar hidroksil grubu içeren etanol amfililik özellik göstermektedir [149]. Ayrıca, hidroksil grubunda bulunan hidrojen atomu yüksek derecede elektronegatif bir element olan oksijene bağlıdır. Böylece hidroksil grubu aracılığıyla diğer etanol molekülleriyle hidrojen bağı yapabilmesi, etanolün yüksek bir kaynama sıcaklığına sahip olmasını açıklamaktadır [150]. Medikal alanlarda hipnotik, antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılan etanol, aynı zamanda alkollü içkilerin alkolüdür.



Şekil 2.27. Etanolün kimyasal formülü [151].

Omik bilimi, kapsadığı analitik tekniklerin hatasız ve kesin sonuçları sayesinde çalışılan bir biyolojik sistemin fonksiyonlarını anlamamızı sağlamaktadır [131]. Bu tez çalışmasının amacı farklı geleneksel tarhana çeşitlerinin fermantasyon süreçleri boyunca mikrobiyotadaki değişimlerinin incelenmesi ve bu değişimlerin oluşan metabolitlerle ilişkisinin değerlendirilmesidir. Bu ilişkilerin değerlendirilmesinde çeşitli omik teknolojilerden yararlanılacaktır.

Çalışmanın amacı doğrultusunda çalışma boyunca ulaşılmaması gereken hedeflerin ilki geleneksel reçetelere uygun olarak ve yerel hammaddeler kullanılarak tarhana hamurlarının hazırlanması ve fermantasyona bırakılmasıdır. İkinci aşamada ise fermantasyon süreçlerinin izlenmesi amacıyla pH, titrasyon asitliği ve diğer kimyasal analizler yapılacaktır. Belirlenen günlerde hamurlardan örnekler alınarak klasik mikrobiyolojik yöntemlerle farklı besiyerlerine ekimler yapılacak ve mikroorganizma yüklerindeki değişimler gözlenecektir. Bu ekimler sonucunda elde edilen saf izolatlar MALDI TOF MS cihazı ile kültüromik yaklaşımlarla tanımlanacaktır. Ayrıca tarhana hamurlarının bakteriyel ve fungal mikrobiyotasındaki değişimlerin fermantasyon süreci boyunca değişimi metagenomik yaklaşımlarla yüksek çıktılı dizileme yöntemleri ve

biyoinformatik analizlerle belirlenecektir. Hamur mikrobiyotalarındaki değişimlerle paralel olarak bu hamurların metabolomik değerlendirmesi için HPLC ve GC cihazları kullanılarak organik asit ve etanol içerikleri tespit edilecektir. Son aşamada ise elde edilen metagenomik ve metabolomik veriler bütünleştirici analizler kullanılarak birlikte değerlendirilecektir. Kullanılacak bütünleştirici analizler; metagenomik verilerin incelenmesi için temel bileşen analizleri; metabolitlerin tarhana çeşidi ve örnek alınan zamana göre değişimlerinin değerlendirilmesi için ısı haritaları oluşturulması ve mikrobiyota-metabolit ilişkilerinin ortaya koyulabilmesi için korelasyon analizleridir. Bu hedeflere ulaşılması ile geleneksel reçete ve hammaddeler kullanılarak hazırlanan tarhana çeşitlerinin kimyasal, mikrobiyolojik ve metabolik açıdan karakterizasyonunu ve incelenen parametrelerin fermantasyon boyunca değişimleri belirlenecektir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Farklı Tarhana Tiplerinin Laboratuvar Ortamında Üretilmesi

3.1.1. Malzemeler

Farklı illere ait geleneksel reçetelerle gerçekleştirilen tarhana fermantasyonları için gerekli olan malzemeler, reçetenin ait olduğu illerden temin edilirken; baharatlar, tuz ve un gibi bileşenler aynı marka ve parti numarası olacak şekilde satın alınarak Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Süt Ürünleri Gen Bankası Laboratuvarı'na hamur hazırlama ve fermantasyon prosesleri için uygun saklama koşulları altında getirilmiştir [152]. Kullanılan malzemeler ve özellikleri her tarhana çeşidine ait üretim alt başlığında verilmiştir.

3.1.2. Tarhana Hamurlarının Hazırlanması ve Fermantasyonu

Hazırlanan bu tez çalışmasında Isparta, Kahramanmaraş, Bursa, Kastamonu ve Uşak illerine ait geleneksel reçetelerle üretimi yapılan 5 farklı tarhana kullanılacaktır. Tarhana üretiminden önce çiğ sebzelerin istenmeyen kısımları uzaklaştırılmış ve tüm sebzeler yıkanmıştır. Tüm tarhana hamurları oda sıcaklığında hazırlanmış ve fermantasyon prosesi $28^{\circ}\text{C}\pm 1$ 'de inkübatörde gerçekleştirilmiştir [152]. Bu tarhana hamurlarına uygulanacak fermantasyon süreleri Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada hazırlanacak tarhana çeşitlerinin fermantasyon süreleri

Tarhana çeşidi	Fermantasyon süresi
Isparta tarhanası	1 gün
Maraş tarhanası	1 gün
Bursa tarhanası	10 gün
Kastamonu tarhanası	15 gün
Uşak tarhanası	21 gün

3.1.3. Isparta Tarhanası Hazırlanması ve Fermantasyonu

Isparta tarhanası üretimi için doğranmış soğan (1000 g) ve acı yeşilbiber (500 g) tuz (20 g) eklenerek pişirilmiştir. Bu karışım ev tipi blender (Sinbo, SHB 3147, Türkiye) kullanılarak parçalanmış ve süzülerek sebze parçaları ayrılmıştır. Kalan sıvı içerisinde aşurelik buğday (1000 g) kaynatılmıştır. Yoğurt (1000 g), doğranmış maydonoz (100 g), dereotu (100 g) ve taze nane (100 g) karıştırılarak yoğurt harcı hazırlanmıştır. Bir avuç buğday bir avuç yoğurt harcı eklenerek tarhana hamuru hazırlanmış ve 24 saat fermantasyona bırakılmıştır [24,44].



Şekil 3.1. Isparta tarhanası.

Çizelge 3.2. Isparta tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.

Malzemeler	Özellikleri
Aşurelik buğday (<i>Triticum durum</i>)	Yerel marketten açıkta kilogramlık satılır şekilde temin edilmiştir.
Süzme yoğurt	Yerel marketten temin edilmiştir.
Kuru soğan (<i>Allium cepa</i>)	Yerel pazardan temin edilmiştir.
Acı yeşilbiber (<i>Capsicum frutescens</i>)	Yerel pazardan temin edilmiştir.
Dereotu (<i>Anethum graveolens</i>)	Yerel pazardan temin edilmiştir.
Taze nane (<i>Mentha spicata</i>)	Yerel pazardan temin edilmiştir.
Maydanoz (<i>Petroselinum crispum</i>)	Yerel pazardan temin edilmiştir.
Tuz	Deniz Tuzu, Billur Tuz, İzmir, Türkiye

3.1.4. Maraş Tarhanası Hazırlanması ve Fermantasyonu

Maraş tarhanası hazırlanması için Maraş dövmesi (1000 g) kaynatılmış ve ardından soğuması için 6 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır. Süre sonunda keçi yoğurdu (2000 g), tuz (20 g), kekik (100 g) ve Maraş dövmesi karıştırılıp 24 saat boyunca fermantasyona bırakılmıştır [24,44,153].



Şekil 3.2. Maraş tarhanası üretimi.

Çizelge 3.3. Maraş tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.

Malzemeler	Özellikleri
Maraş dövmesi (<i>Triticum durum</i>)	Kahramanmaraş ilinde haneden temin edilmiştir.
Keçi yoğurdu	Kahramanmaraş ilinde haneden temin edilmiştir.
Tuz	Deniz Tuzu, Billur Tuz, İzmir, Türkiye
Kekik	Kahramanmaraş ilinde haneden temin edilmiştir.

3.1.5. Bursa Tarhanası Hazırlanması ve Fermantasyonu

Bursa tarhanası üretimi için ilk aşama olarak ticari ekmek mayası (42 g) ve un (500 g) kullanılarak bir kek hamuru hazırlanmış ve her gün yoğurularak 3 gün fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyonun 3. günde karışıma pastörize süt (1000 g), yeşil acı biber

(500 g), poy (25 g), un (500 g) ve tuz (20 g) eklenerek sert bir hamur hazırlanmış ve karıştırmaya her gün devam edilerek fermantasyon 10. günde tamamlanmıştır [24,44].



Şekil 3.3. Bursa tarhanası üretimi.

Çizelge 3.4. Bursa tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.

Malzemeler	Özellikleri
Ekmek mayası	Pakmaya, Yaş maya, Kocaeli, Türkiye
Buğday unu	Besintaş A.Ş., Bursa, Türkiye
İnek sütü	Çiğ olarak yerel süthaneden temin edilmiştir.
Poy	Bulgaristan'a özgü baharatlarla hazırlanan toz karışım
Karabiber	Akıncılar Baharat, Bursa, Türkiye
Tuz	Deniz Tuzu, Billur Tuz, İzmir, Türkiye
Acı yeşilbiber (<i>Capsicum frutescens</i>)	Mevsim sebzesidir ve pazardan temin edilmiştir.

3.1.6. Kastamonu Tarhanası Hazırlanması ve Fermantasyonu

Kastamonu tarhanası hazırlanması için ilk olarak doğranmış kuru soğan (165 g), domates (250 g), taze nane (7,5 g), maydonoz (7,5 g), dorak otu (15 g), yoğurt (1000 g) ve tuz (20 g) karıştırılarak bir yoğurt harcı hazırlanmış ve her gün karıştırılarak 7 gün fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyonun 7. gününde karışım süzölmüş ve kalan sıvı kısma doğranmış taze nane (7,5 g), dorak otu (7,5 g) ve un (1000 g) eklenmiştir. Elde edilen hamur her gün karıştırılarak 8 gün daha fermantasyona bırakılmıştır [24,44,47].



Şekil 3.4. Kastamonu tarhanası üretimi.



Şekil 3.5. Kastamonu tarhanası üretimi, yoğurt harcı aşaması bitimi.

Çizelge 3.5. Kastamonu tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.

Malzemeler	Özellikleri
Yoğurt	Yerel pazardan temin edilmiştir.
Domates (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Mevsim sebzesidir ve pazardan temin edilmiştir.
Kuru soğan (<i>Allium cepa</i>)	Mevsim sebzesidir ve pazardan temin edilmiştir.
Taze nane (<i>Mentha spicata</i>)	Mevsim sebzesidir ve pazardan temin edilmiştir.
Maydanoz (<i>Petroselinum crispum</i>)	Mevsim sebzesidir ve pazardan temin edilmiştir.
Kırmızıbiber (<i>Capsicum annum</i> L. Cv. <i>Kapya</i>)	Mevsim sebzesidir ve pazardan temin edilmiştir.

Acı yeşilbiber (<i>Capsicum frutescens</i>)	Mevsim sebzesidir ve pazardan temin edilmiştir.
Dorak otu (<i>Anethum graveolens</i>)	Mevsim sebzesidir ve pazardan temin edilmiştir.
Tuz	Deniz Tuzu, Billur Tuz, İzmir, Türkiye
Karabiber	Akıncılar Baharat, Bursa, Türkiye
Pul biber	Akıncılar Baharat, Bursa, Türkiye
Buğday unu	Besintaş A.Ş., Bursa, Türkiye

3.1.7. Uşak Tarhanası Hazırlanması ve Fermantasyonu

Uşak tarhanası üretimi için nohut (330 g), doğranmış kuru soğan (650 g), kırmızıbiber (650 g), domates (1000 g) ve kuru nane (30 g) karışımı 2 saat pişirilmiştir. Daha sonra bu karışım süzülerek kalan sebzeler bir el blenderı ile (Sinbo, SHB 3147, Türkiye) ile parçalanmış ve bir önceki yılın tarhanası (50 g), süzme yoğurt (330 g) ve un (1000 g) eklenmiştir [154]. Elde edilen hamur her gün karıştırılarak 21 gün fermantasyona bırakılmıştır [24,44].



Şekil 3.6. Uşak tarhanası üretimi.

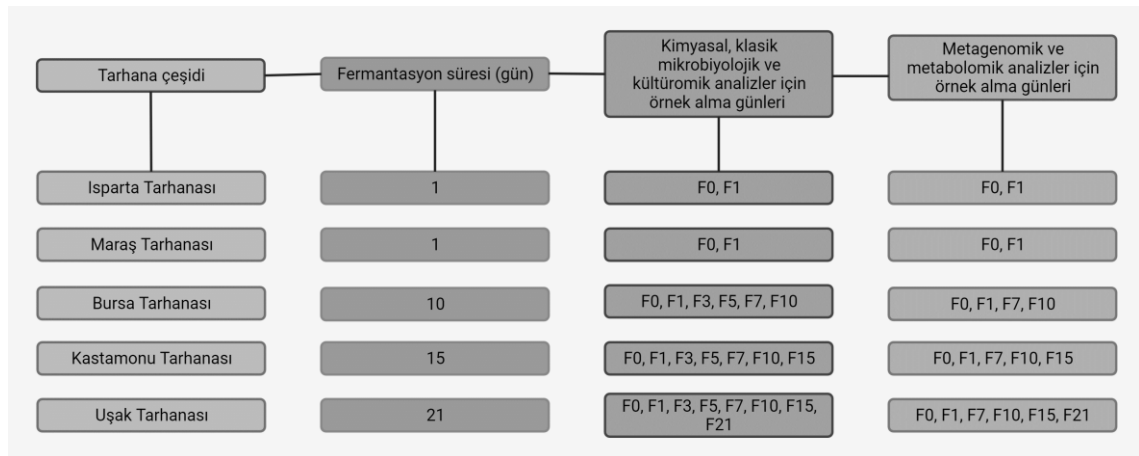
Çizelge 3.6. Uşak tarhanası üretiminde kullanılan malzemeler.

Malzemeler	Özellikleri
------------	-------------

Domates (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Uşak ilinde haneden temin edilmiştir.
Kırmızıbiber (<i>Capsicum annum</i> L. Cv. <i>Kapya</i>)	Uşak ilinde haneden temin edilmiştir.
Kuru soğan (<i>Allium cepa</i>)	Uşak ilinde haneden temin edilmiştir.
Süzme yoğurt	Uşak ilinde haneden temin edilmiştir.
Nohut (<i>Cicer arietinum</i>)	Uşak ilinde haneden temin edilmiştir.
Bir önceki yılın tarhanası	Uşak ilinde haneden temin edilmiştir.
Kuru nane	Uşak ilinde haneden temin edilmiştir.
Tuz	Deniz Tuzu, Billur Tuz, İzmir, Türkiye
Buğday unu	Besintaş A.Ş., Bursa, Türkiye

3.1.8. Tarhana Hamurlarından Örnek Alınma Planı

Farklı yörelere ait geleneksel tariflerle ve hammaddelerle üretilen ve farklı fermentasyon sürelerine sahip tarhana hamurlarının kimyasal ve metabolik özellikleri ile mikrobiyotaların belirlenmesi için hazırlanan örnek alma planı Şekil 3.7'deki gibidir. Belirtilen günlerde paralelli olarak alınan örnekler steril numune kaplarında -20°C'de saklanmış ve tüm analizler 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.



Şekil 3.7. Tarhana hamurlarından örnek alma planı.

3.2. Kimyasal Analizler

3.2.1. pH ve Asitlik Tayini

Örneklerde pH ve asitlik tayini (%67'lik etanol kullanılarak bulunan) analizleri TS 2282 [23]'ye göre gerçekleştirilmiştir. Örneklerin pH değerlerinin belirlenmesi için 5 g tarhana örneğine 25 ml distile su eklenerek stomacher cihazında homojenize edilmiştir. Ardından pH değerleri pH metre (WTW Inolab pH 720, Washington DC, ABD) kullanılarak belirlenmiştir.

Asitlik tayini analizleri için, 10 g tarhana tartılarak bir Erlenmeyer içerisine konulmuştur. Üzerine 50 ml (20°C da) % 67 (v/v)'lik nötrleştirilmiş etil alkol (Bio-Rad, California, ABD) koyulup, kapağı kapatılarak 5 dakika kuvvetle çalkalandıktan sonra Whatman No. 1004 150, por çapı 20-25 µm filtre kağıdından süzümüştür. Bu süzüntüden 10 ml alınıp, üzerine damıtık su katılarak rengi açılmıştır. Birkaç damla fenolfitalein belirteç çözeltisi konularak değişmeyen pembe renk oluşana kadar 0,1 N sodyum hidroksit (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) çözeltisi ile titre edilmiştir. Harcanan sodyum hidroksit çözeltisinin miktarı 5 ile çarpılarak tarhananın asitlik derecesi bulunmuştur.

3.2.2. Yağ Miktarı Tayini

Tarhana örneklerinde yağ miktarı tayini TS EN ISO 659 [155]'a göre Soxhlet cihazı kullanılarak yapılmıştır. Örneğin nem içermemesi gerektiğinden 10-15 gram numune (m) etüvde 105°C'de 1-2 saat kurutulmuştur. Analizde kullanılacak balonlar etüvde 105°C'de sabit tartıma gelene kadar bekletildikten sonra soğutulup, tartılarak dala kaydedilmiştir (m₁). Balona ve gövdeye yeterli miktarda (yaklaşık 1.5 sifon yapacak kadar) Petrol Eteri (40-60°C) ilave edilmiştir. Balon, ekstraktör ve geri soğutucu birbirine bağlanıp ısıtıcı tabla üzerine yerleştirilmiş ve 6 saat ekstraksiyon uygulanmıştır. Balonun içerisindeki çözücünün büyük bir kısmı damıtılarak geri alınmıştır.

Geriye kalan az miktardaki çözücünün uzaklaştırılması için cam balon 103±2°C'ye ayarlı etüve alınıp ve sabit tartıma gelene kadar etüvde bekletilmiş ve tartılmıştır (m₂). Sonuçlar %yağ olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Yağ} = ((m_2 - m_1) / m) \times 100$$

3.2.3. Protein Miktarı Tayini

Tarhana örneklerinde protein miktarı tayini AOAC 990.03 [156]'e göre LECO FP 528 (Leco Inc., St. Joseph, ABD) cihazında yapılmıştır. Homojen hale getirilmiş örneklerin 850-950°C sıcaklıkta saf oksijenle (%99,9) yakılması sonucu açığa çıkan azot, Helyum gazı ile ısı iletim detektörüne taşınıp ölçülmüş ve protein faktörü 6,25 ile çarpılarak %protein olarak hesaplanmıştır.

3.2.4. Kül Miktarı Tayini

Tarhana örneklerinde kül miktarı tayini TS EN ISO 2171 [157]'e göre yapılmıştır. Yapılan analiz tarhana örneklerinin 900±25°C veya 550±10°C sıcaklıktaki oksitlendirici bir atmosferde organik maddeler tamamen yanıcaya kadar yakılması ve daha sonra elde edilen kalıntının tartılması ilkesine dayanır. 900°C'da kullanıma uygun küllendirme kapsülleri için, önceden temizlenmiş kapsüller 5 dakikalığına yakma fırınına konularak yakma sıcaklığına getirilmiş, desikatörde soğumaya bırakılmış ve daha sonra 0,1 mg yaklaşımla tartılmıştır (m₀). Tarhana örnekleri yaklaşık 3 g olacak şekilde 0,1 mg hassasiyette tartılmıştır (m). Kapsüllerin içindeki tarhana örneklerine etanol ile ön yakma işlemi uygulanmıştır. Daha sonra kül etme işlemine geçilmiştir. Kalıntıdaki karbon parçacıkları dahil bütün madde yanana kadar yani 900 °C'de en az 1 saat veya 550 °C'de en az 4 saat devam edilmiştir. Küllendirme tamamlanınca kapsül kül fırınından çıkartılmış ve desikatörde soğumaya bırakılmıştır. Kapsül ortam sıcaklığına ulaştığında 0,1 mg yaklaşımla hızlıca tartılmıştır (m₁).

Kül miktarı, yüzde ağırlık olarak aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\% \text{ Kül miktarı} = ((m_1 - m_0) / m) \times 100$$

3.2.5. Kuru madde miktarı

Tarhana örneklerinde kuru madde miktarı tayini TS EN ISO 712 [158]'ye göre yapılmıştır. Tarhana örneklerinde 130±3°C 'da kurutulmasıyla ortaya çıkan kütle

kaybının tayinidir. Kurutma kabı kapağı ile birlikte 130°C'lik etüvde bir süre kurutulduktan sonra desikatöre alınmıştır. Laboratuvar sıcaklığına getirildikten sonra 0,1 mg hassasiyetle darası alınmıştır (m_0). İçine yaklaşık 5 g tarhana örneği konup 0,1 mg hassasiyetle tartılmıştır (m) ve 130-133°C±3°C' de olan etüvde 2 saat kurutulmuştur. Süre tamamlandığında kurutma kabı üstü kapatılarak etüvden çıkartılıp desikatörün içine koyulmuştur. Kurutma kapları oda sıcaklığına kadar soğuduğunda 0,1 mg hassasiyetle tartılmıştır (m_1).

Rutubet miktarı yüzde ağırlık olarak aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\% \text{ Kuru madde miktarı} = ((m_1 - m_0) / m) \times 100$$

$$\% \text{ Rutubet miktarı} = 100 - (\% \text{ Kuru madde miktarı})$$

3.3. Klasik Mikrobiyolojik Yaklaşımlar Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi

3.3.1. Kimyasal Malzemeler

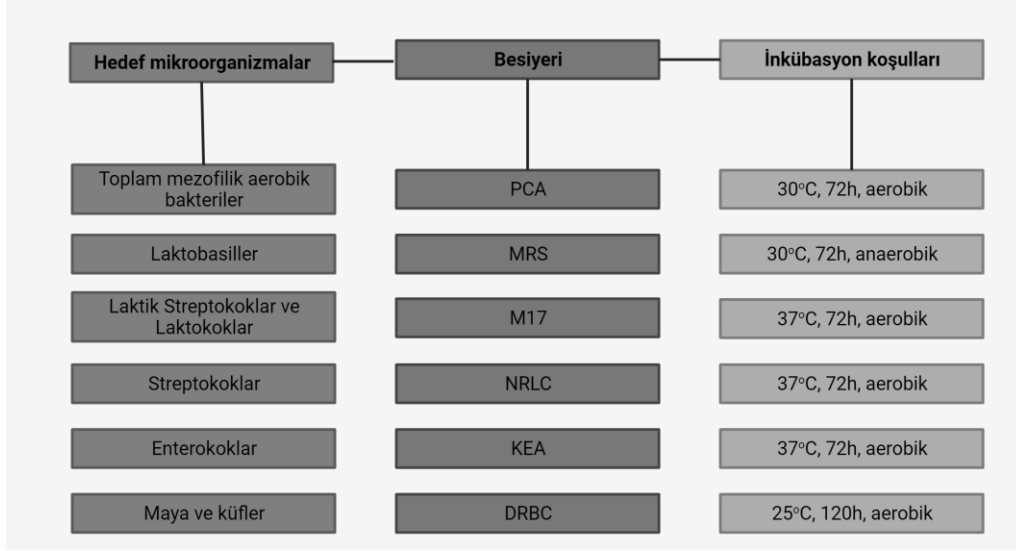
Örneklerden mikroorganizmaların izolasyonu için dilüsyonların hazırlanmasında Maximum Recovery Diluent (MRD, pH 6.8-7.2, Merck, Millipore) kullanılmıştır. Mikrobiyolojik ekimlerin yapılmasında toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı (TAMB) için Plate Count Agar (PCA, pH 7.0, Millipore); laktobasil suşlarının sayımı ve izolasyonu için de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS, pH 5.5-5.9, Merck, Millipore) ve broth (MRS, pH 6.0-6.4, Merck, Millipore); laktik streptokokların ve laktokokların sayımı ve izolasyonu için M17 agar (M17, pH 6.9-7.3, Merck, Millipore) ve broth (M17, pH 6.8-7.2, Merck, Millipore) kullanılmıştır. Yine streptokokların sayım ve izolasyonu için Neutral Red Chalk Lactose agar (NRLC, pH 6.6-7.0, HiMedia) ve enterokokların sayım ve izolasyonu için Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA, pH 6.8-7.2, Oxoid) besiyerlerine ekim yapılmıştır. Maya ve küflerin sayım ve izolasyonu için Dicloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC, pH 5.4-5.8, Merck, Millipore) besiyeri kullanılmıştır. Bu suşların sıvı besiyerine alınmasında Brain Heart Infusion Broth (BHI, pH 7.2-7.6, Merck, Millipore) kullanılmıştır. Ekimlerde kullanılan tüm besiyerleri talimatlara uygun şekilde hazırlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Anerobik

inkübasyon koşulları AnaeroPack (Mitsubishi Gas Chemical America, Inc., ABD) ile sağlanmıştır.

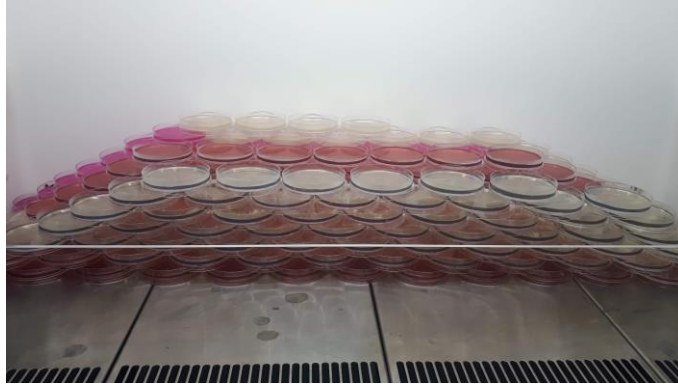
3.3.2. Tarhana Örneklerinde Mikroorganizmaların Sayımı ve İzolasyonu

Tarhana hamurlarından 10 g örnek alınarak 90 ml steril MRD eklenmiş ve stomacher'da 3 dakika parçalanmıştır. Daha sonra aseptik koşullar altında 9 ml MRD içerisinde 10^{-8} 'e kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Ekimler paralelli şekilde gerçekleştirilmiştir. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayısının belirlenmesi için PCA agara dökme plak yöntemi ile ekim yapılarak Petri kutuları 30°C'de 3 gün aerobik olarak inkübasyona bırakılmıştır [36]. Laktobasil suşlarının sayımı ve izolasyonu için MRS agar besiyerine dökme plak yöntemi ile ekim yapılmış ve Petri kutuları anaerobik jarlarda AnaeroPack kullanılarak 30°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Laktik streptokoklar ve laktokokların sayım ve izolasyonu için M17, streptokoklar için NRLC ve enterokoklar için KAA besiyerlerine yayma yöntemi ile ekim yapılmış 37°C'de 72 saat aerobik olarak inkübasyona bırakılmıştır. Fungal türlerin sayımı ve izolasyonu için DRBC agar besiyerine yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve Petri kutuları 25°C'de 5 gün aerobik olarak inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süreleri sonunda 30-300 koloni düşmüş Petri kutularından sayım yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Saf kolonilerin elde edilmesi için, farklı olduğu düşünülen kolonilerden tek koloni seçimleri yapılarak, koloninin seçildiği besiyerine çizme plak yöntemiyle ekim yapılmış ve Şekil 3.8'de her besiyeri için belirtilen koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Saf olduğu düşünülen koloniler uygun sıvı besiyerine alınarak MALDI TOF MS ile tanımlama analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.8. Hedef mikroorganizmalar, kullanılan besiyerleri ve inkübasyon koşulları.



Şekil 3.9. Mikrobiyolojik ekimler için kullanılan besiyerleri.

3.4. Kültüromik Yaklaşımlar (MALDI TOF MS) Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi

3.4.1. Kimyasal Malzemeler

Mikroorganizmalardan ribozomal protein ekstraksiyonu prosesinde etanol (absolute, Merck, Almanya), asetonitril (Merck) ve formik asit (%98-100, Merck) kullanılmıştır. Örneklerin hedef slayda yüklenmesi sırasında iyonlaşmanın gerçekleşebilmesi için matriks çözeltisi olarak bakteri hücrelerine VITEK MS CHCA (bioMérieux, Fransa) ve maya-küf hücrelerine VITEK MS FA (bioMérieux) uygulanmıştır.

3.4.2. Ribozomal Proteinlerin Ekstraksiyonu ve Mikroorganizmaların Tanımlanması

İzole edilen bakteriler, mayalar ve küflerin tanımlanmasında VITEK MS (bioMérieux) Matris Destekli Lazer Dezorpsiyon İyonlaştırma Uçuş Zamanı Kütle Spektroskopisi (MALDI TOF MS) sistemi kullanılmıştır.



Şekil 3.10. MALDI TOF MS cihazı.

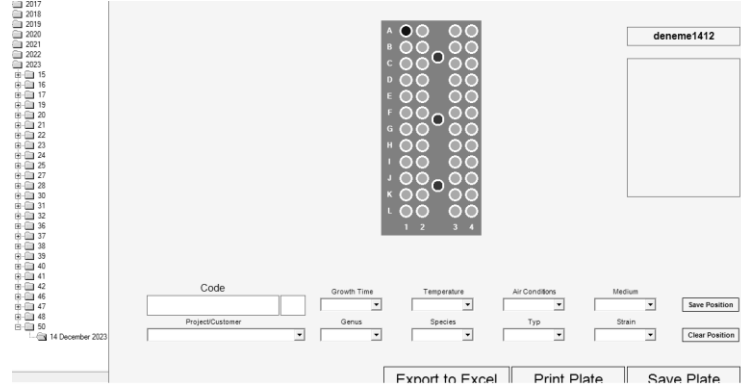
Mikroorganizmalardan ribozomal proteinlerin ekstraksiyonu için Freiwald [93] tarafından geliştirilen yöntem bazı modifikasyonlar uygulanarak kullanılmıştır. İlk olarak saf olduğu bilinen bakteriler uygun sıvı besiyerlerinden birine (MRS, M17 ya da BHI Broth) inoküle edilerek bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 2 ml örnek bir Eppendorf santrifüj tüpüne alınmış ve 10,000xg'de, oda sıcaklığında, 2 dakika santrifüjlenmiş ve ardından supernatant atılmıştır. Kalan pellet 1 ml distile su ile yıkandıktan sonra 10,000xg'de, oda sıcaklığında, 2 dakika santrifüjlenmiş ve yine supernatant uzaklaştırılmıştır. Bu yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra kalan pellet üzerine 300 µl çift distile su ve 900 µl etanol eklenmiştir. Bu karışım 10,000xg'de, oda sıcaklığında, 2 dakika santrifüjlenmiş ve supernatant atılmıştır. Ardından örnekler 55°C'de en az yarım saat bekletilmiştir. Süre sonunda pellet üzerinde kalan etanol-su karışımı pipet kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Pellete 50 µl %70'lik formik asit ve 50 µl saf asetonitril eklenmiştir. Pipetaj yapılarak pelletin iyice çözünmesi sağlanmıştır.

Çözünen pellet 10,000xg'de, oda sıcaklığında, 2 dakika santrifüjlenmiş ve supernatant yeni bir Eppendorf tüpe alınmıştır.

Ekstraksiyon sonucu elde edilen çözeltilerden 1 µl alınarak MALDI-TOF MS slaytına yerleştirilmiş, kuruması beklenmiş ve üzerine 1,5 µl matriks çözeltisi CHCA damlatılmıştır. Matriks çözeltisinin iyice kurduğundan emin olduktan sonra hedef slayt cihaza yerleştirerek okuma başlatılmıştır.

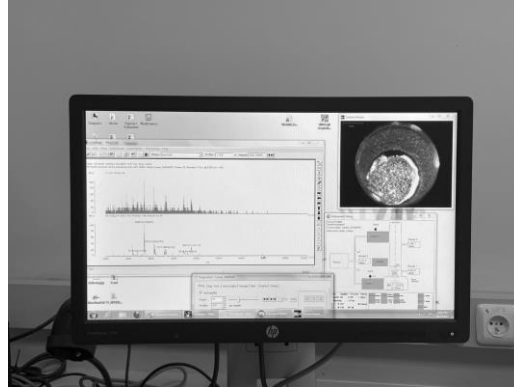
İzole edilen maya ve küflerin tanımlanması işleminde cihazla birlikte sağlanan VITEK MS FA çözeltisi kullanılmıştır. İlk aşama olarak %30'luk gliserol içerisinde -80°C'de saklanan maya/küf izolatları yeniden canlandırılarak DRBC agarda geliştirilmiştir. Bu kolonilerden bir adet seçilerek plastik öze yardımıyla alınmış ve hedef slayt üzerine sürülmüştür. Koloni üzerine 1 µl VITEK MS FA çözeltisi damlatılıp kuruması beklenmiştir. Kurumanın ardından koloniler üzerine 0,5 µl CHCA damlatılıp kurduğundan emin olduktan sonra hedef slayt cihaza yüklenmiştir.

“Hedef slayt” cihaza yüklendikten sonra “Hazırlık İstasyonu” bilgisayarında “SARAMIS Hedef Yöneticisi” programı açılarak slayt içeriği, örnek ve proje tanımlanarak bu bilgiler cihaza gönderilmiştir. Ardından Toplama İstasyonu bilgisayarına geçilerek “Launchpad” programı açılmış ve “Acquisition” seçeneğinden parametreler belirlenmiştir. Her analiz öncesinde taze pasajlanan *E. coli* ATCC 8739 suşu kullanılarak kalibrasyon gerçekleştirilmiş ve yapılan kalibrasyon için seçilen ayarlar, analizin de ayarları olarak kaydedilmiştir. Analiz başlatıldıktan sonra “Launchpad” ana penceresinden spektrum izlenerek analizde bir sorun olup olmadığı değerlendirilmiştir. Ham verilerin işlenmesi ve piklerin tespit edilmesi “Launchpad” yazılımıyla gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar oluşturulduktan sonra sonuçların görüntülenmesi, dendogramların elde edilmesi, superspektraların oluşturulması, kütleler ve spektraların karşılaştırılması “Hedef İstasyonu” bilgisayarında “SARAMIS” programından takip edilmiştir.



Şekil 3.10. MALDI TOF MS Hazırlık İstasyonu, örnek çalışma.

Çalışmada her örnek 2 kere analiz edilmiştir. Spektralar linear pozitif iyon ekstraksiyon modunda 2000-20000 Da aralığında elde edilmiştir. Her spektra 100 lazer atışı sonucunda 'Auto Quality' seçeneği aktif haldeyken oluşturulmuştur.



Şekil 3.11. MALDI TOF MS cihazında spektrumların elde edilmesi aşaması.

Sonuçların değerlendirilmesi aşamasında SARAMIS penceresinde verilen sonuçlar %99.9 doğru olanlar koyu yeşil renkte, %99.9-%90.0 doğrulukta olanlar açık yeşil renkte, %90.0-%80.0 doğrulukta olanlar sarı renkte, %80.0-%75.0 doğrulukta olanlar beyaz renkte ve tartışmalı olanlar kırmızı renkte gösterilmiştir.

1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1K10	01ara31	99.90	Family Enter	Enterococcus	faecium		142	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1K10	01ara42-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		108	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1K10	01ara41-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	brevis		187	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1J40	01ara40-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		166	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1J30	01ara39-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		137	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1J20	01ara38-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	laxus		113	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1J10	01ara37-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		166	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1I40	01ara36-1	97.50	Family Enter	Escherichia	coli		188	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1I30	01ara35-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		142	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1I20	01ara34-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		144	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1I10	01ara33-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		163	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0751_x1C10	01ara32-1	99.90	Family Enter	Escherichia	coli		172	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_x1B10	01ara31-1	99.90	Family Enter	Escherichia	coli		133	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1H40	01ara30-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		173	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1H30	01ara31-1	99.90	Family Enter	Enterococcus	faecium		152	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1H20	01ara30-1	96.00	Family Enter	Enterococcus	faecium		121	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1H10	01ara29-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		139	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1G40	01ara28-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		151	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1G30	01ara27-1	99.90	Family Enter	Enterococcus	faecium		174	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1G20	01ara26-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		196	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1G10	01ara25-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		133	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1F40	01ara24-1	99.90	Family Enter	Enterococcus	faecium		173	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1F30	01ara23-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		166	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1F20	01ara22-1	99.90	Family Enter	Enterococcus	faecium		171	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1F10	01ara21-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		117	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1E40	01ara20-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		122	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1E30	01ara19-1	99.90	Family Enter	Enterococcus	faecalis		167	CHCA
1 Dec 2023 9:36	BMX_000_0752_1E20	01ara18-1	99.90	Family Lacto	Lactobacillus	pentosus/plantarum		153	CHCA

Şekil. 3.11. MALDI TOF MS tanımlama penceresi, renk skorları örneği.

3.5. Metagenomik Yaklaşımlar Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi

3.5.1. Kimyasal Malzemeler

Tarhana örneklerinden DNA ekstraksiyonu ve izolasyonu için QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. DNA konsantrasyonlarının belirlenmesi için Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılmıştır. DNA dizileme analizleri Illumina MiSeq Reagent Kit v2, 500 döngü (Illumina, Inc., San Diego, CA, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. Genomik DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu yapılacak olan tarhana hamuru örneği bir spatula yardımıyla karıştırılarak 550±100 mg hamur alınmış ve 0.1 mm çapında 0.6 g cam boncuk ve 1 ml Inhibitex DNA ekstraksiyon buffer içeren 2 ml'lik vidalı tüp içerisine yerleştirilmiştir. Fastprep24 (MPBiomedicals, California, ABD) cihazı hız 4 ayarında kullanılarak 45 saniyelik 4 döngü ile boncuk ile parçalama işlemi gerçekleştirildikten sonra QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak DNA ekstraksiyonu kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir.

Inhibitex Buffer eklenen ve cam boncuklar yardımıyla homojenize edilen örnekler 70°C'de 5 dakika ısıtıldıktan sonra 15 saniye vortekslenmiştir. Çözelti, hamur

parçalarının pellet haline gelebilmesi için oda sıcaklığında 20,000xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Başka bir 2 ml santrifüj tüpü alınarak içerisine 15 µl Proteinase K ve 200 µl supernatant eklenmiştir. Supernatant üzerine 200 µl Buffer AL eklenmiş ve 15 saniye vortekslenmiştir. Bu karışım 70°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda lizata %96'lık etanolden 200 µl eklenerek vortekslenerek karıştırılmıştır. Kit içerisinden çıkan spin kolon içerisine bu lizattan 600 µl alınarak eklenmiş ve kapağı kapatılarak 1 dakika oda sıcaklığında 20,000xg'de santrifüjlenmiştir. Bu spin kolon, 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilerek süzüntüyü içeren tüp atılmıştır. Spin kolonun kapağı açılarak 500 µl Buffer AW1 eklenmiş ve oda sıcaklığında 20,000xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Ardından bu spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş ve spin kolon içerisine 500 µl Buffer AW2 eklenmiştir. Bu karışım oda sıcaklığında 20,000xg'de 3 dakika santrifüjlendikten sonra süzüntüyü içeren toplama tüpü uzaklaştırılarak tekrar 20,000xg'de 3 dakika daha santrifüjlenmiştir. Yeni bir 1.5 ml'lik santrifüj tüpü alınarak spin kolon içerisine yerleştirilmiş ve 200 µl Buffer ATE doğrudan membran üzerine pipetlenmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra DNA elüsyonu için 1 dakika santrifüjlenmiştir. Ekstraksiyon prosedürü sonucu her tarhana örneğinden 200 µl DNA izole edilmiştir.

3.5.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilen DNA'ların verimini belirlemek için PicoGreen ile floresan ışıma ölçümü yapılmıştır. Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit içerisinde bulunan TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5), PicoGreen reaktifinin hazırlanmasında, DNA örneğinin dilüsyonunda ve analizin kendisinde kullanılmıştır. Standart DNA eğrilerinin oluşturulması için TE buffer kullanılarak PicoGreen reaktifinin 200 kat dilüsyonu hazırlanmıştır. Kit içerisinde bulunan bakteriyofaj lambda DNA'sı TE buffer kullanılarak seyreltilerek 2 µg/ml dsDNA stok çözeltisi hazırlanmış ve konsantrasyonun belirlenmesi için 260 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. 5 noktalı kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında stok çözelti (1000 µl, 100 µl, 10 µl, 1 µl ve 0 µl) TE buffer ile plastik küvetler içinde seyreltilmiş ve her küvete daha önce hazırlanan 1 mL PicoGreen çalışma çözeltisi eklenmiştir. İyiye karıştırılarak ışık görmeyecek şekilde oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 520 nm'de ölçüm yapıp kör örnek için elde edilen ölçüm değeri diğer örneklerden çıkarılarak standart eğri hazırlanmıştır.

Örneklerden ölçüm yapılırken, küvet içerisinde son hacim 1 ml olacak şekilde TE buffer kullanılarak seyreltme yapılmıştır. Ardından küvetlere 1 ml PicoGreen çalışma çözeltisinden eklenerek ışık görmeden oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Yine kör ölçümünden elde edilen absorbans değeri örneklerden çıkarılmış ve daha önce elde edilen DNA standart eğrisinden yararlanarak izole edilen DNA konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.5.4. Amplikon Temelli Metagenomik Analizler için DNA Dizilemesi

Tarhana hamurlarından elde edilen DNA'ların dizilemesinde amplikon dizileme yaklaşımı kullanılmıştır. Bakteriyel 16S rRNA geninin çoğaltılması için V3 ve V4 bölgelerinin primer çifti olan 341F (5'- CCT ACG GGN GGC WGC AG -3') ve 802R (5'- GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC -3'), ve fungal 18S rRNA geninin ITS2 bölgelerinin çoğaltılması için ise primer çifti ITS3 (5'- GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC -3') ve ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'), 2-adımlı Nextera PCR kütüphanelerinin kit prosedürü izlenerek hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu PCR kütüphanelerinin dizilemesi işlemi Illumina Miseq Reagent Kit v2 (500 döngü) kullanılarak Illumina Miseq platformunda Microsynth AG (Balgach, İsviçre) tarafından gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen çıktılar biyoinformatik analizlerle değerlendirilmiştir.

3.5.5. Biyoinformatik Analizler

Dizileme analizleri sonucunda Illumina'nın 'chastity filter'ından geçen çift uçlu okumalardan adaptör kalıntılarının uzaklaştırılması işleminde Illumina Miseq gerçek zamanlı analiz yazılımı kullanılmıştır. Kalan verilerin kalite analizleri FastQC (v0.11.8) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir [108]. Bölgelere spesifik olan bakteriyel DNA için V3-V4 primerleri ve mayalar için ITS2 primerleri dizilerden CUTADAPT (v1.18) yazılımı kullanılarak çıkarılmıştır [112]. Primerin uzaklaştırılmadığı çift uçlu okumalar sonuçlardan çıkarılmıştır. Her çift uçlu okumanın kesilmiş ileri ve geri okumaları USEARCH (v11.0.667) yazılımı kullanılarak en az 15 baz çakışması olan moleküller değerlendirilerek bilgisayar ortamında yeniden oluşturulmuştur [113]. Birleştirilen diziler, her birleştirilmiş dizide en fazla bir beklenen hataya izin verilerek tekrar kalite filtresinden geçirilmiştir. Belirsiz bazlar ve amplikon büyüklük dağılımına aykırı değerler

içeren okumalar da çıkarılmıştır. 3000'den daha az birleştirilmiş okuma sonucu elde edilen örnekler istatistiksel değerlendirmenin bozulmaması için çıkarılmıştır. 18S rRNA bölgesine ait okuma sonuçlarından ITS2 yan bölgelerinin elde edilmesinde ITSx yazılımı (suit v1.0.11) ve bu yazılımda yer alan fungi veritabanı kullanılmıştır [115]. USEARCH uygulamasında yer alan UNOISE algoritması kullanılarak kalan okumalardan gürültüler uzaklaştırılmış ve süreçte yer alan tekillen ve krimeralar atılarak operasyonel taksonomik üniteler (OTU) oluşturulmuştur [117]. Taksonomilerin %60'lık güven seviyesine göre belirlenmesinde; en az kesinlik eşik değeri 0.5 seçilerek, USEARCH yazılımında yer alan SINTAX algoritmasından yararlanılarak OTU'ların referans dizilerle karşılaştırılmasında (1) bakteriler için RDP 16S veritabanı ve (2) ITS için UNITE veritabanı olmak üzere iki strateji kullanılmıştır [159].

Alfa çeşitlilik hesaplamaları richness, Observed, Shannon ve Simpson çeşitlilik indeksleri kullanılarak yapılmıştır. Seyrelme eğrileri (Rarefaction curves) R yazılım paketleri olan Phyloseq (v1.26.1) ve Vegan (v2.5-5) ile oluşturulmuştur [160,161].

3.6. Metabolomik Yaklaşımlar Kullanılarak Tarhana Örneklerinde Bulunan Bazı Organik Asitlerin ve Etanol Miktarlarının Belirlenmesi

3.6.1. Kimyasal Malzemeler

Tarhana hamurlarında bulunan organik asitlerin miktarlarını belirlemek için laktik (Sigma Aldrich, İsviçre), süksinik (Sigma Aldrich), asetik (Sigma Aldrich), pürivik (Sigma Aldrich), okzalik (Sigma Aldrich), sitrik (Sigma Aldrich), formik (Sigma Aldrich) ve ürik (Sigma Aldrich) asit standartları kromatogramların oluşturulmasında kullanılmıştır.

3.6.2. Organik Asit Analizleri

3.6.2.1. Ekstraksiyon işlemi

Tarhana hamuru örneklerinde bulunan laktik, süksinik, asetik, sitrik, pürivik, ürik, okzalik ve formik asit miktarları, Erbaş [10]'ın metodunda minör değişiklikler yapılarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPCL) sisteminde belirlenmiştir. Organik asit

ekstraksiyonu için 5 g örnek içerisine 40 ml su ve cam boncuk eklendikten sonra 20 dakika Multireax çoklu tüp çalkalayıcıda (Heidolph, Schwabach, Almanya) homojenize edilmiştir. Homojenizat 4500 g'de 20°C'de 10 dakika santrifüj (Model 3-16 KL, Sigma Centrifuge GmbH, Osterode am Harz, Almanya) edilmiştir. Elde edilen supernatanttan 1 ml alınarak 0.20 µM, 28 mm yarıçapında selüloz asetat filtreden (Corning Life Sciences, Massachusetts, ABD) geçirilmiştir. Organik asitlerin tespit edilebilmesi için örnekler bir DAD dedektör (Agilent, G1315A, Santa Clara, California, ABD) ve bir InertSustain AQ-C18 (3 µM, 4.0x 150 mm (UP)) kolona sahip HPLC (Hewlett Packard Series 1100, Palo Alto, California, ABD) cihazına enjekte edilmiştir. Hareketli (mobil) faz olarak pH değeri o-fosforik asit ile 2.4'e ayarlanmış olan 0.8 ml/dk akış hızında 0.02 M KH₂PO₄ kullanılmıştır. Örneğin cihaza enjeksiyon miktarı 5 µl ve her bir analiz süresi, organik asit piklerinin çıkış süresine göre 55 dakika olarak ayarlanmıştır. Kolon fırını ile sıcaklık 40°C olarak sabitlenmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması ile organik asitlere ait okuma kanalları, maksimum absorpsiyonlar ve geliş zamanları belirlenmiştir.

3.6.2.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması

Belirlenen yöntem ile laktik, süksinik, asetik, sitrik, pirüvik, ürik, okzalik ve formik asit standartlarının ayrımı gerçekleştirildikten sonra bu asitlerin örnekteki miktarlarını tespit etmek için de bu organik asitlerin 10000 ppm konsantrasyonda ana stok çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiler karıştırılarak ana karışım çözeltisi elde edilmiştir. Ardından kalibrasyon eğrisini hazırlamak için seyreltme yapılarak 1000, 500, 250 ve 100 ppm ana karışım çözeltisi konsantrasyonları hazırlanmış, cihazda okutulmuş ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

3.6.3. Etanol Analizleri

Tarhana hamuru örneklerinden etanol ekstraksiyonu Erbaş [10] metodunda minör değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Etil alkol analizi, AOAC 984.14 [162] metodunda modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Elde edilen ekstraktan 900 µl alınarak üzerine iç standart olarak kullanılan %5 lik 1-propanoldan 100 µl ilave edilmiştir. Daha sonra Gaz Kromatografisi (Agilent 6890, FID Dedektör) kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz için DB-624, 30m x 0,53mm kolonu sabit akış modunda, akış hızı 1,2 ml/dk olacak şekilde kullanılmıştır. Fırın başlangıç sıcaklığı 65°C ve dedektör

sıcaklığı 265°C'dir. 65°C'de 15 dakika bekleme süresinin ardından 20°C'lik artışla 200°C'de 5 dakika bekleyerek analiz 26,75 dakika sürmüştür. Inlet modu Split 1:50 şeklinde inlet sıcaklığı 250°C olup taşıyıcı gaz Helyum 'dur. Kullanılan gaz kuru hava 450ml/dk ve Hidrojen 40ml/dk şeklindedir. Kalibrasyon eğrisi %0,5'lik 1-propanol ile hazırlanmıştır.

3.7. Veri Analizi

Tarhana hamuru çeşitlerinin kalitesinin incelendiği kimyasal analizler, klasik mikrobiyolojik sayımı sonuçları ve metabolit miktarlarının değerlendirilmesinde JMP istatistik programı, Versiyon 16 (SAS Institute Inc., Cary, NC, ABD) kullanılarak; tarhana çeşitleri ve fermantasyon günleri arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi uygulanmıştır. 2 değişkenli örneklerde Tukey testi yerine Student-t testi uygulanmıştır. Analizler gerçekleştirilirken $p < 0.05$ önem düzeyi seçilmiştir.

Kültüromik analizler sonucu MALDI TOF MS cihazından elde edilen veriler SARAMIS veritabanında değerlendirilmiştir.

Tarhana hamuru fermantasyon süreci sırasında gerçekleşen metagenomik ve metabolomik etkileşimlerin incelenmesinde bütünleştirici analizler yaklaşımı kullanılmıştır. Bu kapsamda, QIIME2 yazılımı kullanılarak PCA ile sınıflandırma analizleri [163], ve Origin (Pro), Versiyon 2022 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, ABD) yazılımı kullanılarak kümelenme ve korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

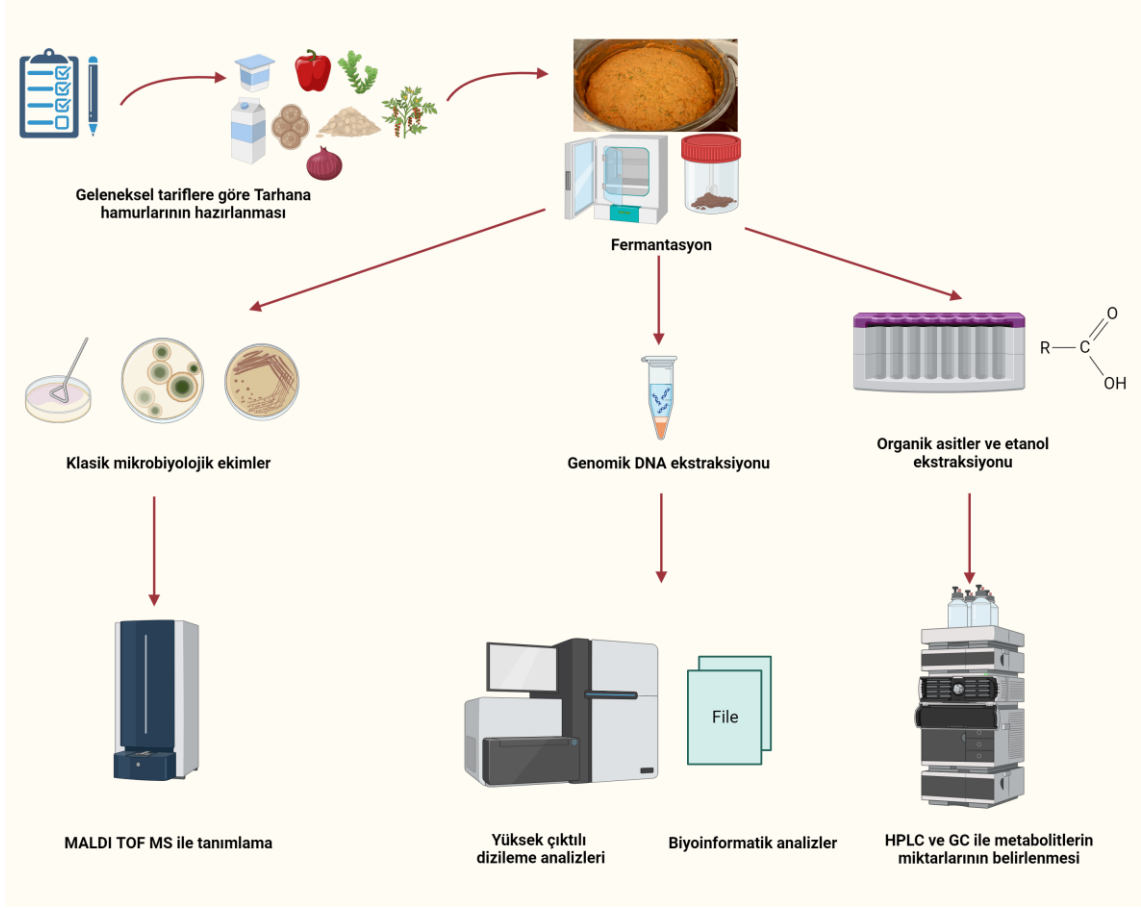
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Fermentasyon, geleneksel olarak eski toplumlar tarafından zorlu mevsimlerde gıdaların korunması, ritüel ziyafetler için ve gıdanın duyu kalitesinin artırılması amacıyla geliştirilmiş olduğundan, dünyadaki insan uygarlığı kadar eskidir [164]. Ancak insanın toplumsal gelişmesi ışığında fermentasyon sürecinin evrimini ve modern biyoteknolojik araçların gıda fermentasyon sürecinin iyileştirilmesine katkısını tartışmayı amaçlayan araştırmalar son yıllarda artmaktadır.

Bu çalışmada fermentasyon süresi ve tarhana çeşidine bağlı olarak Isparta, Maraş, Bursa, Kastamonu ve Uşak tarhana çeşitlerinin temel kimyasal analiz profillerinin yanı sıra hem mikrobiyal açıdan hem de metabolik açılarından biyokimyasal parmak izi ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla tez çalışması aşağıdaki kısımlardan oluşmaktadır:

- i) Belirlenen tarhana çeşitlerinin geleneksel tariflere uygun olarak hamurlarının hazırlanması ve fermentasyona bırakılması,
- ii) Fermentasyon süreci boyunca belirlenen zaman aralıklarında alınan örneklerden klasik kültürel yöntemler ile farklı mikroorganizma popülasyonlarının belirlenmesi ve bu mikroorganizmaların izolasyonlarının yapılarak saf kültürler elde edilmesi;
- iii) İzole edilen saf kültürlerin MALDI TOF MS ile tanımlanması;
- iv) Metagenomik analiz yaklaşımıyla tarhana fermentasyonu boyunca mikrobiyota değişiminin incelenmesi;
- v) Tarhana hamurlarında tespit edilen organik asit ve etanol miktarlarının değerlendirilmesi yaklaşımıyla tarhana fermentasyonunun metabolik karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi
- vi) Tarhana çeşitlerinin mikrobiyotalarında ve metabolitlerinde görülen değişimlerin bütünleştirici analizlerle incelenmesi,

şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 4.1). Çalışma sonunda yapılan istatistiksel karşılaştırmalar ile her çeşit tarhana için fermentasyon süresine bağlı olarak kendine özgü nitelik ve nicelikler bütünleşik omik teknolojileri ile tanımlanmıştır.



Şekil 4.1. Tez çalışmasının grafik özeti.

4.1. Kimyasal Analiz Sonuçları

4.1.1. pH ve Asitlik Tayini Sonuçları

Tarhana hamuru çeşitlerinin pH ve asitlik tayini profilleri ve bunların fermantasyon boyunca zamanla değişimi sırasıyla Çizelge 4.1. ve 4.2’de gösterilmiştir. İncelenen iki parametre için de tüm çeşitlerde fermantasyon süreci boyunca aynı tarhana çeşidi içinde istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) farklılıklar bulunmuştur.

Fermantasyon süresi 24 saat olan Isparta tarhanası için pH değeri F0 anında 4,34’den 24 saat sonunda 4,22’ye düşmüş ve toplam asitlik %5,55’den %5,77’ye yükselmiştir. Soyyiğit [38] ise Isparta tarhanası örneklerinin pH değerlerinin 3,80-4,86 ve toplam asitlik değerlerinin %4,92-%27,80 aralığında değiştiğini belirlemiştir. Bunun yanında

Şengün [27] ise Isparta iline ait tarhana örneğinin pH değerinin 0. günde 5,0'dan 24 saat sonunda 4,8'e düştüğünü belirlemiştir.

Çizelge 4.1. Tarhana hamur çeşitlerine ait pH analizi sonuçları.

pH	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	4,34±0,02 ^{Bc}	4,05±0,01 ^{Ad}	5,41±0,01 ^{Aa}	4,02±0,0 ^{Dd}	4,96±0,01 ^{Ab}
1.GÜN	4,22±0,00 ^{Ac}	3,83±0,01 ^{Be}	5,16±0,01 ^{Ba}	4,18±0,02 ^{Cd}	4,49±0,01 ^{Bb}
3.GÜN	DY	DY	4,97±0,01 ^{Ca}	4,17±0,0 ^{Cb}	3,90±0,00 ^{Ec}
5.GÜN	DY	DY	4,89±0,02 ^{Da}	4,50±0,01 ^{Bb}	3,82±0,02 ^{Fc}
7.GÜN	DY	DY	4,78±0,01 ^{Eb}	5,39±0,01 ^{Aa}	3,79±0,02 ^{Gc}
10.GÜN	DY	DY	4,72±0,02 ^{Fa}	3,89±0,00 ^{Eb}	3,82±0,00 ^{Fc}
15.GÜN	DY	DY	DY	3,86±0,0 ^{Fb}	4,05±0,00 ^{Da}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	4,11±0,01 ^C

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Çizelge 4.2. Tarhana hamur çeşitlerine ait asitlik tayini analizi sonuçları

%TA	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	5,55±0,05 ^{Bb}	5,77±0,03 ^{Ba}	4,50±0,0 ^{Fd}	5,50±0,05 ^{Gb}	4,77±0,03 ^{Gc}
1.GÜN	5,77±0,03 ^{Ae}	7,17±0,03 ^{Ad}	7,48±0,03 ^{Eb}	7,32±0,03 ^{Ec}	9,48±0,03 ^{Fa}
3.GÜN	DY	DY	8,10±0,10 ^{Db}	8,02±0,03 ^{Db}	21,17±0,14 ^{Ba}
5.GÜN	DY	DY	9,48±0,03 ^{Cb}	8,87±0,03 ^{Cc}	21,25±0,0 ^{Ba}
7.GÜN	DY	DY	10,75±0,0 ^{Bb}	5,95±0,05 ^{Fc}	21,63±0,06 ^{Aa}
10.GÜN	DY	DY	15,57±0,03 ^{Ac}	20,70±0,00 ^{Ab}	20,95±0,00 ^{Ca}
15.GÜN	DY	DY	DY	20,05±0,05 ^{Ba}	12,63±0,06 ^{Db}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	12,33±0,03 ^E

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Maraş tarhanası için pH değeri 24 saatin sonunda başlangıçta 4,05'den 3,83'e kadar düşmüştür. Maraş tarhanasının AB tarafından 27 Kasım 2023 tarihinde Coğrafi İşaret aldığı ilan edilmiş ve ürün spesifikasyonunda pH değeri 2,79 ile 3,70 arasında değiştiği belirtilmiştir [42]. Ayrıca ticari olarak satılan Maraş tarhanaları ile yapılan bir çalışmada ortalama pH değeri 3,29 ve toplam asitlik değeri %32,14 olarak bulunmuştur [41]. Başka bir çalışmada ise yine ticari örneklerin pH değerleri de 3,76-3,79 arasında değişirken, asitlik miktarları %7.63-13.73 arasında değişmiştir [165]. Bu çalışmada ise örneklerin asitlik miktarları F0'da %5,77'den F1'de %7,17'ye yükselmiştir. Çalışmalar arasındaki farklılığın sebebi bu tez çalışmasında hamura eklenen tuz miktarının daha fazla olmasından kaynaklanabilir. Tuz miktarı arttıkça ortamda bulunan serbest suyun azalmasıyla, LAB'nin fermentasyonunun yavaşlaması sonucu pH daha yüksek bir değerde kalabilir. Diğer bir yandan, Şengün [27] daha kısa fermentasyon süresine sahip tarhana çeşitlerinin daha yüksek pH değerine sahip olduğunu bildirmesine karşın, bu çalışmada 24 saatlik fermentasyon sonucunda en düşük pH değeri Maraş tarhanasında (pH 3,83) bulunmuştur. Bu farklılık Maraş tarhanası geleneksel reçetesinde inek yoğurdu yerine pH değeri daha düşük olan keçi yoğurdu kullanılmasından kaynaklanabilir.

Bursa tarhanası pH değeri fermentasyon başlangıcında 5,41'den 24 saat sonunda 5,16 değerine düşmüş ve fermentasyon prosesi boyunca azalarak 10. günün sonunda 4,72 olarak ölçülmüştür. Toplam asitlik değerleri de F0 anında %4,50'den 24 saat sonunda %7,48'e ulaşmış ve fermentasyon sonunda %15,57'ye ulaşmıştır. Tüm çeşitler içerisinde hem F0 anında hem de fermentasyon sonunda en yüksek pH değerine Bursa tarhanasının sahip olduğu görülmektedir. Yüzde toplam asitlik değeri açısından da Bursa çeşidi fermentasyon başlangıcında ve fermentasyonun 10. günleri arasında en düşük değere sahiptir. Bu durumun Bursa tarhanasının geleneksel reçetesinde yoğurt yerine inek sütü kullanılmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Daha önceki çalışmalarda da tarhana hamuruna eklenen yoğurt miktarı arttıkça fermentasyon sonu pH değerinin düştüğü görülmüştür [166].

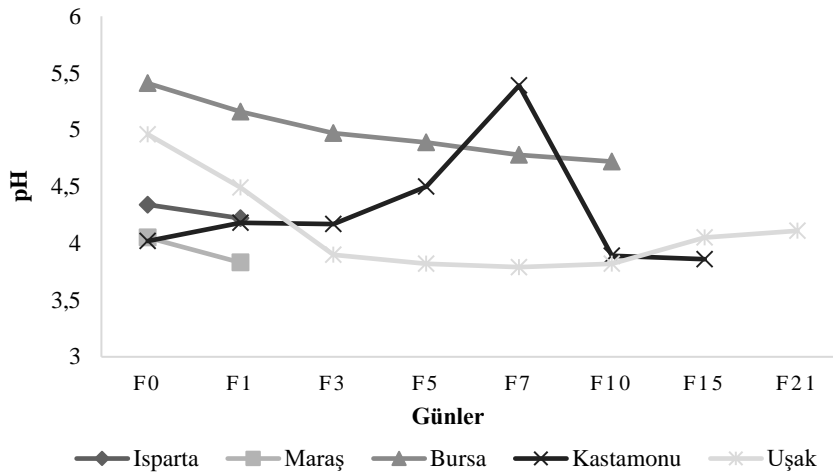
Kastamonu tarhanası geleneksel üretim yöntemi iki aşamalı bir proses olduğu için pH ve % toplam asitlik değerleri yoğurt harcı fermentasyonundan hamur fermentasyonuna geçiş aşamasında önemli dalgalanmalar ($p < 0.05$) göstermektedir. Fermentasyon başlangıcında

pH 4,02 olarak ölçülmüş ve 5. günde 4,50'ye yükselmiştir. Ardından, yedinci günde hamur hazırlanmasının ardından pH 5,39 olarak belirlenirken, onuncu günde hızlıca 3,89'a düşmüş; toplam asitlik de F7'de %5,95'den F15'de %20,70'e yükselmiştir. Daha önceki bir çalışmada Kastamonu tarhanası üretim sonrası pH değerleri 3,64-4,21 ve asitlik tayini değerleri %3,1-%10,1 aralığında bulunmuştur [47]. Ancak, TS 2282 Tarhana Standardı'na göre üretim sonrası tarhananın asitlik sayısı 15-40 aralığında olmalıdır [23]. Bu açıdan, bu tez çalışmasında hazırlanan Kastamonu tarhanası standarda uygundur.

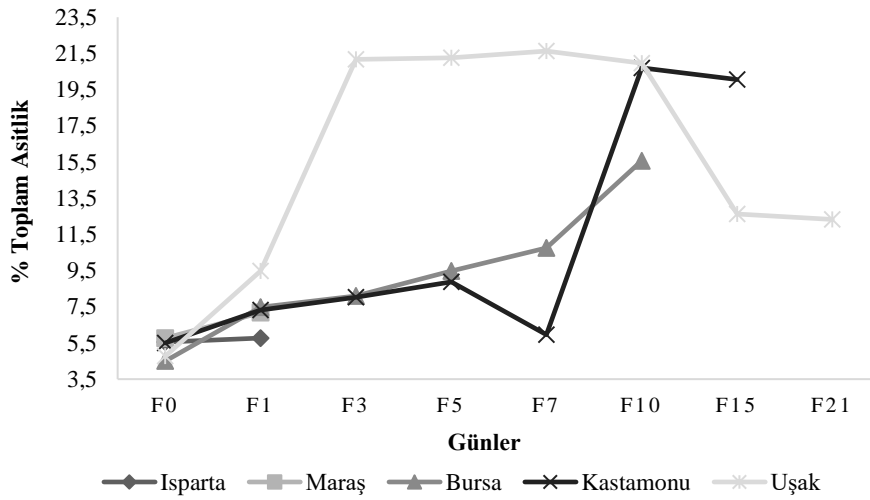
Uşak tarhanası Coğrafi İşaret Belgesi'nde tarhana hamuru pH değerinin başlangıçta 4,5-5,0 aralığındayken fermantasyon sonunda 3,70'e kadar düştüğü ve titrasyon asitliği değerinin 10-35 aralığında olması gerektiği belirtilmiştir [48]. Bu projede hazırlanan Uşak tarhanası için başlangıç pH değeri 4,96 olarak ölçülmüş ve fermantasyonun yedinci gününe kadar düşmeye devam etmiştir. Ancak, fermantasyonunun onuncu gününden itibaren pH tekrar yükselmeye başlamış ve F21'de pH 4,11 olmuştur. Toplam asitlik ölçümleri ise fermantasyon başında %4,77'den onuncu güne kadar yükselmiş ve F7'de %21,63 ve F10'da %20,95 ölçülmüştür. Daha sonra yine hızlı bir düşüş görülerek fermantasyon sonunda %12,33 toplam asitlik belirlenmiştir. Türüt [167], Uşak tarhanası örneklerinin pH değerlerini 4,2-4,5 ve asitlik ölçümlerini %23,03-24,08 aralığında bulurken; Şimşek [168] klasik Uşak tarhanasının asitlik tayini ölçümünü 21 günlük fermantasyon sonunda %16,5 olarak belirlenmiştir. Bunun yanında aynı çalışmada [168] klasik tarhana örneğinin asitlik değerlerinin fermantasyonun 15. gününe kadar arttığı, daha sonra ise azalan bir trend gösterdiği tespit edilmiştir. Uşak tarhanası hamurunun pH değeri fermantasyonun onuncu gününe kadar keskin bir düşüş göstermektedir. Benzer şekilde Şimşek [169] evde hazırlanan tarhana hamurlarının pH değerlerinin 10. günden sonra yükselmeye başladığını belirlemiştir. Bu tez çalışmasında pH ve % toplam asitlik değerleri değişimi literatürlerle uygun bir trend göstermekte ancak fermantasyon sonu pH değeri daha yüksek ve % toplam asitlik değeri daha düşük kalmaktadır.

Beş farklı tarhana çeşidi için fermantasyon başlangıcında pH ve asitlik tayini ölçümleri benzer bir trend göstermekte ve daha önceki çalışmalarda da ortaya konduğu gibi [36,170], Kastamonu tarhanası dışındaki çeşitlerde ilk 24 saatte pH'da keskin bir düşüş ve toplam asitlik değerlerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada

tarhana üretimini etkileyebilecek olan dış ortam koşulları ve fermantasyon sıcaklığı parametreleri tüm çeşitler için sabit tutulmuştur. Fermantasyon sürecinin aynı günlerinde farklı çeşitlerin pH değeri karşılaştırıldığında, Maraş ve Kastamonu çeşitlerinin istatistiki olarak önemli farklılık göstermediği bulunmuştur ($p>0.05$). Daha önceki çalışmalar fermantasyon süresinin hem pH hem de % toplam asitlik üzerinde önemli bir etkisi ve tarhana tipinin sadece % toplam asitlik üzerine belirgin bir etkisi olduğunu belirtirken [10,171], bu tez çalışması her iki parametrenin de tarhana çeşidinden istatistiki olarak önemli ölçüde etkilendiğini göstermektedir.



Şekil 4.2. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca pH değişimi.



Şekil 4.3. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca % toplam asitlik değişimi.

4.1.2 Yağ Miktarı Tayini Sonuçları

Isparta, Maraş ve Uşak çeşitlerinin toplam yağ içerikleri fermantasyonun ilk 24 saatinde önemli ölçüde artış ($p < 0.05$) gösterirken, Bursa ve Kastamonu çeşitlerinde önemli bir değişim ($p > 0.05$) bulunamamıştır. Fermantasyon işlemi 24 saatten uzun olan Bursa, Kastamonu ve Uşak çeşitlerinin toplam yağ miktarları süreç boyunca artarak, fermantasyon sonunda F0 anından önemli ölçüde yüksek ($p < 0.05$) bulunmuştur. Örneklere ait analiz sonuçları Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir.

Isparta tarhanası çeşidinde fermantasyon başlangıcında yapılan analizlerde %1,22 toplam yağ tespit edilirken, 24 saatlik fermantasyon sonunda yağ içeriği %2,55'e yükselmiştir. Soy Yiğit [38], Isparta tarhanası örneklerindeki toplam yağ miktarını %1,35-%7,90 aralığında bulurken, örneklerin ortalama %3,40 yağ içerdiğini tespit etmiştir.

Maraş tarhanası'nda F0'da yapılan ölçümlerde örnekler %3,15 toplam yağ içerirken, F1'de bu değer yükselerek %3,25'e ulaşmıştır. Yörükoğlu [41], Maraş tarhanası örneklerinin toplam yağ içeriklerinin %1,87-%5,23 aralığında olduğunu belirlerken, örneklerin ortalama toplam yağ içeriğini ise %3,90 olarak tespit etmiştir. Tamer [172] kuru tarhana örneklerinin ortalama toplam ham yağ içeriklerini %5,10 olarak belirlemiştir.

ve süzme yoğurt kullanımının ham yağ oranını arttırdığını gözlemlemiştir. Maraş tarhanası yağ içeriğinin hem F0 anında hem de fermantasyon sonunda en yüksek değere sahip olmasının formülasyonda yer alan ve inek sütünden yapılan yoğurttan daha yüksek yağ içeriğine sahip olan keçi yoğurdundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.3. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca toplam yağ miktarı değişimi (%).

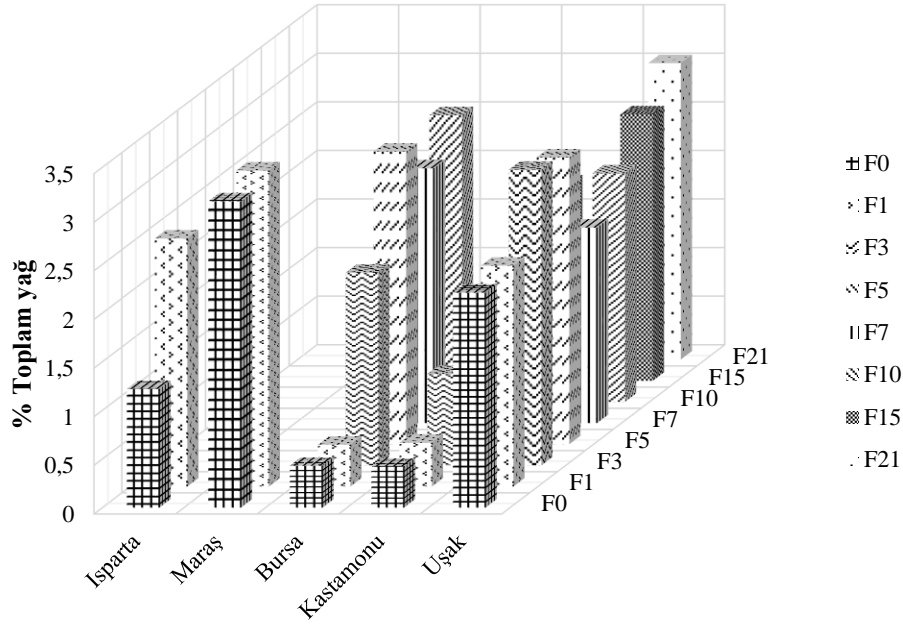
%Toplam yağ	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	1,22±0,02 ^{Bc}	3,15±0,0 ^{Ba}	0,43±0,02 ^{Ed}	0,42±0,02 ^{Fd}	2,21±0,0 ^{Fb}
1.GÜN	2,55±0,01 ^{Ab}	3,25±0,01 ^{Aa}	0,43±0,02 ^{Ed}	0,45±0,03 ^{Fd}	2,27±0,03 ^{Ec}
3.GÜN	DY	DY	1,98±0,0 ^{Db}	0,94±0,0 ^{Dc}	3,04±0,02 ^{Aa}
5.GÜN	DY	DY	3,01±0,02 ^{Aa}	0,88±0,01 ^{Ec}	2,95±0,01 ^{Bb}
7.GÜN	DY	DY	2,62±0,01 ^{Ca}	1,56±0,02 ^{Cc}	2,01±0,02 ^{Gb}
10.GÜN	DY	DY	2,95±0,00 ^{Ba}	2,35±0,0 ^{Ab}	2,35±0,02 ^{Db}
15.GÜN	DY	DY	DY	2,03±0,02 ^{Bb}	2,74±0,0 ^{Ca}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	3,05±0,0 ^A

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Bursa tarhanası çeşidinde geleneksel reçeteye göre hamura fermantasyonun 3. gününde yeni bileşenler eklenmesi sebebiyle F0’da ve F1’de %0,43 olarak tespit edilen toplam yağ miktarı F3’de %1,98’e yükselmiştir. Prosesin 5. gününde en yüksek değer olan %3,01’e ulaşan toplam yağ içeriği 10. günde %2,95 olarak belirlenmiştir.

Kastamonu tarhanasının fermantasyon sürecinin başlangıcında hazırlanan yoğurt harcı F0’da %0,42 toplam yağ içerirken F7’de un eklenmesi ile birlikte %1,56’ya yükselmiştir. Daha sonra F10’da en yüksek toplam yağ içeriği %2,55 olarak ölçülmüş ve fermantasyon sonunda bu değer %2,03’e gerilemiştir. Daha önceki bir çalışmada Kastamonu tarhanası % toplam yağ içeriği %0,74-4,77 aralığında bulunmuş ve bu farklılıkların kullanılan yoğurdun özelliklerinden kaynaklandığı belirtilmiştir [45].

Uşak tarhanası çeşidinin fermantasyon başlangıcında %2,21 olan toplam yağ içeriği ilk üç gün boyunca yükselerek F3’de %3,04 olmuştur. Proses boyunca toplam yağ miktarı artış ve azalışlar göstermiş ve F21’de %3,05’e ulaşmıştır. Çifci [173] de Uşak tarhanası örneklerinin toplam yağ içeriklerini %2,38-%3,84 aralığında bulmuştur.



Şekil 4.4. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca % toplam yağ miktarı değışimi.

4.1.3. Protein Miktarı Tayini Sonuçları

Tüm tarhana çeşitleri için fermantasyon sürecinin ilk 24 saatinde protein miktarının önemli ölçüde azaldığı ($p < 0.05$) belirlenmiştir. Fermantasyon işlemi 24. saatten sonra da devam eden Bursa, Kastamonu ve Uşak çeşitlerinin protein içeriği ise süreç boyunca dalgalanmalar gösterse de fermantasyon sonunda F0 anından daha yüksek değerlere ulaşmıştır (Çizelge 4.4).

Isparta tarhanasında F0’da %4,98 olarak belirlenen protein miktarı 24 saatlik fermantasyon sonunda %4,10’a düşmüştür. Soyyiğit [38] ise Isparta tarhanası örneklerinin protein miktarını %12,79-%21,58 aralığında bulmuştur.

Maraş tarhanasından alınan örneklerde fermantasyon başlangıcında protein içeriği %3,64'den 24 saatlik fermantasyon sonunda %2,52'ye düşmüştür. Erinç [165], yoğurtla hazırlanan Maraş tarhanası örneklerinin %16,36 protein içerdiğini belirlerken; Yörükoğlu [41], incelediği örneklerin protein içeriğinin %14,49-%18,11 arasında değiştiğini tespit etmiştir.

Çizelge 4.4. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca protein miktarı değişimi (%).

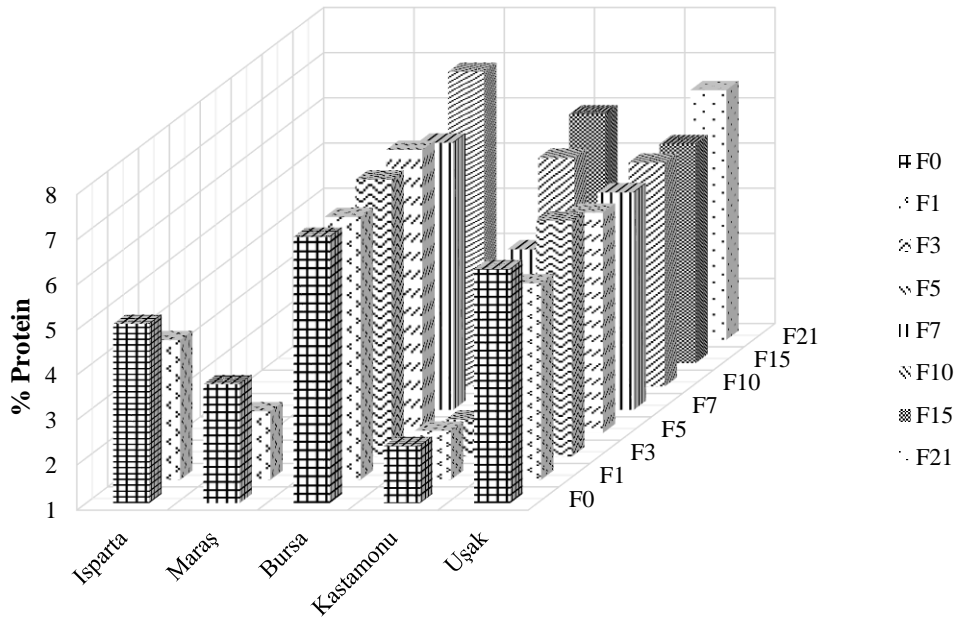
%Protein	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	4,98±0,01 ^{Ac}	3,64±0,02 ^{Ad}	6,91±0,01 ^{Da}	2,27±0,03 ^{De}	6,19±0,0 ^{Cb}
1.GÜN	4,10±0,01 ^{Bc}	2,52±0,01 ^{Bd}	6,83±0,02 ^{Ea}	2,09±0,02 ^{Ee}	5,36±0,02 ^{Hb}
3.GÜN	DY	DY	7,14±0,00 ^{Ca}	1,82±0,03 ^{Fc}	6,23±0,0 ^{Bb}
5.GÜN	DY	DY	7,28±0,01 ^{Ba}	1,51±0,0 ^{Gc}	5,89±0,01 ^{Eb}
7.GÜN	DY	DY	6,92±0,02 ^{Da}	4,56±0,0 ^{Cc}	5,82±0,01 ^{Gb}
10.GÜN	DY	DY	7,97±0,01 ^{Aa}	6,07±0,01 ^{Bb}	5,96±0,01 ^{Dc}
15.GÜN	DY	DY	DY	6,51±0,02 ^{Aa}	5,85±0,01 ^{Fb}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	6,53±0,0 ^A

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Bursa tarhanası çeşidinin F0'da %6,91 olan protein içeriği 24 saatlik fermantasyon sonunda %6,83'düşmüş ve daha sonra tekrar yükselmeye başlayarak fermantasyon sonunda %7,97 olarak belirlenmiştir. Oyewole [174], manyok fermantasyonu üzerine yaptığı araştırmada protein içeriğinin ilk 72 saatten fermantasyon sonuna kadar yükseldiğini ve fermantasyon sonundaki artışın gıdadaki proteinin mikrobiyal proteine dönüşmesinden kaynaklandığını belirtmiştir.

Geleneksel hazırlanma metodu sebebiyle fermantasyonun ilk aşamasında yoğurt harcı yapısında olan Kastamonu tarhanasında başlangıç anında %2,27 protein tespit edilirken bu miktar 5. gün sonunda %1,51'e kadar düşmüş, fermantasyonun 7. gününde karışıma un eklenmesiyle protein miktarı %4,56 ve F15'de %6,51 değerine yükselmiştir.

Uşak tarhanası fermantasyon başlangıcında %6,19 protein içerirken; protein miktarı fermantasyonun ilk günü sonunda %5,36'ya düşmüş ve süreç boyunca dalgalanmalar göstererek fermantasyon sonunda %6,53 değerine ulaşmıştır. Çifci [173], hazırladığı tez çalışmasında Uşak tarhanası örneklerinin protein içeriğinin %11,93-%13,33 aralığında değiştiğini bulmuştur. Erbaş [36] ise ıslak tarhana örneklerinin protein içeriğini %16,79 olarak belirlemiştir.



Şekil 4.5. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca % protein miktarı değişimi.

Fermantasyon prosesi boyunca protein miktarı değişimini inceleyen çalışmalar deneysel düzen, çalışma süreleri ve gıdaların başlangıç protein ya da amino asit içeriği profillerinin

protein miktarı değişim eğilimlerini etkilediğini belirlemişlerdir [175–177]. Bu tez çalışması da tarhana hamurunda bulunan protein miktarının geleneksel reçeteden etkilendiğini göstermiştir.

4.1.4. Kül Miktarı Tayini Sonuçları

Isparta ve Kastamonu tarhanası çeşitlerinin kül miktarı fermantasyonun ilk 24 saatinde artış gösterirken, Maraş ve Uşak çeşitlerinde istatistiki olarak önemli bir azalma ($p<0.05$) belirlenmiştir. Bursa çeşidinde ise ilk 24 saatte azalma gözlenmesine rağmen bu azalma önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Fermantasyon başlangıcında en yüksek kül miktarı Bursa (%4,56) ve en düşük Kastamonu çeşidindedir (%2,03). Fermantasyon bitiş anları karşılaştırıldığında ise yine Bursa çeşidi en yüksek (F10, %2,03) ve Kastamonu çeşidi en düşük (F15, %1,66) kül miktarına sahiptir. Tarhana çeşitlerinin kül miktarı içerikleri Çizelge 4.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca kül miktarı değişimi (%).

%Kül	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	2,19±0,01 ^{Bd}	2,99±0,02 ^{Ac}	4,56±0,02 ^{CDa}	2,03±0,03 ^{Ce}	3,25±0,01 ^{Bb}
1.GÜN	2,31±0,0 ^{Ad}	2,64±0,0 ^{Bc}	4,55±0,05 ^{CDa}	2,30±0,0 ^{Bd}	3,19±0,0 ^{CDb}
3.GÜN	DY	DY	4,55±0,03 ^{Da}	2,34±0,0 ^{ABc}	3,12±0,01 ^{Eb}
5.GÜN	DY	DY	4,62±0,02 ^{Ca}	2,37±0,01 ^{Ac}	2,97±0,02 ^{Fb}
7.GÜN	DY	DY	4,78±0,0 ^{Aa}	1,96±0,02 ^{Dc}	3,25±0,05 ^{BCb}
10.GÜN	DY	DY	4,71±0,01 ^{Ba}	1,97±0,0 ^{Dc}	3,18±0,01 ^{Db}
15.GÜN	DY	DY	DY	1,66±0,03 ^{Eb}	3,21±0,02 ^{BCDa}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	3,59±0,02 ^A

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Isparta tarhanasında fermantasyon başlangıcında %2,19 olarak belirlenen kül miktarı 24 saat sonunda %2,31'e yükselmiştir. Soyyiğit [38], Isparta tarhanası örneklerinde kül miktarının %1,63-%13,19 aralığında değiştiğini belirlemiştir.

Maraş tarhanası fermantasyon başlangıcında %2,99 kül içerirken fermantasyon sonunda bu değer %2,64'e düştüğü belirlenmiştir. Yörükoğlu [41], Maraş tarhanası örneklerinin kül miktarının %4,37-%6,47 aralığında değiştiğini bulmuştur.

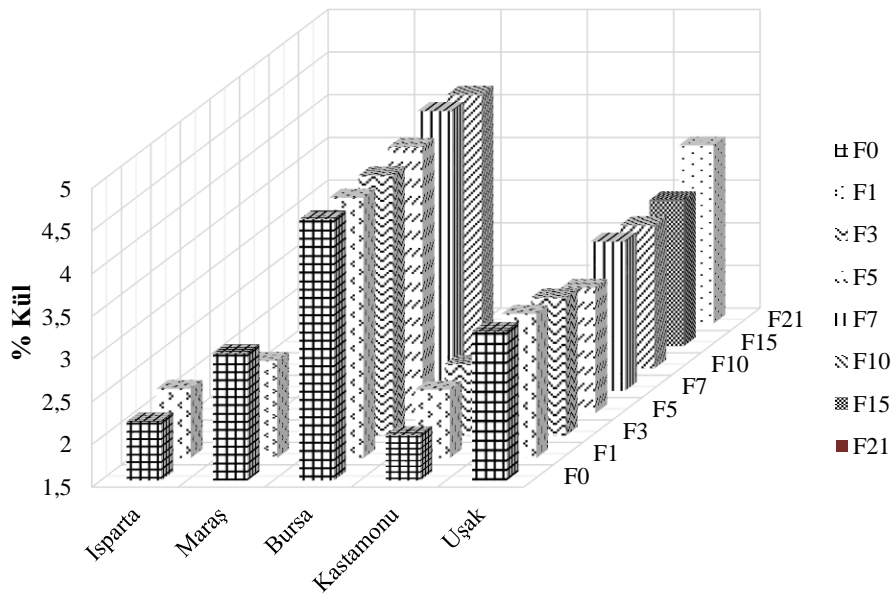
Fermantasyonun başlangıcında %4,56 kül içeren Bursa tarhanasında ilk 24 saatte istatistiki olarak önemli bir değişim gözlenmezken ($p>0.05$), 10 günlük fermantasyon sonunda bu değer %4,71'e ulaşmıştır.

Kastamonu tarhanası örneklerinin kül miktarı F0 anında %2,03 olarak belirlenmiş ve bu miktar yoğurt harcı dönemi boyunca artarak F5'de %2,37 ölçülmüştür. Fermantasyonun yedinci gününde hazırlanan hamurda %1,96 olan kül miktarı fermantasyon sonunda %1,66 olmuştur. Hendek Ertop [45], Kastamonu tarhanası üzerine yaptıkları araştırmada tarhana örneklerinin kül miktarlarının %1,05-2,65 aralığında değiştiğini bulmuştur.

Uşak tarhanasının fermantasyon başlangıcında %3,25 kül içerdiği belirlenmiştir. Fermantasyonun ilk 5 günü boyunca bu değer azalarak F5'de %2,97 olarak ölçülmüştür. Kül miktarı içeriği yedinci günden itibaren tekrar yükselmeye başlayarak fermantasyon sonunda %3,59 olarak belirlenmiştir. Çıfci [173] de 21 gün fermantasyon uygulanan Uşak tarhanası örneklerinin kül miktarlarının %1,53-%2,65 aralığında değiştiğini tespit etmiştir.

Tamer [172] kurutulmuş tarhana örnekleriyle yaptıkları çalışmada örneklerin ortalama kül miktarlarını %4,56 olarak belirlerken, hamur formülasyonunda kullanılan tuz içeriği

artıkça kül miktarının arttığını tespit etmiştir. Kıvanç [52], fermantasyon sonunda tarhana örneklerinde toplam kül miktarını %5,65, Ertaş [178] %1,51 ve Erbaş [36] %8,94 olarak ölçmüştür. Bunların yanında İbanoğlu [170], standart yöntemle hazırlanan tarhanaların kül miktarını %7,4 olarak tespit ederken artan yoğurt miktarıyla birlikte kül miktarının da arttığını ve kullanılan un tipinin de kül içeriğini etkilediğini belirtmiştir. Bu tez çalışması ve daha önceki araştırmalar değerlendirildiğinde; tarhanada bulunan kül miktarının kullanılan hammaddelerden etkilendiği görülmektedir.



Şekil 4.6. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca % kül miktarı değişimi.

4.1.5. Kuru Madde Miktarı Sonuçları

Tarhana hamuru çeşitlerinin kuru madde içerikleri Kastamonu tarhanası dışındaki örneklerde fermantasyon süreci boyunca dalgalanmalar gösterirken, fermantasyon sonunda başlangıç anına göre azalmıştır. Bütün çeşitler için ilk 24 saat sonunda ve fermantasyon sonunda hamurların kuru madde içeriği başlangıç anına göre önemli ölçüde farklı ($p < 0.05$) bulunmuştur.

Isparta tarhanası fermantasyon başlangıcında %29,09 kuru madde içerirken, bu değer 24 saatlik fermantasyon sonunda %27,15'e düşmüştür. Maraş tarhanasının kuru madde içeriği de fermantasyon başlangıcında %27,39'dan fermantasyon sonunda %24,31'e düşmüştür. Bursa tarhanasında ise fermantasyon başlangıcında %53,53 oranında kuru madde tespit edilmiş ve bu miktar süreç boyunca değişerek fermantasyonun onuncu günde %51,52 olarak belirlenmiştir.

Kastamonu tarhanası hamuru, yoğurt harcına fermantasyonun yedinci gününde un eklenmesiyle hazırlandığından, kuru madde içeriğinde önemli bir değişim gözlenmektedir. Fermantasyon başlangıcında %6,93 olan kuru madde miktarı F5'de %7,21 olarak tespit edilmiş ve F7'de hamur formuna geçilmesiyle %46,67 olmuştur. Daha sonra ise kuru madde miktarı artarak F15'de %53,36 oranına yükselmiştir.

Çizelge 4.6. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca kuru madde miktarı değişimi (%).

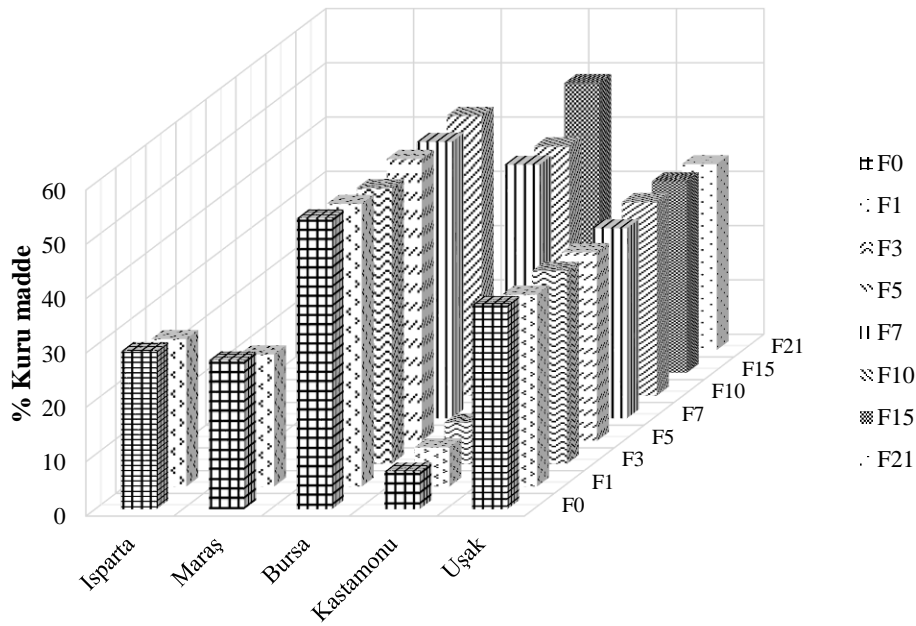
%Kuru madde	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	29,09±0,08 ^{Ac}	27,39±0,0 ^{Ad}	53,53±0,06 ^{Aa}	6,93±0,03 ^{Fe}	37,58±0,01 ^{Ab}
1.GÜN	27,15±0,01 ^{Bc}	24,31±0,01 ^{Bd}	52,03±0,05 ^{Ba}	7,21±0,01 ^{Ee}	35,32±0,00 ^{Db}
3.GÜN	DY	DY	50,78±0,0 ^{Ea}	7,61±0,0 ^{Dc}	35,49±0,02 ^{Cb}
5.GÜN	DY	DY	51,95±0,02 ^{Ba}	7,21±0,01 ^{Ec}	34,77±0,01 ^{Gb}
7.GÜN	DY	DY	50,89±0,01 ^{Da}	46,67±0,06 ^{Bb}	34,97±0,01 ^{Fc}
10.GÜN	DY	DY	51,52±0,01 ^{Ca}	45,90±0,02 ^{Cb}	35,62±0,03 ^{Bc}
15.GÜN	DY	DY	DY	53,36±0,02 ^{Aa}	35,26±0,03 ^{Eb}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	34,23±0,01 ^H

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). "DY" ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Uşak tarhanası fermantasyon başlangıç anında %37,58 oranında kuru madde içermektedir. Fermantasyon boyunca örneklerin % kuru madde miktarı istatistiki olarak önemli derecede farklı (p<0.05) olmakla birlikte süreç boyunca artış ve azalışlar

gözlenmiştir. Fermantasyon sonunda Uşak tarhanasının kuru madde içeriği %34,23 olarak belirlenmiştir.

Tarhana çeşitlerinde % kuru madde içeriğinde gözlenen düşüş, fermantasyon kaybı ile açıklanabilir. Tarhana mikrobiyotasında yer alan mikroorganizmaların aktiviteleri sonucu karbonhidrat miktarında görülen azalma ile ilişkili olan kuru madde kaybına karşın, kül ve protein miktarında artış gözlenmektedir [179].



Şekil 4.7. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca % kuru madde miktarı değişimi.

4.2. Klasik Mikrobiyolojik Yaklaşımlar Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi

Belirlenen örnek alma planına göre (Şekil 3.7) tarhana hamurlarından alınan numuneler toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayımı için PCA, laktobasiller için MRS, laktik streptokok ve laktokoklar için M17, streptokoklar için NRLC, enterokoklar için KAA ve maya-küf sayımı için DRBC agar besiyerlerine ekilmiştir. Şekil 3.8’de belirtilen inkübasyon koşulları sonunda 30-300 koloni düşmüş Petri kutularından sayım yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

4.2.1. Fermantasyon Süresi Boyunca Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Sayısında Görülen Değişimler

Tarhana örneklerinde TMAB sayım sonuçları Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Isparta tarhanası çeşidinde 24 saatlik fermantasyon sonunda TMAB sayısı F0’da 8,207 log kob/g’dan 7,459 log kob/g’a düşmüştür. Daha önceki bir çalışmada ise Isparta ili ve çevresinden temin edilen 27 adet tarhana örneğinde TMAB sayısı 1.4×10^3 – 2.1×10^7 kob/g aralığında tespit edilmiştir [38]. Aynı şekilde 24 saatlik fermantasyon ile hazırlanan Maraş tarhanasında ise F0’da 7,434 log kob/g TMAB tespit edilirken, fermantasyon sonunda gelişme görülmemiştir. Daha önceki çalışmalarda fermantasyon boyunca TMAB sayısındaki azalmanın, artan asit miktarıyla birlikte karbondioksit, hidrojen peroksit, diasetil, etanol ve bakteriyosinlerin oluşmasına bağlanabileceği belirtilmiştir [36,52]. Maraş tarhanası örneklerine ait diğer analiz sonuçları da birlikte değerlendirildiğinde, Maraş çeşidinde 24 saat sonunda maya varlığı sayısındaki artış sayımı yapılabilen TMAB miktarını etkilemiş olabilir.

Bursa tarhanasında bulunan TMAB sayısı fermantasyon boyunca istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) değişim göstermektedir. Geleneksel reçeteye göre başlangıç anında sadece un, maya ve tuzdan oluşan bir hamur hazırlanmış ve TMAB sayısı F0’da 7,472 log kob/g’dan ilk 24 saat sonunda 7,328 log kob/g’a düşmüş; ardından 3. günde hamura süt, baharatlar ve un ilave edilmesiyle 7,436 log kob/g’a yükselmiştir. Bu dalgalanmalar fermantasyon süresi boyunca sürmüş ve fermantasyon sonunda TMAB sayısı 6,836 log kob/g olmuştur. Bu değişim mikroorganizmaların fermantasyon boyunca ürettiği metabolitlerin birikiminden kaynaklanabilir. Bunların yanında, Bursa tarhanasında bulunan TMAB sayısının fermantasyon sonunda diğer çeşitlere kıyasla daha az olması formülasyonda süt kullanılması ile açıklanabilir. Daha önceki çalışmalarda hamurda kullanılan yoğurt miktarı ve TMAB sayısının da doğru orantılı olarak değiştiği belirlenmiştir [166].

Kastamonu tarhanası ilk yedi günlük sürecinde TMAB sayısı F0’da 6,285 log kob/g’dan F5’de 8,044 log kob/g’a yükselmiş ve sonuçlar arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Fermantasyonun yedinci gününde yoğurt harcına un ve diğer malzemelerin eklenmesiyle TMAB sayısı 8,283 log kob/g olarak belirlenmiştir.

Fermantasyon sonunda ise TMAB sayısı 7, 569 log kob/g olarak ölçülmüştür. Daha önceki bir çalışmada ise Kastamonu tarhanası örneklerinde üretim sonrasında TMAB sayısı ortalama 4,76 log kob/g olarak belirlenmiştir [47].

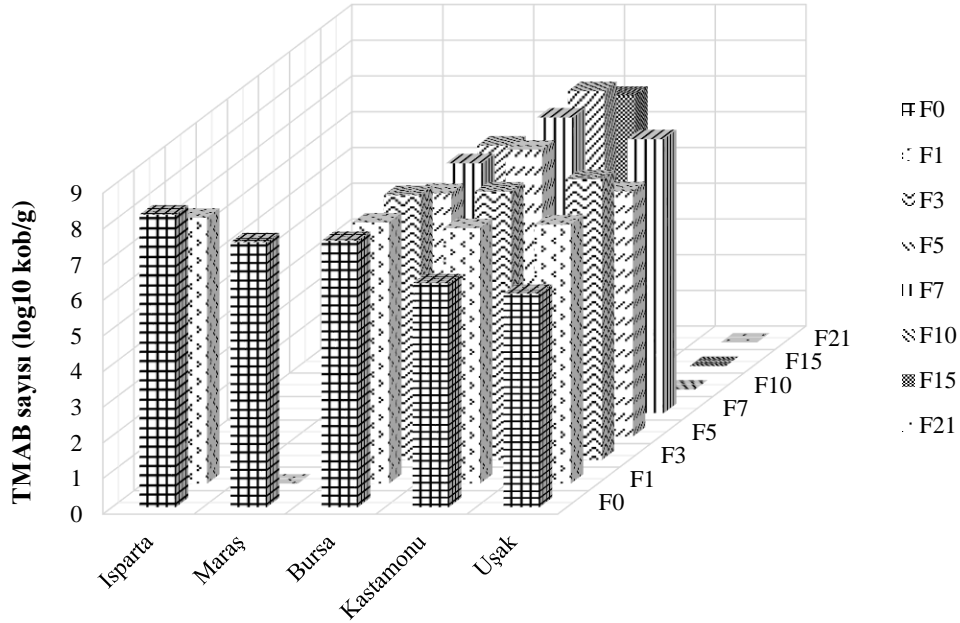
Çizelge 4.7. PCA besiyerinde günlere göre Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri sayıları (log₁₀ kob/g).

PCA	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	8,207±0,010 ^{Aa}	7,434±0,047 ^{Ab}	7,472±0,011 ^{Ab}	6,285±0,048 ^{Ec}	5,989±0,10 ^{Ed}
1.GÜN	7,459±0,071 ^{Ba}	GY ^{Bd}	7,328±0,031 ^{Bab}	7,167±0,044 ^{Dc}	7,268±0,070 ^{Cbc}
3.GÜN	DY	DY	7,436±0,019 ^{Ab}	7,531±0,022 ^{Cb}	7,876±0,059 ^{Aa}
5.GÜN	DY	DY	6,830±0,016 ^{Db}	8,044±0,005 ^{Ba}	6,884±0,033 ^{Db}
7.GÜN	DY	DY	7,001±0,054 ^{Cc}	8,283±0,035 ^{Aa}	7,675±0,023 ^{Bb}
10.GÜN	DY	DY	6,836±0,063 ^{Db}	8,360±0,057 ^{Aa}	GY ^{Fc}
15.GÜN	DY	DY	DY	7,569±0,064 ^{Ca}	GY ^{Fb}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	GY ^F

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır. “GY” ile gösterilen günlerde gelişme gözlenememiştir.

Uşak tarhanasında TMAB sayısını sonuçları F0’da diğer çeşitlere kıyasla daha düşüktür. Bunun sebebi hammadde kaynaklı olabileceği gibi, kullanılan malzeme çeşidi ve miktarı sebebiyle daha seyreltik hale gelmesinden kaynaklanabilir. Ancak F1’de, literatürle benzer şekilde [166], TMAB sayısında keskin bir artış görülmektedir. Hamur örneklerinde 24 saat sonunda laktik asit miktarının da belirgin şekilde arttığı bulunmuştur. Erbaş [36] da artan asit miktarının 24 saat sonunda TMAB ve LAB sayısını arttırdığı belirlemiştir. Fermantasyon süreci boyunca ise TMAB sayısının 3. günde en yüksek değere ulaşarak daha sonra azaldığı saptanmıştır. Yine Settanni [50], TMAB sayısının en yüksek değere fermantasyonun 4. gününde ulaştığı bulunmuştur. Çalışmada 4. gün örnekleme yapılmadığından sonuçlarda paralellik olduğu varsayılabilir. Fermantasyonun devamında ise yedinci günde ortamda maya tespit edilmemesiyle birlikte TMAB sayısı tekrar yükselmiş; ancak daha sonraki günlerde oluşan metabolitlerin etkisiyle TMAB

tespit edilememiştir. Ancak Şimşek [168], Uşak tarhanası TMAB içeriğini fermantasyonun ilk günü sonunda 8,48 log kob/g olarak belirlerken fermantasyon sonunda bu sayı 9,39 log kob/g'a ulaşmıştır.



Şekil 4.8. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca TMAB sayısı değişimi (log10 kob/g).

4.2.2. Fermantasyon Süresi Boyunca Laktobasillerin Sayısında Görülen Değişimler

Tarhana çeşitlerinde laktobasil sayım sonuçları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Isparta çeşidinde fermantasyon başlangıcında 9,082 log kob/g olarak belirlenen laktobasil sayısı 24 saat sonunda 8,591 log kob/g değerine düşerken; Maraş tarhanasında 7,499 log kob/g'dan 7,112 log kob/g değerine ulaşmıştır ($p < 0.05$). Isparta tarhanasında laktobasil sayısı daha önceki bir çalışmada ortalama $6,6 \times 10^5$ kob/g olarak tespit edilmiştir [38]. Settani [50] ve Şimşek [168] fermantasyonun ilk 24 saatinde tarhana örneklerinde laktobasil sayısının arttığını tespit ederken; Sengün [27] ve Şimşek [169] ise farklı tarhana hamurlarını kıyasladıklarında bazı çeşitlerde fermantasyon süresince laktobasil sayısında azalma olduğunu belirlemişlerdir. Ancak, bu tez çalışmasının diğer bir basamağı olan metagenomik analizler ise iki tarhana çeşidinde de 24 saatlik fermantasyon sonunda laktobasil sayılarının bağlı varlığında artış olduğunu göstermektedir. Bu yüzden, bu

tarhana çeşitlerinde bulunan laktobasil türlerinin kullanılan besiyerinde yeterli bir gelişme gösteremediği ve bu nedenle sayılamadığı düşünülebilir.

Bursa tarhanasında F0 anından (7,789 log kob/g) F3'e (8,093 log kob/g) kadar laktobasil sayısında artış gözlenmiştir. Settani [50] ve Sengün [27] de bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara paralel şekilde fermantasyonun 4. gününden sonra laktobasil sayısında azalma olduğunu bulmuşlardır. Laktobasil sayısındaki değişime uygun şekilde beşinci ve yedinci günleri arasında pH ve maya sayısı düşerken, laktik asit miktarı artmıştır. Ancak, metagenomik analiz sonuçları yedinci günde laktobasil sayısının daha önceki günlere göre oldukça yüksek olduğu göstermektedir. Bu durum yine hamurda bulunan tüm laktobasil türlerinin standart MRS agar besiyerinde optimum gelişmeye uygun olmamasıyla açıklanabilir.

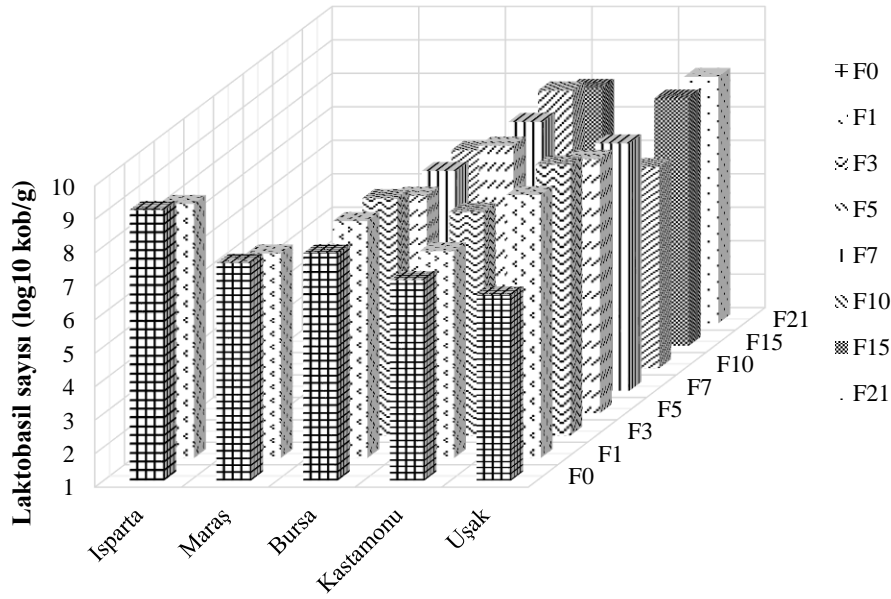
Çizelge 4.8. MRS Agar besiyerinde günlere göre laktobasil sayıları (log₁₀ kob/g)

MRS	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	9,082±0,028 ^{Aa}	7,499±0,039 ^{Ac}	7,789±0,044 ^{Bb}	6,990±0,011 ^{Fd}	6,524±0,144 ^{Ec}
1.GÜN	8,591±0,070 ^{Bb}	7,112±0,014 ^{Bd}	8,078±0,068 ^{Ac}	7,180±0,093 ^{Ed}	8,854±0,048 ^{Ba}
3.GÜN	DY	DY	8,093±0,081 ^{Ab}	7,683±0,072 ^{Dc}	9,101±0,139 ^{Aa}
5.GÜN	DY	DY	7,495±0,162 ^{Cc}	8,991±0,009 ^{Ba}	8,597±0,050 ^{Cb}
7.GÜN	DY	DY	7,564±0,014 ^{BCc}	9,029±0,012 ^{Ba}	8,386±0,082 ^{Cb}
10.GÜN	DY	DY	7,518±0,113 ^{Cb}	9,298±0,089 ^{Aa}	7,011±0,063 ^{Dc}
15.GÜN	DY	DY	DY	8,704±0,018 ^{Ca}	8,388±0,044 ^{Cb}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	8,363±0,019 ^C

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Kastamonu tarhanası örneklerinde fermantasyon başlangıcında 6,990 log kob/g olan laktobasil sayısı artarak 24 saat sonunda 7,180 log kob/g'a ulaşmıştır. Buna karşın, fermantasyonun beşinci ve yedinci günlerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmazken (p>0.05), yedinci günde un eklenmesiyle artış görülmeye devam etmiştir

($p < 0.05$). Süreç boyunca değişimler gözlenerek, 15. günün sonunda laktobasil sayısı 8,704 log kob/g değerine ulaşmıştır (Çizelge 4.8). Özdemir [47], Kastamonu tarhanasında üretim sonrası yaptığı araştırmada örneklerde bulunan ortalama laktobasil sayısını 4,28 log kob/g olarak belirken, Hendek-Ertop [45], anaerobik LAB sayısının 6,892-7,602 log kob/g aralığında değiştiğini tespit etmiştir.



Şekil 4.9. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca laktobasil sayısı değişimi (log10 kob/g).

Uşak tarhanası örneklerinde fermantasyon başlangıcında laktobasil sayısı 6,524 log kob/g olarak belirlenmiş ve bu sayı birinci gün (8,854 log kob/g) ve üçüncü günlerde (9,101 log kob/g) hızlı bir artış göstermiştir. Benzer şekilde Erbaş [36] ve Temiz [4] çalışmalarında tarhana hamuru örneklerde bulunan laktobasil sayısının fermantasyonun ilk üç gününde hızla yükseldiğini bulmuşlardır. Daha sonra F5, F7, F15 ve F21’de tespit edilen laktobasil sayıları arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark ($p > 0.05$) bulunamamış ve 21. gün sonunda 8,363 log kob/g değerine ulaşmıştır. Şengün [27], Uşak tarhanası hamuru örneklerinde yaptığı çalışmada ise fermantasyon başlangıcında laktobasil sayısını 7,5 log kob/g olarak belirlerken, dördüncü güne kadar bu sayıda azalma tespit etmiş, fermantasyon sonunda ise laktobasil sayısının 7,7 log kob/g olduğunu bulmuştur.

4.2.3. Fermantasyon Süresi Boyunca Laktik Streptokokların ve Laktokokların Sayısında Görülen Değişimler

Örneklerde bulunan laktik streptokok ve laktokok sayım sonuçları Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. Isparta tarhanası fermantasyon sürecinde laktik streptokok ve laktokok sayısı F0 anında 6,786 log kob/g'dan 24 saatlik fermantasyon sonunda 7,055 log kob/g'a ulaşmıştır. Soyyiğit [38], Isparta tarhanasında laktik streptokok sayısının 3,204 log kob/g -7,0 log kob/g aralığında değiştiğini tespit etmiştir. Şengün [27] ise Isparta bölgesinden temin edilen ancak 3 günlük fermantasyon süresine sahip olan örneklerden M17 agara yapılan ekimler sonucunda mikroorganizma yükünün sıfırıncı günde 6,6 log kob/g'dan 24 saat sonunda 6,4 log kob/g'a düştüğünü fermantasyon sonunda ise 7,0 log kob/g'a ulaştığını bulmuştur.

Maraş tarhanası çeşidinde fermantasyon başlangıcında 6,220 log kob/g olarak belirlenen laktik streptokok ve laktokok sayısı fermantasyon sonunda 6,306 log kob/g'a yükselmiş; ancak istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Bursa tarhanası çeşidinde fermantasyon başlangıcında bu mikroorganizmaların sayısı 8,610 log kob/g olarak belirlenmiş ve sayıları 5.güne kadar azalma göstermiştir. Settani [50] ve Şengün [27] tarafından yapılan çalışmalarda da M17 agarda gelişen mikroorganizmaların sayısı sırasıyla dördüncü ve ikinci günlerden sonra azalmaktadır. Bursa tarhanasında ise fermantasyonun üçüncü gününde hamura geleneksel reçete gereği yeni malzemeler eklenmesinin etkisiyle LAB metabolizmasının artmaya devam etmesi sonucu bu mikroorganizmaların sayısının tekrar yükseldiği düşünülmektedir. Fermantasyonun yedinci ve onuncu günlerinde sayım sonuçları istatistiksel olarak benzer ($p>0.05$) bulunmuştur.

Kastamonu tarhanası örneklerinde yapılan sayım sonuçları fermantasyon süreci boyunca istatistiki olarak 2 gruba ayrılmıştır. Aranılan mikroorganizmaların varlığı F0 anında 6,372 log kob/g sayısından 24. saat sonunda 7,579'a ulaşmış ($p<0.05$), üçüncü gün sonunda azalmış ve beşinci günden itibaren artarak fermantasyon sonuna kadar istatistiki olarak aynı grup içinde kalmıştır ($p>0.05$). Fermantasyon bitişinde ise laktik streptokok ve

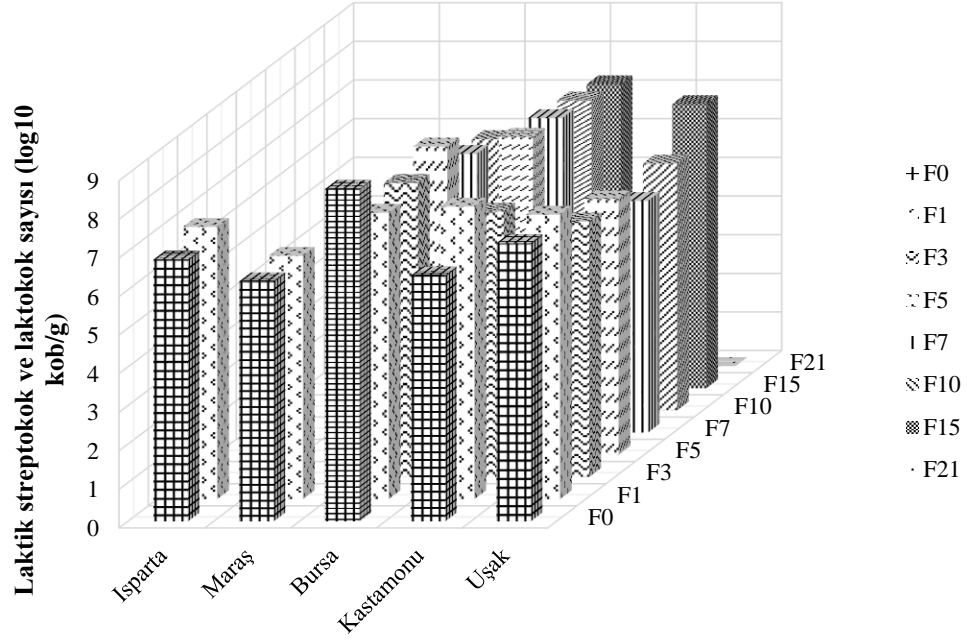
laktokokların varlığı 7,865 log kob/g sayısına ulaşmıştır. Özdemir [47] Kastamonu tarhanası örneklerindeki laktokok sayısını ortalama 4,33 log kob/g olarak belirlemiştir, Hendek-Ertop [45], aerobik LAB sayılarını 4,041 log kob/g ve 7,041 log kob/g arasında bulmuştur.

Uşak tarhanasından alınan örneklerde laktik streptokoklar ve streptokokların sayısı F0 (7,212 log kob/g) ve F1(7,371 log kob/g) anlarında istatistiki olarak aynı grupta yer alırken ($p>0.05$), fermantasyonun yedinci gününe kadar önemli bir değişme görülmemiş ($p>0.05$) ve daha sonra 7. günde belirgin bir azalma kaydedilmiştir. Fermantasyonun onuncu ve onbeşinci günlerinde mikroorganizma sayısında artış gözlenmiş ancak F21’de mayaların ortama hakim olmasıyla sayım yapılamamıştır. Buna paralel olarak F21’de laktik asit miktarında da önemli bir düşüş belirlenmiştir. Şengün [27] de Uşak tarhanası örneklerinde M17 agar besiyerinde F0’da 7,6 log kob/g bakteri tespit ederken, bu sayıda 6. güne kadar azalma tespit etmiş, daha sonra tekrar artış gözlenmesine rağmen fermantasyon sonunda 6,1 log kob/g değeri saptanmıştır.

Çizelge 4.9. M17 Agar besiyerinde günlere göre laktik streptokokların ve laktokokların sayıları (log₁₀ kob/g).

M17	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	6,786±0,043 ^{Bc}	6,220±0,292 ^{Ad}	8,610±0,006 ^{Aa}	6,372±0,028 ^{Bd}	7,212±0,053 ^{Ab}
1.GÜN	7,055±0,033 ^{Ac}	6,306±0,053 ^{Ad}	7,420±0,030 ^{CDab}	7,579±0,023 ^{Aa}	7,371±0,111 ^{Ab}
3.GÜN	DY	DY	7,615±0,016 ^{Ca}	6,881±0,595 ^{Bab}	6,616±0,026 ^{Bb}
5.GÜN	DY	DY	7,980±0,003 ^{Bb}	8,230±0,052 ^{Aa}	6,625±0,128 ^{Bc}
7.GÜN	DY	DY	7,216±0,254 ^{DEb}	8,142±0,091 ^{Aa}	5,999±0,202 ^{Cc}
10.GÜN	DY	DY	7,023±0,082 ^{Eb}	8,023±0,134 ^{Aa}	6,392±0,020 ^{Bc}
15.GÜN	DY	DY	DY	7,865±0,076 ^{Aa}	7,353±0,029 ^{Ab}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	GY ^D

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır. “GY” ile gösterilen günlerde gelişme gözlenmemiştir.



Şekil 4.10. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca laktik streptokok ve laktokok sayısı değişimi (log10 kob/g).

4.2.4. Fermantasyon Süresi Boyunca Streptokokların Sayısında Görülen Değişimler

Tarhanada kullanılan süt ve yoğurt gibi hammaddelerden kaynaklanabilecek streptokokların tespiti için NRLC besiyerinde yapılan sayım sonuçları Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Isparta tarhanası örneklerinde F0 anında 8,268 log kob/g olan streptokok sayısı 24 saatlik fermantasyonun sonunda 7,918 log kob/g değerine gerilemiştir. Bunun yanında fermantasyon başlangıcında bu çeşitte tespit edilen streptokok varlığı diğer tarhana çeşitlerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, geleneksel reçetede yer alan süzme ev yoğurdu ve bu yoğurdun diğer çeşitlere kıyasla hamurda oransal olarak daha fazla bulunması olabilir. Fermantasyon prosesinin devamında düşen pH değeri ile birlikte streptokok sayısının azaldığı görülmektedir. Benzer şekilde metagenomik çalışmalar da 24. saat sonuna streptokok varlığında azalma göstermektedir.

Maraş tarhanası örneklerinden yapılan mikrobiyolojik ekim sonuçlarına göre F0 anında 6,243 log kob/g olan streptokok sayısı 24. saatin sonunda 6,315 log kob/g olmuştur. Ancak iki ölçüm arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$).

Bursa tarhanası örneklerinden fermantasyon başlangıcında sadece ekme mayası ve un kullanılarak hazırlanan karışımdan yapılan ekimlerde Petri kutularında maya gelişiminden dolayı sayım yapılamamıştır. Prosesin ilk 24 saati sonunda 6,744 log kob/g streptokok tespit edilirken 3. gün analizlerinde yine mayalar ortama hakim olmuş ve sayım yapılamamıştır. Fermantasyon sürecinin devamında hamura yeni bileşenler eklenmesiyle F5’de 6,372 log kob/g olan streptokok sayısı F10 örneklerinde 6,066 log kob/g’a gerilemiştir.

Çizelge 4.10. NRLC Agar besiyerinde günlere göre streptokokların sayıları (log10 kob/g).

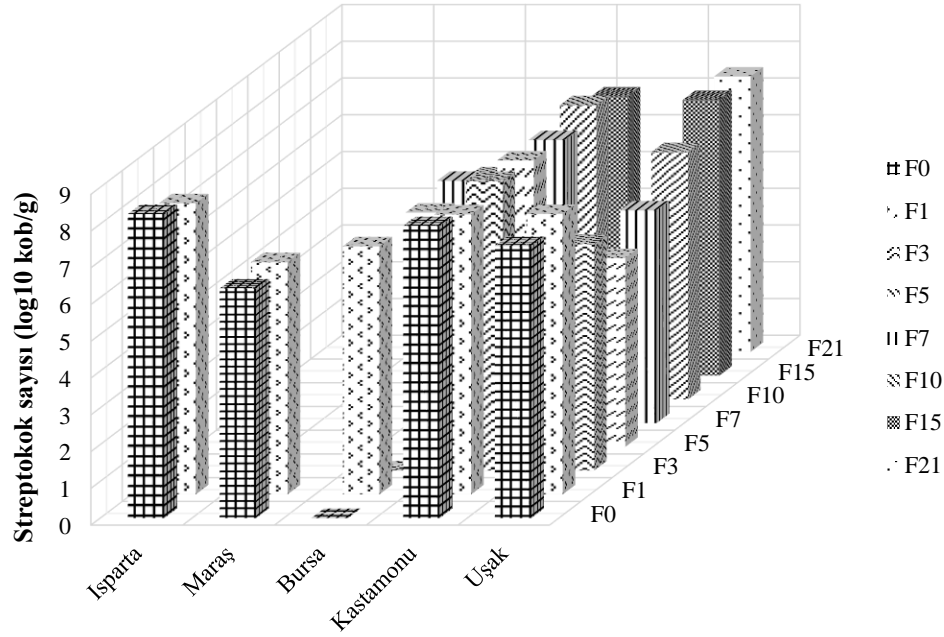
NRLC	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	8,268±0,060 ^{Aa}	6,243±0,019 ^{Ad}	Maya ^{Dc}	7,942±0,052 ^{ABb}	7,400±0,071 ^{Ac}
1.GÜN	7,918±0,013 ^{Ba}	6,315±0,217 ^{Ad}	6,744±0,079 ^{Ac}	7,614±0,011 ^{Cb}	7,627±0,013 ^{Ab}
3.GÜN	DY	DY	Maya ^{Dc}	7,876±0,157 ^{ABCa}	6,165±0,236 ^{BCb}
5.GÜN	DY	DY	6,372±0,047 ^{Bb}	7,792±0,018 ^{ABCa}	5,133±0,580 ^{Dc}
7.GÜN	DY	DY	6,589±0,111 ^{Ab}	7,698±0,004 ^{BCa}	5,783±0,078 ^{CDc}
10.GÜN	DY	DY	6,066±0,042 ^{Cc}	8,003±0,223 ^{Aa}	6,725±0,046 ^{Bb}
15.GÜN	DY	DY	DY	7,595±0,017 ^{Ca}	7,499±0,021 ^{Ab}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	7,491±0,178 ^A

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Kastamonu tarhanası hazırlanmasının ilk aşaması olan sıvı yoğurt harcında F0 anında 7,942 log kob/g streptokok tespit edilmiştir. Bu çeşitte tespit edilebilen streptokok varlığı fermantasyon süreci boyunca artış ve azalışlar göstermekle birlikte istatistiki olarak benzer gruplanmalar oluşturmuştur. Fermantasyon sonunda ise 7,595 log kob/g olan streptokok sayısı başlangıç anına göre azalmıştır.

Uşak tarhanası hamurlarında fermantasyon başlangıcında 7,400 log kob/g olan streptokok sayısı 24 saatlik fermantasyon sonunda azalma gösterse de istatistiki olarak belirgin bir

farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$). Streptokok varlığında fermantasyon boyunca dalgalanmalar olmakla birlikte 5. günde en düşük sayı (5,133 log kob/g) tespit edilirken, fermantasyon başlangıcı ile sonu arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.11. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca streptokok sayısı değişimi (log10 kob/g).

4.2.5. Fermantasyon Süresi Boyunca Enterokokların Sayısında Görülen Değişimler

Kanamycin Aesculin Azide agar, özellikle hayvan orijinli gıda ürünlerinden enterokokların izolasyonu ve identifikasyonunda kullanılan bir besiyeridir. Örneklerin enterokok sayım sonuçları Çizelge 4.11’de gösterilmiştir. Isparta tarhanasında F0’da 2,242 log kob/g olan enterokok sayısı 24 saat sonunda 6,922 log kob/g değerine ulaşmıştır. Soyyiğit [38] ise Isparta tarhanası örnekleriyle yaptığı çalışmada bütün örneklerde *Enterococcus* cinsi varlığını <10 log kob/g olarak belirlemiştir. Şengün [27] ise Isparta tarhanası çeşidinin enterokok varlığını F0 anında 2,3 log kob/g olarak ölçerken fermantasyon sonunda 1,8 log kob/g’a düştüğünü tespit etmiştir.

Maraş tarhanası çeşidinde F0 anında 5,525 log kob/g olan enterokok sayısı 24 saatlik fermantasyon sonunda 5,820 log kob/g sayısına ulaşmış ve iki ölçüm istatistiki olarak farklı ($p<0.05$) bulunmuştur.

Bursa tarhanası hamurlarında enterokok varlığı F0 anında yapılan ekimlerde 6,553 log kob/g olarak belirlenmiş ve üçüncü güne kadar bu sayıda istatistiki olarak önemli bir fark ($p>0.05$) bulunamamıştır. Fermantasyon sürecinin devamında enterokok varlığında artış ve azalmalar tespit edilerek onuncu gün sonunda bu sayı 5,874 log kob/g olmuştur.

Çizelge 4.11. KAA Agar besiyerinde günlere göre enterokokların sayıları (log₁₀ kob/g).

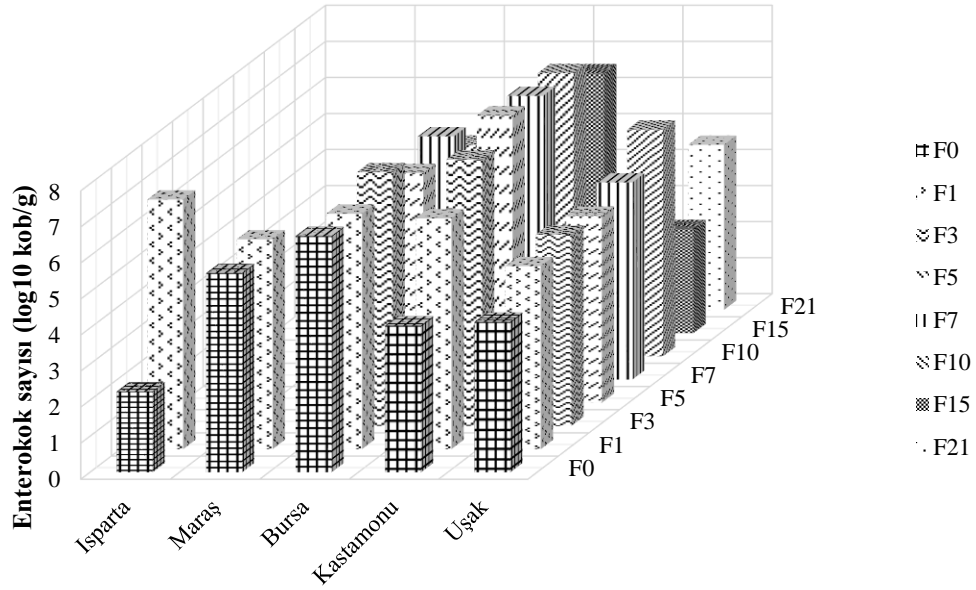
KAA	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	2,242±0,133 ^{Bd}	5,525±0,052 ^{Bb}	6,553±0,121 ^{BCa}	4,070±0,111 ^{Dc}	4,175±0,121 ^{Fc}
1.GÜN	6,922±0,209 ^{Aa}	5,820±0,072 ^{Ac}	6,531±0,033 ^{BCb}	6,401±0,174 ^{Cb}	5,075±0,073 ^{Dd}
3.GÜN	DY	DY	7,037±0,080 ^{Ab}	7,392±0,027 ^{Ba}	5,301±0,00 ^{BCc}
5.GÜN	DY	DY	6,370±0,073 ^{Cb}	7,966±0,043 ^{Aa}	5,185±0,033 ^{CDc}
7.GÜN	DY	DY	6,748±0,084 ^{Bb}	7,867±0,114 ^{Aa}	5,466±0,037 ^{Bc}
10.GÜN	DY	DY	5,874±0,114 ^{Dc}	7,859±0,025 ^{Aa}	6,290±0,075 ^{Ab}
15.GÜN	DY	DY	DY	7,208±0,085 ^{Ba}	2,884±0,033 ^{Gb}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	4,579±0,126 ^E

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Kastamonu tarhanası çeşidinde en düşük enterokok sayısı fermantasyon başlangıcında belirlenirken (4,070 log kob/g) bu sayı 5. güne kadar artış göstermiştir. Fermantasyonun beşinci, yedinci ve onuncu günlerinde enterokok sayıları arasında istatistiki olarak önemli bir fark ($p>0.05$) tespit edilememiştir. Fermantasyon süreci sonunda hamurda tespit edilen enterokok sayısı 7,208 log kob/g düzeyindedir.

Uşak tarhanası örneklerinde F0 anında belirlenen enterokok sayısı 4,175 log kob/g olurken bu sayı F5’e kadar artış göstermiştir. Fermantasyon boyunca artış ve azalışlar

gerçekleşirken en yüksek enterokok varlığı 10. günde (6,290 log kob/g) ve en düşük F15’de (2,884 log kob/g) tespit edilmiştir. Fermantasyon sonunda ise bu sayı 4,579 log kob/g olarak belirlenmiştir. Şengün [27], ise 21 günlük fermantasyon uygulanan Uşak tarhanası örneklerinde enterokok sayısının F0’da 5,9 log kob/g’den F21’de 5,1 log kob/g değerine düştüğünü belirlemiştir.



Şekil 4.12. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca enterokok sayısı değişimi (log10 kob/g).

4.2.6. Fermantasyon Süresi Boyunca Maya ve Küf Sayısında Görülen Değişimler

Tarhana hamuru çeşitlerinde maya-küf sayısı tespiti için DRBC agar besiyerine ekimler yapılmış ve sayım sonuçları Çizelge 4.12’de gösterilmiştir.

Isparta tarhanası örneklerinde F0 anında 6,502 log kob/g olan maya sayısı 24 saatlik fermantasyon sonucunda 8,211 log kob/g olarak belirlenmiştir. Soyyiğit [38], Isparta tarhanalarında yaptığı çalışmada ortalama maya-küf sayısını 6,204 log kob/g olarak tespit ederken, en yüksek fungal yüke sahip örnekte 7,518 log kob/g değeri ölçülmüştür. Maraş tarhanası çeşidinde fermantasyon başlangıcında 6,117 log kob/g olan maya sayısı 1 günlük fermantasyon sonunda 7,100 log kob/g sayısına ulaşmıştır.

Fermantasyonun başlangıcında maya küf sayısı 7,505 log kob/g olarak tespit edilen Bursa tarhanası, tüm örnekler içinde başlangıç anında en yüksek maya-küf içeren çeşittir. Bu durumun geleneksel reçetede ekmek mayası kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Fermantasyonun beşinci gününe kadar bu sayıda azalma gözlenirken, F1 ve F5 arasında istatistiki açıdan önemli bir değişim gözlenememiştir ($p>0.05$). Bu eğilimin aksine Kıvanç [52] ve Erbaş [36] ise fermantasyonun ilk 5 gününde maya-küf sayısının sürekli arttığını belirlemişlerdir. De Vuyst [180], daha düşük pH ile fermantasyona başlanan ekşi hamurlarda maya gelişiminin desteklendiğini belirlemiştir. Bursa tarhanasında diğer çeşitlere kıyasla başlangıç pH değerinin yüksek olması bu eğilimin sebebi olabilir. Prosesin devamında F7’de en düşük sayım gözlenirken (6,897 log kob/g) fermantasyon sonunda 7,230 log kob/g maya-küf varlığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. DRBC besiyerinde günlere göre maya sayıları (log₁₀ kob/g).

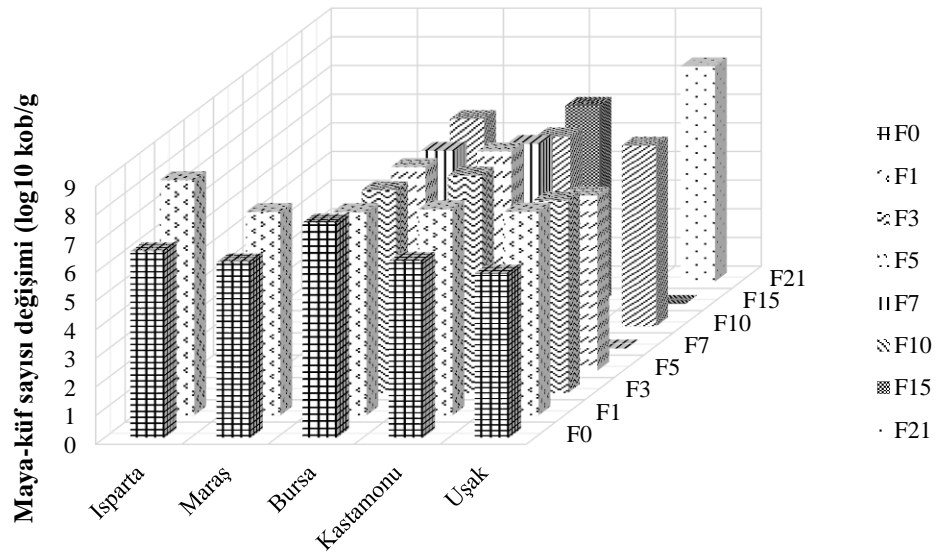
DRBC	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
0.GÜN	6,502±0,174 ^{Bb}	6,117±0,100 ^{Bc}	7,505±0,081 ^{Aa}	6,162±0,077 ^{Ec}	5,728±0,142 ^{Fd}
1.GÜN	8,211±0,047 ^{Aa}	7,100±0,139 ^{Ab}	7,091±0,020 ^{BCb}	7,194±0,043 ^{Bb}	7,110±0,067 ^{Bb}
3.GÜN	DY	DY	7,076±0,060 ^{BCb}	7,591±0,019 ^{Aa}	6,730±0,012 ^{Cc}
5.GÜN	DY	DY	7,111±0,250 ^{BCb}	7,659±0,015 ^{Aa}	6,111±0,060 ^{Ec}
7.GÜN	DY	DY	6,897±0,089 ^{Cb}	7,139±0,095 ^{BCa}	GY ^{Gc}
10.GÜN	DY	DY	7,230±0,082 ^{ABa}	6,625±0,128 ^{Db}	6,301±0,022 ^{Dc}
15.GÜN	DY	DY	DY	6,911±0,0117 ^{Ca}	GY ^{Gb}
21.GÜN	DY	DY	DY	DY	7,512±0,047 ^A

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır. “GY” ile gösterilen günlerde gelişme gözlenememiştir.

Kastamonu tarhanası hamurunda bulunan maya sayısı F0 anında 6,162 log kob/g olarak belirlenirken ilk 5 gün boyunca artış göstermiş ve beşinci günde 7,659 log kob/g ölçülmüştür. Metagenomik analiz sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde bu artışın kaynağının *Dipodascaceae* ailesi üyeleri olduğu görülmektedir. Bu aile üyeleri yaygın bir dağılım gösterse de genellikle bozulan bitki dokularında bulunduğundan; ilk 7 günde

hazırlanan yoğurt harcı yapısında bulunan bitkilerden kaynaklandığı düşünülebilir. Bu sayı fermantasyonun yedinci gününden itibaren azalmaya başlamış ve fermantasyon sonunda 6,911 log kob/g değerine düşmüştür. Hendek-Ertop [45], Kastamonu çeşidinde maya sayılarını 4,477-7,477 log kob/g aralığında belirlerken; İçli [181], bu değişimi 5,0-6,342 log kob/g aralığında bulmuştur.

Uşak tarhanası çeşidinde fermantasyon başlangıcında maya-küf sayısı 5,728 log kob/g olarak tespit edilmiş ve 24 saatlik fermantasyon sonunda bu sayı 7,110 log kob/g değerine ulaşmıştır. Fermantasyonun devamında maya-küf varlığı azalma göstermiş ancak 7. günde Petri kutularında gelişme gözlenememiştir. Prosesin 10. gününde 6,301 log kob/g maya-küf sayısı belirlenmiş ancak 15. günde yine Petri kutularında gelişme olmamıştır. Fermantasyon sonunda ise 7,512 log kob/g maya-küf tespit edilmiştir.



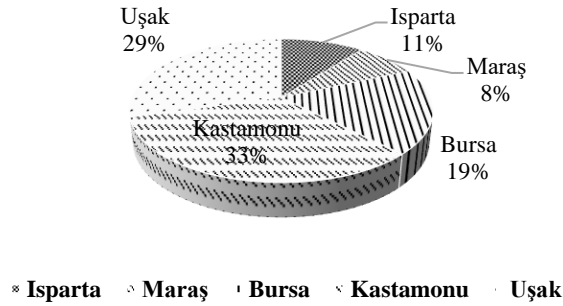
Şekil 4.13. Tarhana hamuru çeşitlerinde fermantasyon süreci boyunca maya-küf sayısı değişimi (log10 kob/g).

4.3. Kültüromik Yaklaşımlar (MALDI TOF MS) Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi

Farklı besiyerlerine yapılan mikrobiyolojik ekimler sonucu elde edilen saf kolonilere formik asit ile protein ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra MALDI TOF MS ile

tanımlama yapılmıştır. Her saf örnek MALDI TOF MS hedef slaytına iki kez sürülerek okumalar ve değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir.

Klasik mikrobiyolojik ekimler sonucunda Petri kutularında farklı olduğu düşünülen suşlar izole edilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemleri sonucunda elde edilen 513 adet izolatin %11'i Isparta, %8'i Maraş, %19'u Bursa, %33'ü Kastamonu ve %29'u Uşak tarhanası çeşitlerine aittir (Şekil 4.14). İzolatların elde edildiği besiyeri orijinleri incelendiğinde ise en yüksek sayıda izolat MRS besiyerinden elde edilen laktobasiller olmuştur. Ayrıca 84 adet streptokok olduğu düşünülen izolat NRLC besiyerlerinden, 82 adet laktik streptokok ve laktokok M17 besiyerlerinden, 62 adet enterokok KAA besiyerinden ve 77 adet maya-küf DRBC besiyerinden saflaştırılmıştır (Çizelge 4.13). Ancak, izolatların yalnızca 199 tanesi SARAMIS doğruluk skoru değerlendirmesinde %99.9-%75.0 aralığında tanımlanabilmiştir. Bu durumun cihaz yazılımı veri tabanında tanımlı bulunan LAB çeşitliliğinin sınırlılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada da farklı bölgelerden toplanan evsel ve ticari 55 tarhana örneğinden izole edilen 210 adet LAB'nin 86 adedi (%41) MALDI TOF MS ile tanımlanabilmiştir [182].



Şekil 4.14. MALDI TOF MS ile analiz edilen izolatların tarhana çeşitlerine göre dağılımı.

Çizelge 4.13. Tarhana örneklerinden saflaştırılan izolatların besiyeri ve fermantasyon gününe göre dağılımı.

Örnek kodu	MRS	M17	NRLC	KEA	DRBC	Toplam
Isparta F0	9	6	7	3	2	27
Isparta F1	11	6	5	2	3	27
Maraş F0	4	2	5	1	9	21
Maraş F1	10	2	2	1	4	19
Bursa F0	11	2	0	1	3	17
Bursa F1	8	4	6	4	2	24
Bursa F3	9	2	0	1	2	14
Bursa F5	4	3	3	2	1	13
Bursa F1	5	3	1	3	3	15
Bursa F10	6	1	2	5	2	16
Kastamonu F0	3	7	6	4	4	24
Kastamonu F1	4	4	4	2	3	17
Kastamonu F3	7	5	5	3	4	24
Kastamonu F5	8	4	5	5	2	24
Kastamonu F7	9	6	5	5	1	26
Kastamonu F10	9	3	4	1	3	20
Kastamonu F15	19	2	4	2	7	34
Uşak F0	10	3	2	4	4	23
Uşak F1	9	3	3	2	2	19
Uşak F3	9	2	3	1	2	17
Uşak F5	7	4	4	4	2	21
Uşak F7	9	2	3	3	0	17
Uşak F10	8	2	1	1	8	20
Uşak F15	9	3	1	1	0	14
Uşak F21	11	1	3	1	4	20
TOPLAM	208	82	84	62	77	513

Kültüromik yaklaşımlar kullanılarak MALDI TOF MS cihazı ile yapılan analizlerin tanımlama sonuçları bakteriler için Çizelge 4.14’de ve maya-küfler için Çizelge 4.15’de gösterilmiştir. Tanımlanabilen tüm izolatlar arasında *Lactiplantibacillus plantarum* (%63,87) en yüksek oranda tespit edilmiştir. Tanımlanabilen diğer bakteriyel türler ise *Levilactobacillus brevis* (%10,32), *Lactobacillus delbrueckii* (%5,16), *Bacillus cereus* (%2,58), *Enterobacter faecium* (%2,58), *Pediococcus pentosaceus* (%1,94), *Providencia rettgeri* (%1,94), *Micrococcus luteus* (%1,94), *Lactobacillus helveticus* (%1,29), *Enterobacter cloacae* (%1,29), *Serratia fonticola* (%1,29), *Stenotrophomonas maltophilia* (%1,29), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (%0,64), *Siccibacter turicensis* (%0,64), *Escherichia coli* (%0,64), *Acinetobacter lwoffii* (%0,64), *Bacillus circulans* (%0,64) ve *Klebsiella oxytoca* (%0,64)’dır. Ateş [182] tarafından yapılan çalışmada ise çalışılan örneklerin %50’si *Pediococcus pentosaceus*, %24,4’ü *Enterococcus faecalis*, %6,98’i *Enterococcus faecium*, %9,3’ü *Limosilactobacillus fermentum*, %3,4’ü *Levilactobacillus brevis* ve %5,81’i *Lactiplantibacillus pentosus/plantarum/paraplantarum* olarak belirlenmiştir.

Tanımlanan izolatların tarhana çeşitleri arasındaki dağılımı incelendiğinde ise *Lactiplantibacillus plantarum* türü bakterilerin %50’si Uşak tarhanası örneklerinden izole edilmiştir. Kalan *Lactiplantibacillus plantarum* suşları ise Isparta, Maraş ve Kastamonu çeşitlerinden elde edilmiştir. İzole edilen diğer LAB’den *Lactobacillus delbrueckii* suşları yalnızca Maraş ve Uşak çeşitlerinde tespit edilmişken, *Levilactobacillus brevis* türü Maraş, Kastamonu ve Uşak tarhanalarında bulunmuştur. Ayrıca Maraş ve Uşak tarhanalarında *Lactobacillus helveticus* ve Uşak tarhanası F21 örneğinde *Lacticaseibacillus rhamnosus* tespit edilmiştir. *Enterobacter* cinsi bakterilerin ise Isparta, Maraş, Bursa ve Kastamonu çeşitlerinden izole edildiği görülmüştür. Maraş, Bursa, Kastamonu ve Uşak çeşitlerinde *Bacillus* cinsi bakteriler gözlenmiştir. Soyuçok [29] da tarhana hamurlarının fermantasyon sürecinde ve son üründe *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar tespit edildiğini rapor etmiştir.

Tanımlanan bakteriyel izolatların Ulusal Süt Ürünleri Gen Bankası’nda depolanması sırasında verilen kodlama sistemi aşağıdaki gibidir:

Süt Ürünleri Gen Tarhana Çeşidi Fermantasyon İzolat Numarası
Bankası Günü
TSGB MT FO 001

Çizelge 4.14. Tarhana örneklerinden izole edilen bakteri suşlarının MALDI TOF MS ile tanımlama sonuçları.

Örnek kodu	Mikroorganizma	1.Tanımlama (%)	2.Tanımlama (%)
TSGB/IT/F0/001	<i>Enterococcus faecium</i>	99.9	99.9
TSGB/IT/F0/002	<i>Enterococcus faecium</i>	99.9	99.9
TSGB/IT/F0/003	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/IT/F0/004	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/IT/F0/005	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/IT/F0/006	<i>Siccibacter turicensis</i>	92.8	99.9
TSGB/IT/F1/001	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/IT/F1/002	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/IT/F1/003	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/IT/F1/004	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	80.0
TSGB/IT/F1/005	<i>Enterobacter cloacae</i>	79.4	77.5
TSGB/MT/F0/001	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	96.9	99.9
TSGB/MT/F0/002	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	93.8	99.9
TSGB/MT/F0/003	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	75.1	99.9
TSGB/MT/F0/004	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/005	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/006	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/007	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9

TSGB/MT/F0/008	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/009	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/010	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/011	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/012	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	79.3	92.8
TSGB/MT/F1/001	<i>Enterococcus faecium</i>	75.7	84.0
TSGB/MT/F1/002	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	81.4	84.4
TSGB/MT/F1/003	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	87.2	84.3
TSGB/MT/F1/004	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	80.0	88.0
TSGB/MT/F1/005	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	80.0	80.0
TSGB/MT/F1/006	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	86.1	89.5
TSGB/MT/F1/007	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	89.4	86.1
TSGB/MT/F1/008	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	86.1	82.0
TSGB/MT/F1/009	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	89.4	86.1
TSGB/MT/F1/010	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	78.0	84.0
TSGB/MT/F1/011	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F1/012	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F1/013	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F1/014	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F1/015	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F1/016	<i>Escherichia coli</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F1/017	<i>Bacillus cereus</i>	91.8	99.9
TSGB/MT/F1/018	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	99.9	84.5

TSGB/MT/F1/019	<i>Lactobacillus helveticus</i>	90.0	90.0
TSGB/MT/F1/020	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	78.0	84.0
TSGB/BT/F1/001	<i>Enterobacter cloacae</i>	81.1	82.9
TSGB/BT/F3/001	<i>Bacillus circulans</i>	86.4	86.4
TSGB/BT/F5/001	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	75.2	79.9
TSGB/BT/F5/002	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	91.8	88.4
TSGB/BT/F7/001	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	85.0	88.4
TSGB/KT/F0/001	<i>Providencia rettgeri</i>	98.6	99.9
TSGB/KT/F0/002	<i>Providencia rettgeri</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F0/003	<i>Serratia fonticola</i>	80.9	89.8
TSGB/KT/F1/001	<i>Enterobacter sp.</i>	83.8	83.7
TSGB/KT/F1/002	<i>Serratia fonticola</i>	86.5	86.4
TSGB/KT/F3/001	<i>Providencia rettgeri</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F3/002	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F10/01	<i>Enterococcus faecium</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F10/02	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	81.2	81.2
TSGB/KT/F10/03	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	81.3	84.2
TSGB/KT/F10/04	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	84.5	78.3
TSGB/KT/F10/05	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	75.2	81.3
TSGB/KT/F10/06	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	87.5	84.4
TSGB/KT/F10/07	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F10/08	<i>Levilactobacillus brevis</i>	89.6	79.7
TSGB/KT/F10/09	<i>Levilactobacillus brevis</i>	89.7	87.5

TSGB/KT/F15/001	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	97.0
TSGB/KT/F15/002	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	87.4	90.5
TSGB/KT/F15/003	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	81.3	81.5
TSGB/KT/F15/004	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	81.3	87.5
TSGB/KT/F15/005	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	84.3	84.4
TSGB/KT/F15/006	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	81.2	84.4
TSGB/KT/F15/007	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	90.5	84.6
TSGB/KT/F15/008	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	84.4	96.9
TSGB/KT/F15/009	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	90.7	90.8
TSGB/KT/F15/010	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	81.3	90.7
TSGB/KT/F15/011	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	93.8	90.5
TSGB/KT/F15/012	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/013	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	96.9	99.9
TSGB/KT/F15/014	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	78.0	90.5
TSGB/KT/F15/015	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	87.5	87.4
TSGB/KT/F15/016	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	93.7	87.5
TSGB/KT/F15/017	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/018	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/019	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/020	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/021	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/022	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/023	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9

TSGB/KT/F15/024	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/025	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/026	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/027	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/028	<i>Bacillus cereus</i>	99.9	96.9
TSGB/UT/F0/001	<i>Lactobacillus helveticus</i>	93.1	93.1
TSGB/UT/F0/002	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	85.8	86.1
TSGB/UT/F0/003	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F0/004	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F0/005	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F0/006	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F1/001	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F1/002	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F1/003	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F1/004	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F1/005	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F7/001	<i>Micrococcus luteus</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F7/002	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	93.7	99.9
TSGB/UT/F10/001	<i>Micrococcus luteus</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F10/002	<i>Micrococcus luteus</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F10/003	<i>Bacillus cereus</i>	78.2	99.9
TSGB/UT/F10/004	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F10/005	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9

TSGB/UT/F10/006	<i>Levilactobacillus brevis</i>	93.0	96.2
TSGB/UT/F10/007	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	96.8	93.8
TSGB/UT/F10/008	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/001	<i>Bacillus cereus</i>	91.8	99.9
TSGB/UT/F15/002	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/003	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/004	<i>Levilactobacillus brevis</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/005	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/006	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/007	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/008	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/009	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/010	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/011	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/012	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/013	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/014	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	90.5	90.5
TSGB/UT/F15/015	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	96.9	99.9
TSGB/UT/F15/016	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.8	96.9
TSGB/UT/F15/017	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	81.3	90.5
TSGB/UT/F15/018	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	87.6	93.7
TSGB/UT/F15/019	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	78.3	87.6
TSGB/UT/F21/001	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99.9	99.9

TSGB/UT/F21/002	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/003	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/004	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/005	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/006	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/007	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/008	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/009	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/010	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/011	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/012	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/013	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F21/014	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	96.9	84.2
TSGB/UT/F21/015	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	90.4	84.1
TSGB/UT/F21/016	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	93.8	81.1
TSGB/UT/F21/017	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	90.6	90.7
TSGB/UT/F21/018	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	93.8	87.5
TSGB/UT/F21/019	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	78.0	90.7
TSGB/UT/F21/020	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	97.1	96.9
TSGB/UT/F21/021	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	90.6	97.0
TSGB/UT/F21/022	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	93.7
TSGB/UT/F21/023	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99.9	99.9

Tarhana örneklerinden izole edilen fungal türlerin MALDI TOF MS ile tanımlama analizleri sonuçları Çizelge 4.16’da gösterilmiştir. Tanımlanabilen 44 adet izolatin %50’si *Candida krusei* (heterotipik eşanlamlısı *Pichia kudriavzevii* ve heterotipik eşanlamlısı *Issatchenkia orientalis*, [183]), %31,81’i *Saccharomyces cerevisiae*, %11,36’u *Candida kefyr* (heterotipik eşanlamlısı *Kluyveromyces marxianus*, [184]) ve %6,81’i *Geotrichum candidum/lebahnii*’dir. Tanımlanabilen *Candida krusei* (*Pichia kudriavzevii*) suşlarının %54,54’ü Uşak tarhanası örneklerinden ve %40,9’u Kastamonu örneklerinden izole edilmiştir. Bunun yanında *Saccharomyces cerevisiae* suşları ise Maraş, Bursa ve Kastamonu örneklerinden izole edilmiştir. Tanımlanabilen *Geotrichum candidum/lebahnii* suşları Kastamonu F5 ve F15 örneklerinden elde edilmiştir. Bir Fin içeceği olan “viili” fermantasyonunda da görev alan *Geotrichum candidum* türü küfler, fermantasyon sırasında içecek yüzeyine yükselen yağ tabakasının üzerinde gelişerek ürüne kadife rengini vermektedir [185].

Tanımlanan fungal izolatların Ulusal Süt Ürünleri Gen Bankası’nda depolanması sırasında verilen kodlama sistemi aşağıdaki gibidir:

Süt Ürünleri	Tarhana Çeşidi	Fermantasyon	İzolat Numarası	Fungi
Gen Bankası		Günü		
TSGB	MT	FO	001	F

Çizelge 4.15. Tarhana örneklerinden izole edilen maya ve küflerin MALDI TOF MS ile tanımlama sonuçları.

Örnek kodu	Mikroorganizma	1.Tanımlama	2.Tanımlama
TSGB/MT/F0/001/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/002/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/003/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/004/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/005/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/006/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9	99.9

TSGB/MT/F0/007/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/008/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76.7	99.9
TSGB/MT/F0/009/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9	99.9
TSGB/MT/F0/010/F	<i>Candida kefyr</i> *	99.9	99.9
TSGB/MT/F1/001/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93.1	90.0
TSGB/MT/F1/002/F	<i>Candida kefyr</i> *	99.9	90.0
TSGB/MT/F1/003/F	<i>Candida kefyr</i> *	99.9	99.9
TSGB/MT/F1/004/F	<i>Candida kefyr</i> *	99.9	99.9
TSGB/BT/F5/001/F	<i>Candida krusei</i> **	99.9	99.9
TSGB/BT/F7/001/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96.4	99.9
TSGB/BT/F7/002/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9	99.9
TSGB/BT/F7/003/F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9	99.9
TSGB/KT/F0/001/F	<i>Candida krusei</i> **	99.9	99.9
TSGB/KT/F5/001/F	<i>Geotrichum candidum/klebahnii</i>	99.9	84.5
TSGB/KT/F5/002/F	<i>Candida krusei</i> **	96.7	99.9
TSGB/KT/F7/001/F	<i>Candida kefyr</i> *	99.9	99.9
TSGB/KT/F10/001/F	<i>Candida krusei</i> **	78.6	99.9
TSGB/KT/F10/002/F	<i>Candida krusei</i> **	85.1	99.9
TSGB/KT/F15/001/F	<i>Candida krusei</i> **	99.9	99.9
TSGB/KT/F15/002/F	<i>Candida krusei</i> **	92.7	99.9
TSGB/KT/F15/003/F	<i>Candida krusei</i> **	88.9	88.8
TSGB/KT/F15/004/F	<i>Candida krusei</i> **	80.7	87.5
TSGB/KT/F15/005/F	<i>Candida krusei</i> **	88.5	99.9
TSGB/KT/F15/006/F	<i>Geotrichum candidum/klebahnii</i>	93.9	99.9
TSGB/KT/F15/007/F	<i>Geotrichum candidum/klebahnii</i>	99.9	99.9
TSGB/UT/F10/001/F	<i>Candida krusei</i> **	99.9	97.0
TSGB/UT/F10/002/F	<i>Candida krusei</i> **	84.6	88.8
TSGB/UT/F10/003/F	<i>Candida krusei</i> **	96.8	97.0
TSGB/UT/F10/004/F	<i>Candida krusei</i> **	80.7	97.0
TSGB/UT/F10/005/F	<i>Candida krusei</i> **	76.5	80.0

TSGB/UT/F10/006/F	<i>Candida krusei</i> **	99.9	80.5
TSGB/UT/F10/007/F	<i>Candida krusei</i> **	99.9	99.9
TSGB/UT/F10/008/F	<i>Candida krusei</i> **	80.5	76.5
TSGB/UT/F15/001/F	<i>Candida krusei</i> **	96.7	99.9
TSGB/UT/F15/002/F	<i>Candida krusei</i> **	99.9	99.9
TSGB/UT/F15/003/F	<i>Candida krusei</i> **	76.6	99.9
TSGB/UT/F15/004/F	<i>Candida krusei</i> **	80.5	99.9

**Candida kefyr* (Beij.), (Uden & H.R. Buckley ex S.A. Mey. & Ahearn, 1983), NCBI Taksonomi veri tabanında *Kluyveromyces marxianus* ((E.C. Hansen) Van der Walt, 1971)'un heterotipik eşanlamlısıdır [184]

***Candida krusei* ((Castell.) Berkhout, 1923), NCBI Taksonomi veri tabanında *Pichia kudriavzevii* Boidin, Pignal & Besson, 1965) ve *Issatchenkia orientalis* Kudryavtsev, 1960)'ın heterotipik eşanlamlısıdır [184]

Çeşitli bilimsel çalışmalar MALDI TOF MS cihazının mikrobiyolojik tanımlama laboratuvarları için altın bir standart metot olduğunu ortaya koymuştur [186–188]. Ancak, bu cihazın bazı bakteriyel türleri tanımlama ve birbirlerinden ayırma da eksiklikler gösterdiği bilinmektedir. Örnek olarak Jussiaux [186], MALDI TOF MS'in *Streptococcus salivarius* suşlarının tamamını hatasız bir şekilde tanımlarken, formik asit ekstraksiyonu metodu kullanılsa bile, laktobasil türlerinin tanımlanmasında zorluklar gösterdiğini belirtmiştir. Buna rağmen elde edilen analiz sonuçları tarhana örnekleri mikrobiyotasının anlaşılması ve daha ileri analizlerle incelenmesinde yol gösterici olmuştur.

4.4. Metagenomik Yaklaşımlar Kullanılarak Tarhana Mikrobiyotasının İncelenmesi

4.4.1. Genel Bakış

Farklı geleneksel yöntemlere ait reçetelerle hazırlanmış 5 adet tarhana hamurundan fermantasyonun belirlenen günlerde alınan toplam 19 adet örneğin Illumina MiSeq

platformunda yapılan 16S rRNA ve 18S rRNA dizileme analizlerine ait özet istatistik verileri sırasıyla Çizelge 4.16 ve 4.17’de gösterilmiştir. Bakteriyel türlere ait 16S dizilemesi sonucunda ortalama 344 bp uzunluğunda diziler elde edilirken ortalama Q değeri 39 (Şekil 4.15) bulunmuştur. Filtreden geçen toplam okuma sayısı 2,784,270 ve filtreden geçen toplam baz sayısı 949,276,697 olmuştur. Phred kalite skoru (Q skoru) ile ölçülen “baz çağırma (base calling)”, bir dizileme platformunun kesinliğini ölçmenin en yaygın metodudur. Q skoru değerlerinden baz çağırma doğruluğunun %99,9 olduğunu ifade eden Q30 skoru bu analiz için belirlenebilmiştir. Fungal türlerin belirlenmesi için gerçekleştirilen dizileme analizlerinde ise ortalama 250 bp uzunluğunda diziler elde edilmiş ve ortalama Q değeri 37 (Şekil 4.16) olarak tespit edilmiştir. Filtreden geçen toplam okuma sayısı da 57,403 olurken filtreden geçen toplam baz sayısı 14,321,334 olmuştur.

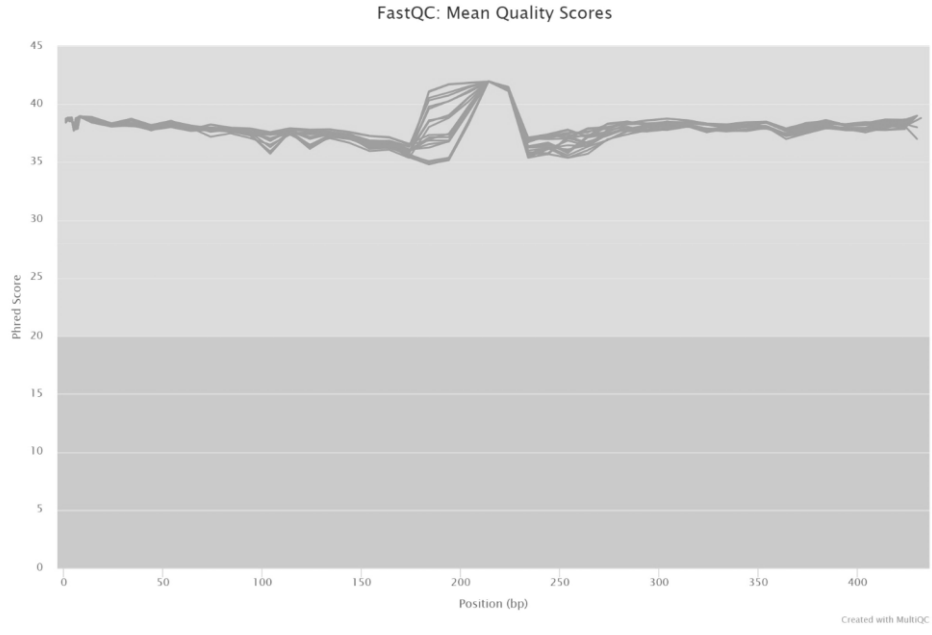
Çizelge 4.16. Metagenomik çalışmaya ait özet istatistik verileri (Bakteriyel DNA).

Örnek	Toplam dizi sayısı (16S rRNA)	Dizi uzunluğu (16S rRNA)	GC% (16S rRNA)
Isparta F0	26,233	112-428	%53
Isparta F1	54,018	88-428	%52
Maraş F0	79,734	88-428	%51
Maraş F1	56,907	89-428	%51
Bursa F0	171,403	86-429	%54
Bursa F1	177,701	86-428	%54
Bursa F7	130,903	86-428	%53
Bursa F10	95,026	86-430	%53
Kastamonu F0	82,111	112-428	%54
Kastamonu F1	99,660	112-430	%54
Kastamonu F7	56,925	84-430	%53
Kastamonu F10	43,719	114-428	%52
Kastamonu F15	66,036	86-429	%52
Uşak F0	87,912	133-430	%54

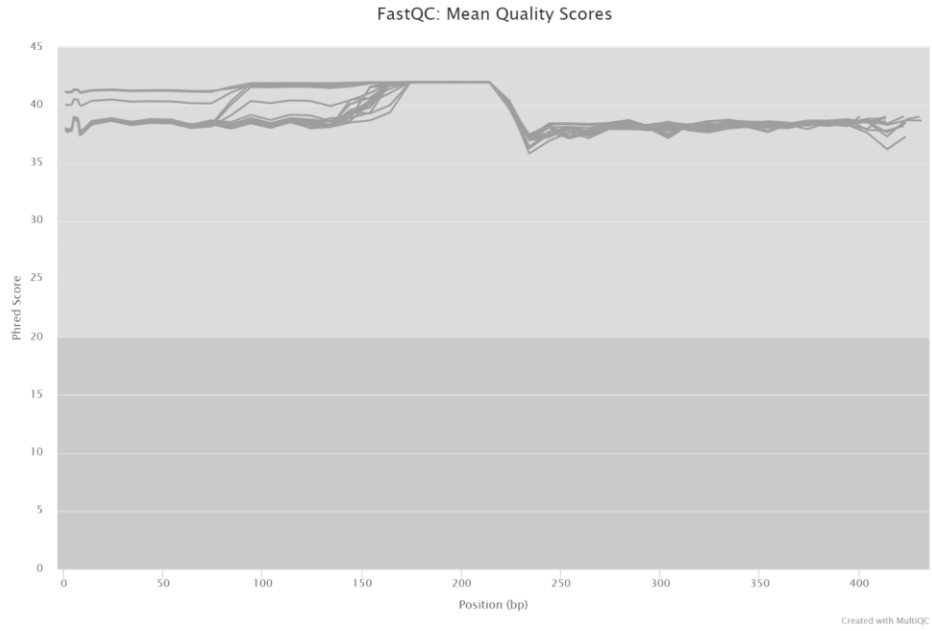
Uşak F1	26,009	84-434	%51
Uşak F7	37,113	84-430	%51
Uşak F10	22,413	84-430	%51
Uşak F15	27,483	84-428	%51
Uşak F21	15,278	84-430	%50

Çizelge 4.17. Metagenomik çalışmaya ait özet istatistik verileri (Fungal DNA).

Örnek	Toplam dizi sayısı (18S rRNA)	Dizi uzunluğu	GC%
		(18S rRNA)	(18S rRNA)
Isparta F0	119,858	132-416	%53
Isparta F1	143,623	99-405	%48
Maraş F0	186,631	91-432	%55
Maraş F1	176,029	91-430	%49
Bursa F0	127,367	99-424	%47
Bursa F1	139,892	91-417	%46
Bursa F7	148,485	99-416	%45
Bursa F10	170,857	91-427	%43
Kastamonu F0	145,435	170-394	%55
Kastamonu F1	135,233	132-415	%53
Kastamonu F7	160,531	99-392	%42
Kastamonu F10	179,258	99-392	%42
Kastamonu F15	159,172	132-397	%48
Uşak F0	112,468	91-427	%51
Uşak F1	125,501	99-424	%46
Uşak F7	133,738	125-400	%46
Uşak F10	81,442	205-398	%50
Uşak F15	150,667	239-398	%54
Uşak F21	188,083	205-398	%55

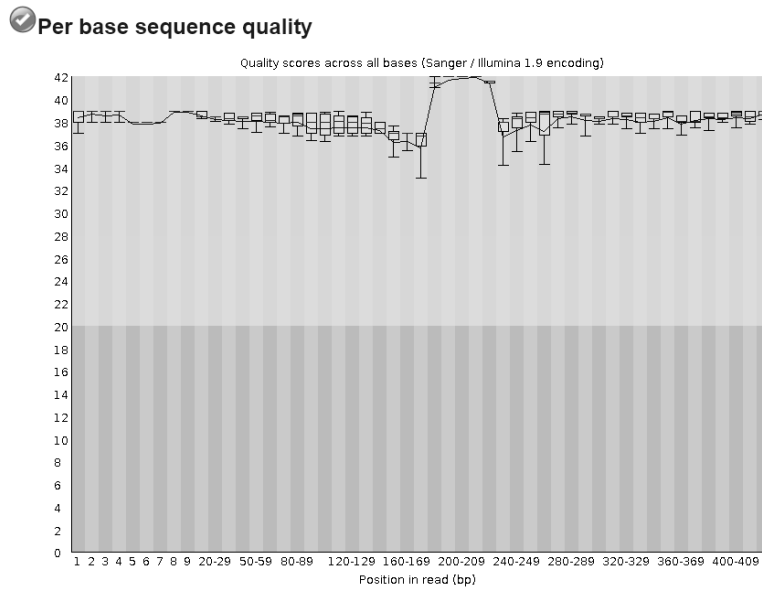


Şekil 4.15. 16S rRNA dizilemesine ait ortalama Q skoru grafiği (MultiQC raporundan alınmıştır).

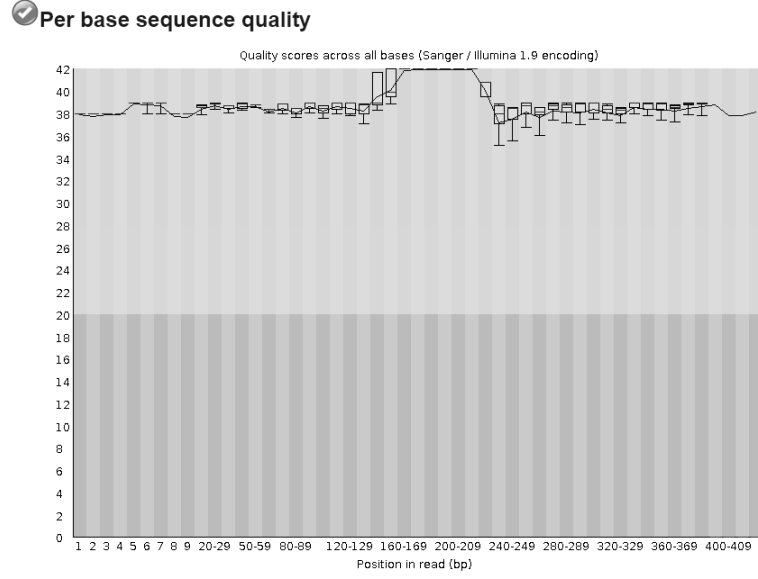


Şekil 4.16. 18S rRNA dizilemesine ait ortalama Q skoru grafiği (MultiQC raporundan alınmıştır).

Elde edilen okuma sonuçlarında ham verilerin kalite kontrol analizlerinde FastQC yazılımı kullanılmıştır. Uygulanan biyoinformatik analizler sonucunda ana istatistikler, baz dizisi başına kalite, dizi başına kalite skorları, dizi başına GC içeriği, dizi başına N içeriği, dizi uzunluğu dağılımı, kopya dizi seviyeleri, aşırı temsil edilen diziler ve sorun teşkil edebilecek adaptör içerikleri hakkında bilgi sahibi olunmuştur. FastQC raporundan elde edilen baz dizisi başına kalite grafikleri Bursa F0 örnekleri için Şekil 4.17 ve 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Bursa F0 örneği için bakteriyel mikrobiyotaya ait baz dizisi başına kalite grafiği (FastQC raporundan alınmıştır).



Şekil 4.18. Bursa F0 örneği için fungal mikrobiyotaya ait baz dizisi başına kalite grafiği (FastQC raporundan alınmıştır).

FastQC yazılımı ile yapılan analizler sonucu her örnek için elde edilen veriler MultiQC kullanılarak tek pencerede incelenebilmiştir. MultiQC analizleri sonucu elde edilen genel istatistikler tablosu bakteriyel türler için Çizelge 4.18 ve fungal türler için Çizelge 4.19'da gösterilmiştir. Bunun yanında yine FastQC raporunda tüm örnekler için ayrı ayrı elde edilen kalite sonuçlarının tüm örnekler için bir arada gösterildiği sonuç grafikleri Şekil 4.19 ve 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. MultiQC raporu sonucu bakteriyel türlere ait genel istatistikler tablosu.

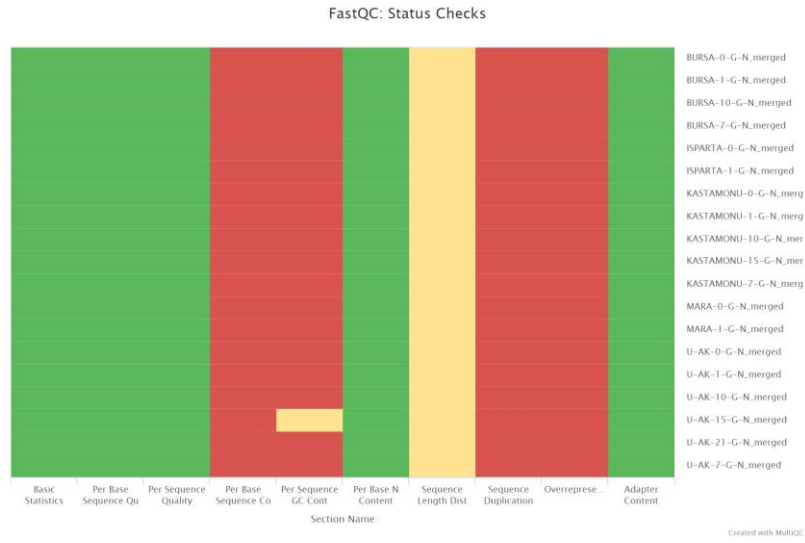
Örnek adı	% Dups	% GC	Length	M Seqs
ISPARTA/F0_merged	99.1%	53%	413 bp	0.0
ISPARTA/F1_merged	99.4%	52%	419 bp	0.1
MARAŞ/F0_merged	99.5%	51%	420 bp	0.1
MARAŞ/F1_merged	99.4%	51%	421 bp	0.1
BURSA/F0_merged	99.5%	54%	405 bp	0.2
BURSA/F1_merged	99.5%	54%	405 bp	0.2
BURSA/F7_merged	99.5%	53%	408 bp	0.1

BURSA/F10_merged	99.3%	53%	412 bp	0.1
KASTAMONU/F0_merged	99.5%	54%	408 bp	0.1
KASTAMONU/F1_merged	99.6%	54%	407 bp	0.1
KASTAMONU/F7_merged	98.9%	53%	413 bp	0.1
KASTAMONU/F10_merged	99.0%	52%	421 bp	0.0
KASTAMONU/F15_merged	99.1%	52%	418 bp	0.1
UŞAK/F0_merged	99.3%	54%	409 bp	0.1
UŞAK/F1_merged	98.9%	51%	420 bp	0.0
UŞAK/F7_merged	99.3%	51%	423 bp	0.0
UŞAK/F10_merged	99.2%	51%	423 bp	0.0
UŞAK/F15_merged	99.1%	51%	424 bp	0.0
UŞAK/F21_merged	98.8%	50%	424 bp	0.0

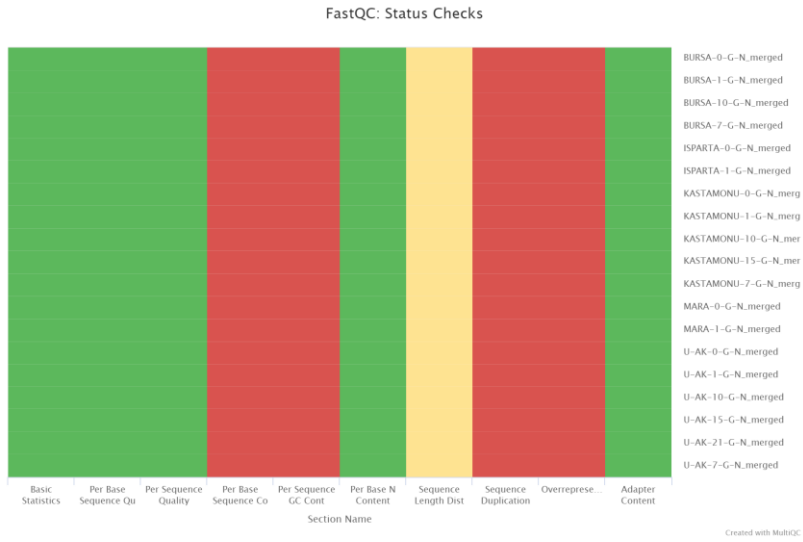
Çizelge 4.19. MultiQC raporu sonucu fungal türlere ait genel istatistikler tablosu.

Örnek adı	% Dups	% GC	Length	M Seqs
ISPARTA/F0_merged	99.5%	47%	374 bp	0.1
ISPARTA/F1_merged	99.6%	46%	377 bp	0.1
MARAŞ/F0_merged	99.7%	43%	379 bp	0.2
MARAŞ/F1_merged	99.6%	45%	374 bp	0.1
BURSA/F0_merged	99.7%	53%	380 bp	0.1
BURSA/F1_merged	99.7%	48%	390 bp	0.1
BURSA/F7_merged	99.7%	55%	367 bp	0.1
BURSA/F10_merged	99.6%	53%	368 bp	0.1
KASTAMONU/F0_merged	99.8%	42%	227 bp	0.2
KASTAMONU/F1_merged	99.7%	48%	256 bp	0.2
KASTAMONU/F7_merged	99.7%	42%	231 bp	0.2
KASTAMONU/F10_merged	99.7%	55%	366 bp	0.2
KASTAMONU/F15_merged	99.7%	49%	382 bp	0.2

UŞAK/F0_merged	99.5%	51%	371 bp	0.1
UŞAK/F1_merged	99.7%	46%	379 bp	0.1
UŞAK/F7_merged	99.7%	50%	339 bp	0.1
UŞAK/F10_merged	99.8%	54%	315 bp	0.2
UŞAK/F15_merged	99.9%	55%	308 bp	0.2
UŞAK/F21_merged	99.8%	46%	373 bp	0.1

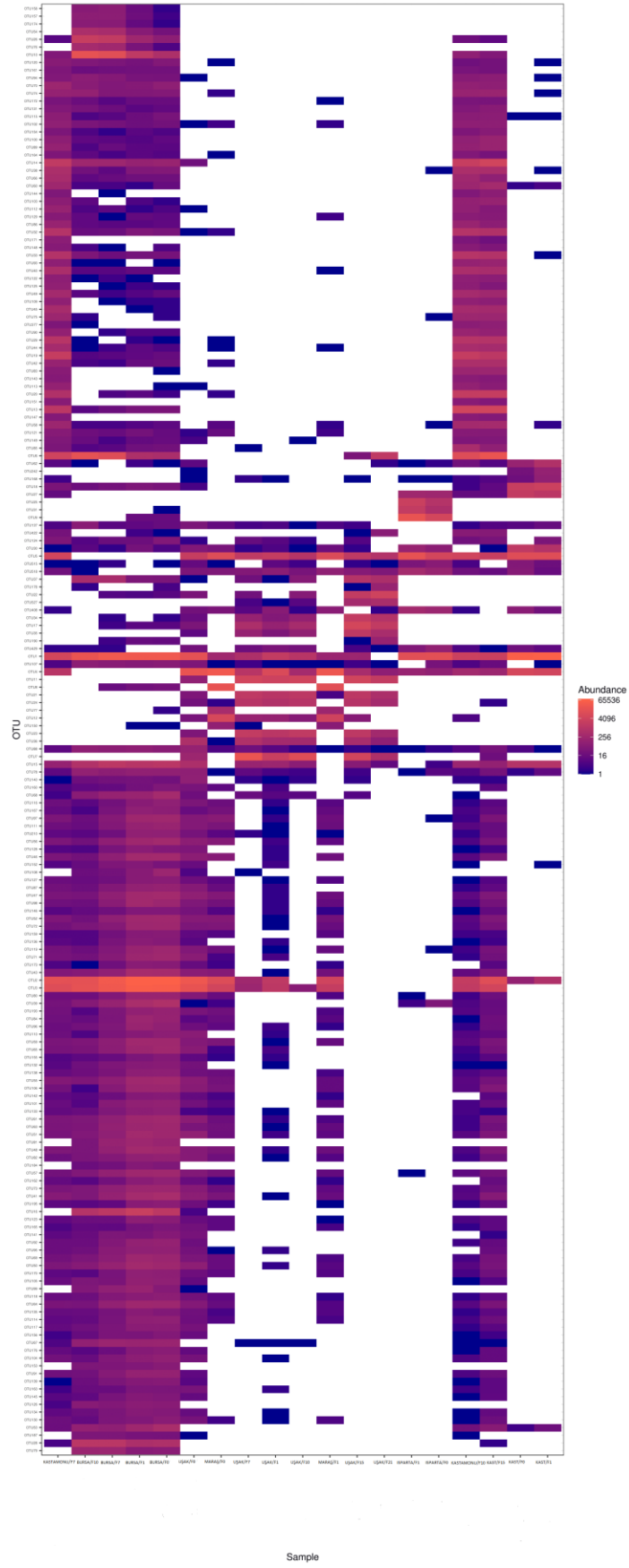


Şekil 4.19. MultiQC raporu sonucu 16S rRNA dizilemesi için kalite kontrol analizleri sonuçları, yeşil renk: tamamen normal, turuncu: hafif anormal, kırmızı: oldukça beklenmedik.

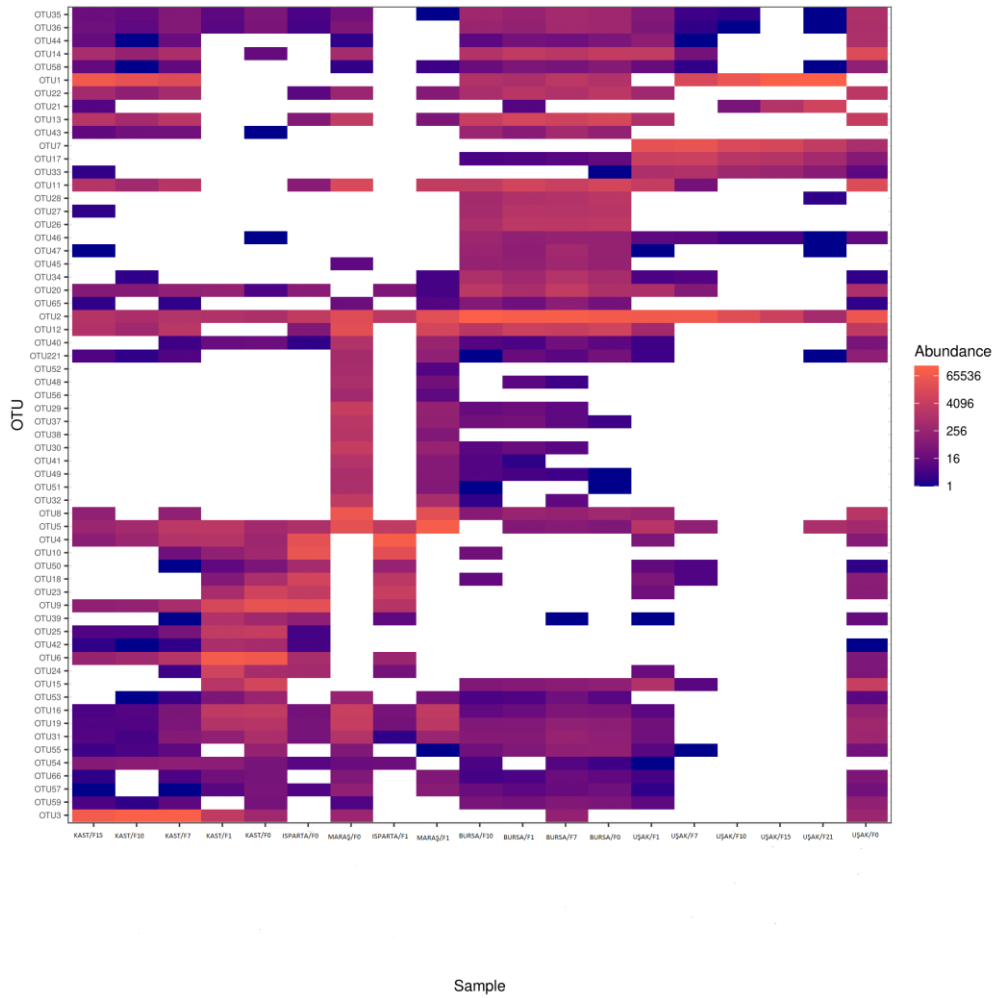


Şekil 4.20. MultiQC yazılımı ile 18S rRNA dizilemesi için kalite kontrol analizleri sonuçları, yeşil renk: tamamen normal, turuncu: hafif anormal, kırmızı: oldukça beklenmedik.

Düşük kaliteli okumaların, adaptörlerin, barkodların ve primerlerin uzaklaştırılması ve kimerik yapıların belirlenmesi sonucunda ortalama 71,853 okuma/örnek 16S rRNA taksonomik analizlerde kullanılmış %97 benzerlik oranına dayanarak 188 adet OTU tespit edilmiştir. 18S rRNA dizileme çalışmaları sırasında ise ortalama 147,073 okuma/örnek kullanılarak %97 benzerlik oranına dayanarak 62 OTU tespit edilmiştir. Okumalardan oluşturulan OTU'lara ait ısı haritası analizleri bakteriyel mikrobiyota için Şekil 4.21 ve fungal mikrobiyota için Şekil 4.22.'de gösterilmiştir. Ekşi hamur mikrobiyotasının metagenomik analizine yönelik daha önceki çalışmalarda, De Angelis [189], ortalama 465 bp uzunluğunda 68,216 okuma/örnek sonucuna ulaşırken; Lhomme [190], ortalama 571 bp uzunluğunda 42,748 okuma/örnekten toplam 20 OTU elde etmiştir.



Şekil 4.21. Bakteriyeel mikrobiyota için OTU ısı haritası tablosu.



Şekil 4.22. Fungal mikrobiyota için OTU ısı haritası tablosu.

Yapılan analizler sonucunda tespit edilen OTU'ların alfa çeşitlilik değerlendirmesi için Gözlenen değerler (Observed species), Shannon [191] ve Simpson [192] indeksleri hesaplanmıştır. Bu parametrelerden Shannon indeksi çevresel bir örnekteki belirsizliğin ölçülmesine dayanmaktadır. Buna göre ise belirsizliğin düşük olduğu durumlarda örnekteki çeşitliliğin de az olacağı ve ratgele seçilen bir türün de baskın türlerin bir üyesi olacağı değerlendirilmektedir [124]. Bunun yanında Simpson indeksi ise bir örnekten ratgele çekilen iki bireyin aynı türden olma olasılığını ölçmektedir. Buna göre ise Simpson indeksi düşük değerler aldıkça çeşitlilik artarken, yüksek değerler aldıkça çeşitlilik azalmaktadır [124]. Çalışılan örnekler arasında bakteriyel mikrobiyota açısından en yüksek Shannon indeksi Kastamonu F10 (3,00) ve en düşük Kastamonu F1 (0,909)'de tespit edilmiştir. Tarhana çeşitleri kendi fermantasyon süreçlerinde değerlendirildiğinde ise Isparta çeşidinde Shannon indeksi F0 (1,38)-F1 (1,48) örnekleri arasında

yükselmektedir. Ancak, Maraş tarhanasında tersi bir durum gözlenmiş ve F0 anında 1,73 olan indeksin 24 saatlik fermantasyon sonunda 1,60'a düştüğü belirlenmiştir. Bursa tarhanası örneklerinde ilk 24 saatlik süreçte çeşitlilik indeksinde bir değişme gözlenmezken fermantasyon boyunca artış tespit edilmiştir. Tüm çeşitler arasında fermantasyon sırasında hem en düşük hem de en yüksek indekslerin tespit edildiği Kastamonu örneklerinde F0 anında 1,04 olarak ölçülen Shannon indeksi 24 saat sonunda 0,909 olurken, F7 örneklerinde yükselme görülmüş ve F10 örneklerinde en yüksek değer saptanmıştır. Uşak çeşidinde ise fermantasyonun ilk 24 saatinde artış gözlenirken F7 örneklerinde Shannon indeksinin 1,58'e gerileyip F0'dan daha düşük olduğu saptanmıştır. Fermantasyonun 10. gününde tekrar yükselmeye başlayan indeks değeri 15. ve 21. günlerde 2,41 olarak tespit edilmiştir. Soyuçok [29], tarhana fermantasyonunu incelediği bir çalışmada en yüksek Shannon çeşitlilik indeksi değerini fermantasyonun 4. gününde 1,235 olarak tespit ederken De Angelis [189] de ekşi hamur için çeşitlilik indeksini 0,42 olarak belirlemiştir.

Çizelge 4.20. Tarhana örneklerinde bulunan bakteriyel popülasyonların varlık ve çeşitlilik indeksleri.

Örnek	Okumalar	Gözlenen (Observed)	Simpson	Shannon
Isparta F0	25707,0	24,0	0,346	1,38
Isparta F1	53448,0	19,0	0,272	1,48
Maraş F0	79172,0	85,0	0,240	1,73
Maraş F1	56562,0	70,0	0,277	1,60
Bursa F0	167761,0	163,0	0,296	1,73
Bursa F1	174388,0	154,0	0,298	1,73
Bursa F7	128855,0	153,0	0,193	2,06
Bursa F10	92787,0	150,0	0,162	2,14
Kastamonu F0	81158,0	21,0	0,537	1,04

Kastamonu F1	99014,0	30,0	0,614	0,909
Kastamonu F7	54873,0	153,0	0,122	2,80
Kastamonu F10	42116,0	146,0	0,0926	3,00
Kastamonu F15	64893,0	150,0	0,156	2,61
Uşak F0	86494,0	118,0	0,221	1,82
Uşak F1	24918,0	72,0	0,152	2,25
Uşak F7	36499,0	36,0	0,384	1,58
Uşak F10	22036,0	32,0	0,271	1,81
Uşak F15	26761,0	33,0	0,117	2,41
Uşak F21	14356,0	26,0	0,125	2,41

Fungal mikrobiyota dizileme sonuçlarında ise en yüksek Shannon indeksi Kastamonu F10 örneğinde (2,22) belirlenirken en düşük değer Uşak F15 (0,319) örneğinde tespit edilmiştir. Isparta tarhanası örneklerinde fermantasyon başlangıcında 1,48 olan çeşitlilik indeksi 1,17 değerine düşerken; Maraş çeşidinde 24 saatlik fermantasyon sürecinde Shannon indeksi 0,657'den 1,16 değerine yükselmiştir. Bursa tarhanası örneklerinde indeks ölçümü ilk 24 saatte azalma gösterirken 7. günde artmış, ardından fermantasyon sonunda başlangıç anından daha düşük bir indeks ölçülmüştür. Kastamonu örneklerinde fermantasyonun ilk 24 saatinde indekste artış olduğu tespit edilmiş, bu artış 10. gününde 2,22 değerine ulaşmış ve en yüksek Shannon değeri hesaplanmıştır. Uşak tarhanasında ise F0 anında 1,76 olarak belirlenen Shannon indeksi fermantasyon süreci boyunca azalma göstermiş ve fermantasyon sonunda 1,10 olarak ölçülmüştür.

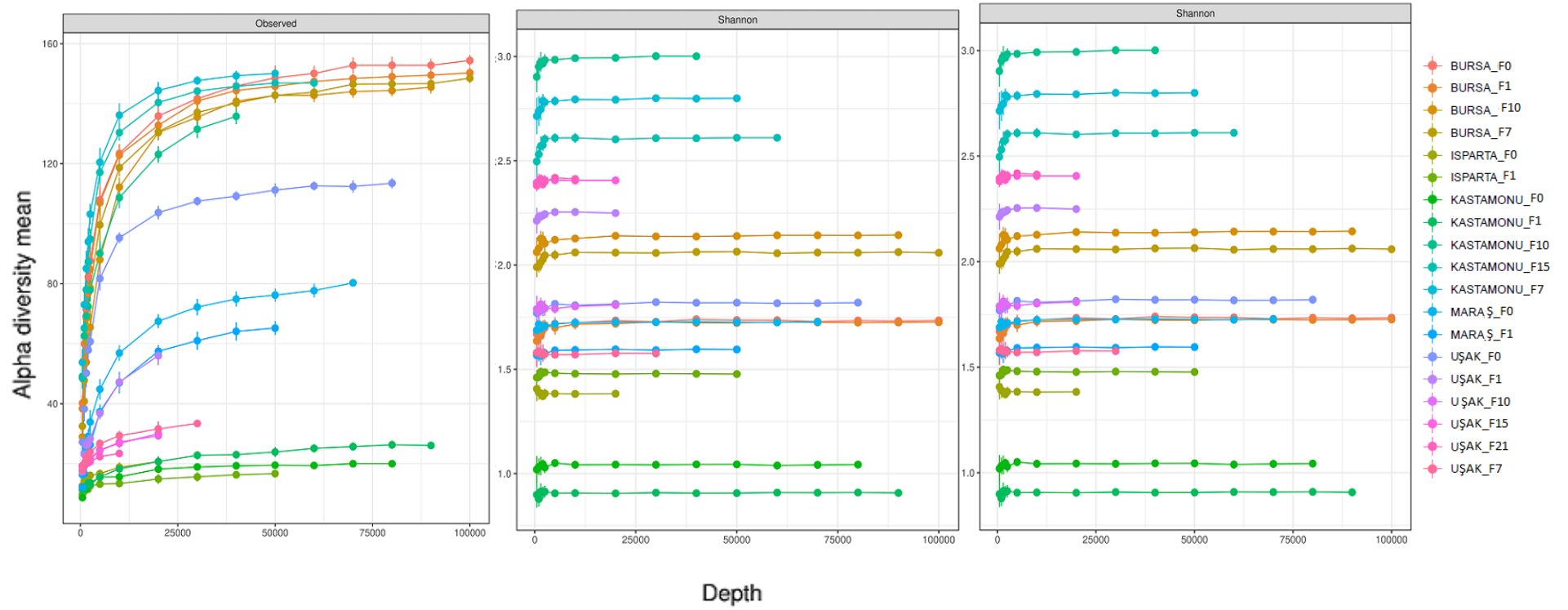
Gözlenen türler parametresinin analiz sonuçlarına göre bakteriyel komünitelerin özgün OTU varlığı 19 (Isparta F1)-163 (Bursa F0) aralığındadır. Fungal türler için ise bu OTU varlıkları 7 (Uşak F0)-44 (Maraş F0 ve F1) aralığında tespit edilmiştir. Her derinlikte ekstrakte edilen dizi sayısı ve bunlara karşılık gelen OTU sayıları kullanılarak çizilen seyrekleştirme eğrileri (Rarefaction curves), çalışılan örnekte ulaşılan dizileme

derinliğinin örnekte yer alan mikrobiyal çeşitliliği yansıtmakta yeterli olup olmadığını göstermektedir [193]. Seyrekleştirme eğrilerinin (Şekil 4.23 ve 4.24) platoya ulaşması ve doygunluğa yakın bir noktada olması örnekleme derinliğinin tüm bakteriyel ve fungal komünitelerin yeterli düzeyde yansıttığını göstermektedir. Ancak yine de daha fazla dizileme yapılmasıyla az miktarda başka türler de tespit edilme ihtimali bulunmaktadır.

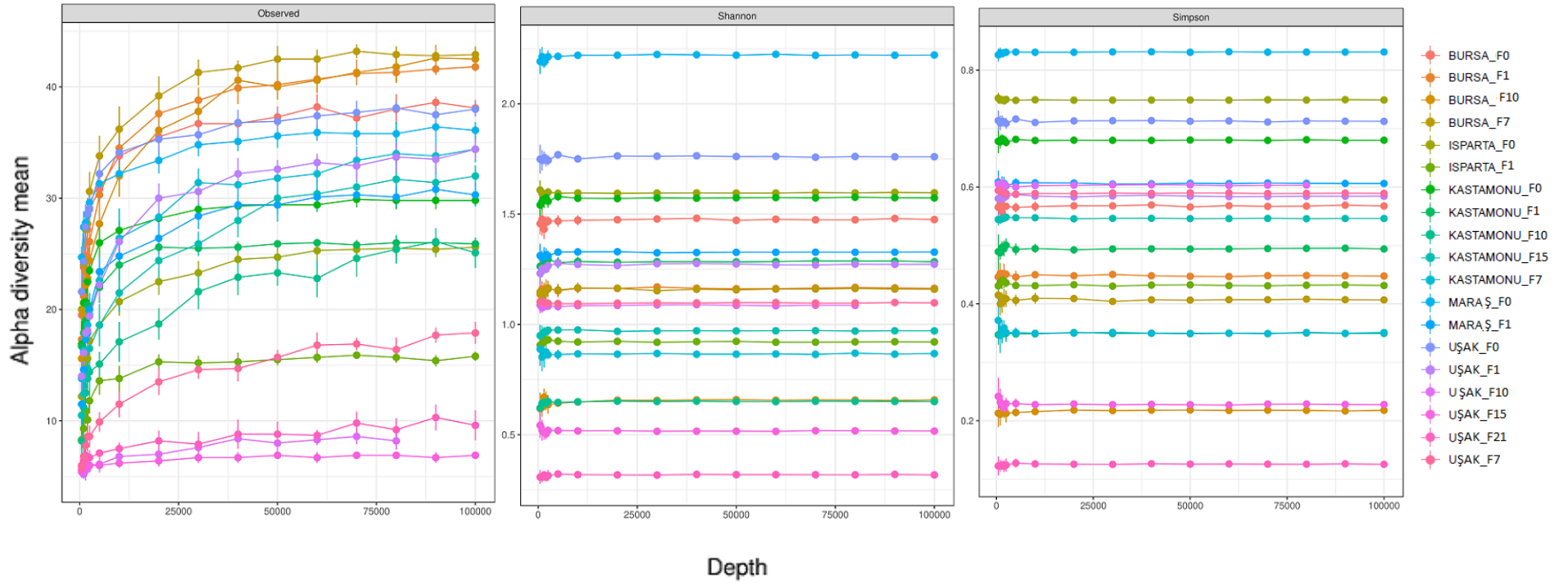
Çizelge 4.21. Tarhana örneklerinde bulunan fungal popülasyonların varlık ve çeşitlilik indeksleri.

Örnek	Okumalar	Gözlenen (Observed)	Simpson	Shannon
Isparta F0	125504,0	40,0	0,432	1,48
Isparta F1	138696,0	42,0	0,552	1,17
Maraş F0	169357,0	44,0	0,782	0,657
Maraş F1	145838,0	44,0	0,593	1,16
Bursa F0	119141,0	26,0	0,251	1,60
Bursa F1	143364,0	16,0	0,568	0,921
Bursa F7	130954,0	31,0	0,320	1,57
Bursa F10	126800,0	26,0	0,506	1,29
Kastamonu F0	179034,0	29,0	0,651	0,651
Kastamonu F1	158930,0	35,0	0,454	0,971
Kastamonu F7	160197,0	37,0	0,649	0,868
Kastamonu F10	181835,0	37,0	0,169	2,22
Kastamonu F15	173991,0	32,0	0,394	1,33
Uşak F0	109752,0	39,0	0,287	1,76
Uşak F1	124139,0	36,0	0,416	1,27

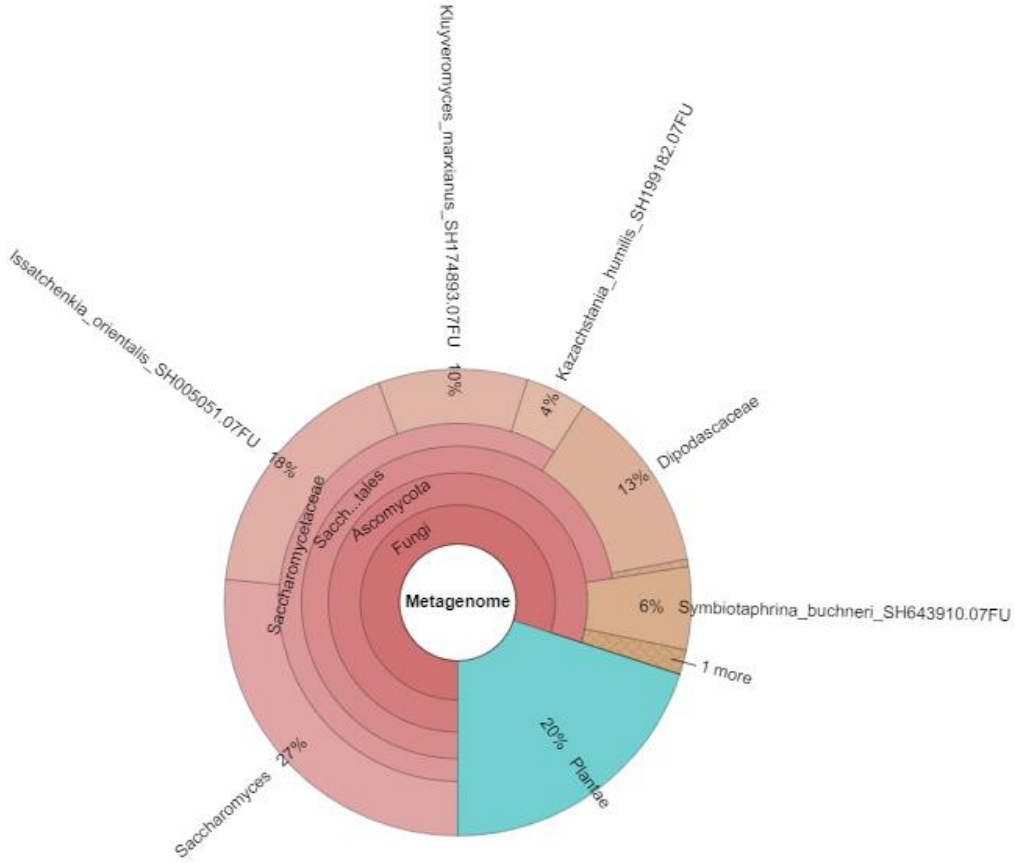
Uşak F7	81129,0	9,00	0,397	1,09
Uşak F10	150439,0	7,00	0,772	0,517
Uşak F15	187684,0	14,0	0,874	0,319
Uşak F21	132731,0	19,0	0,411	1,10



Şekil 4.23. Tarhana örneklerine ait seyrekleşme eğrileri (bakteriyel komünite için Observed, Shannon ve Simpson)



Şekil 4.24. Tarhana örneklerine ait seyrekleşme eğrileri (fungal komünite için Observed, Shannon ve Simpson).



Şekil 4.26. Fungal mikrobiyotaya ait cins ve tür seviyesinde Krona grafiği.

4.4.2. Mikroorganizmalar: Cins ve tür seviyesinde

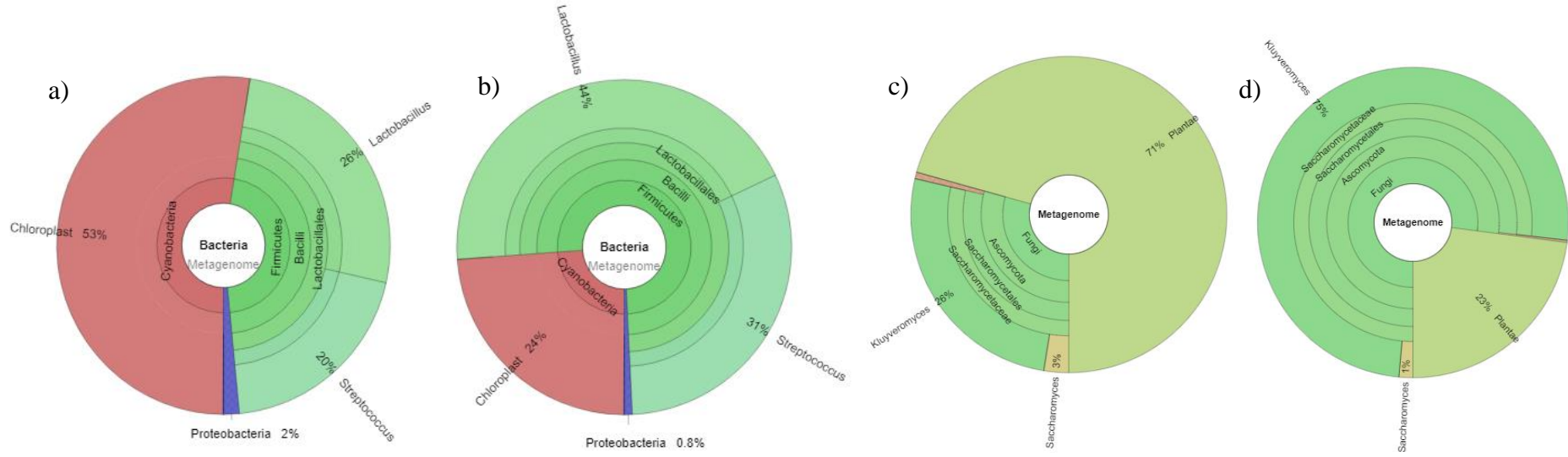
Tarhana hamuru örneklerinin amplicon dizileme analizleri sonrası OTU bölgelerinin oluşturulması ve bu OTU bölgelerinin referans dizilerle karşılaştırılması sonucunda her tarhana çeşidinin fermantasyonun gelişme süreci boyunca bakteriyel ve fungal mikrobiyotası ortaya koyulmuştur.

4.4.2.1. Isparta Tarhanası

Geleneksel yöntemle 24 saatlik fermantasyon prosesi ile üretilen Isparta tarhanasında *Lactobacillus* cinsi bakterilerin bağıl varlığı fermantasyon başlangıcında %26'dan 24 saatin sonunda % 44,1'e yükselirken, *Streptococcus* varlığı %19,9'dan %31,3'e ulaşmıştır (Şekil 4.27). Bağıl varlığı %1'in altında olan *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* ve *Raoutella* cinsleri F0 zamanında hamurda tespit edilirken; *Enterobacter* ve *Raoutella* fermantasyon sonunda ortamda bulunamamıştır. Isparta tarhanası çeşidinde

tür düzeyinde yalnızca *Pantoea agglomerans* ve *Raoultella ornithinolytica* bağıl varlığı %1'in altında olmak üzere F0'da tespit edilebilmiştir.

Fungal mikrobiyota açısından ise *Kluyveromyces* bağıl varlığı F0'da %26,1'den F1'de %75,4'e ulaşırken; *Saccharomyces* varlığı F0'da %2,54'den F1'de %1,45'e gerilemiştir (Şekil 4.27). Bağıl varlığı %1'in altında olmak üzere; *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Clavispora*, *Filobasidium*, *Mycosphaerella*, *Neodeighthoniella* ve *Symbiotaphrina* cinsleri F0 örneğinde tespit edilmiştir. Bu cinsler arasından *Aureobasidium*, *Filobasidium* ve *Neodeighthoniella* 24 saatlik fermantasyon prosesinin sonunda ortamda bulunamamıştır. Ayrıca yalnızca *Kluyveromyces marxianus* türünün F0 (%26,1) ve F1 (%75,4) ölçümlerinde %1'den fazla bağıl varlığa sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, *Alternaria alternata*, *Alternaria hordeicola*, *Alternaria metachromatica*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium flabelliforme*, *Clavispora lusitaniae*, *Filobasidium magnum*, *Mycosphaerella tassiana* (güncel ismi *Cladosporium herbarum*), *Neodeighthoniella phragmiticola* ve *Symbiotaphrina buchneri* fermantasyon başlangıç anında hamur mikrobiyotasında tespit edilmiştir. Bu türlerden *Alternaria hordeicola*, *Alternaria metachromatica*, *Aureobasidium pullulans*, *Filobasidium magnum* ve *Neodeighthoniella phragmiticola* fermantasyon sonunda ortamda bulunamamıştır.

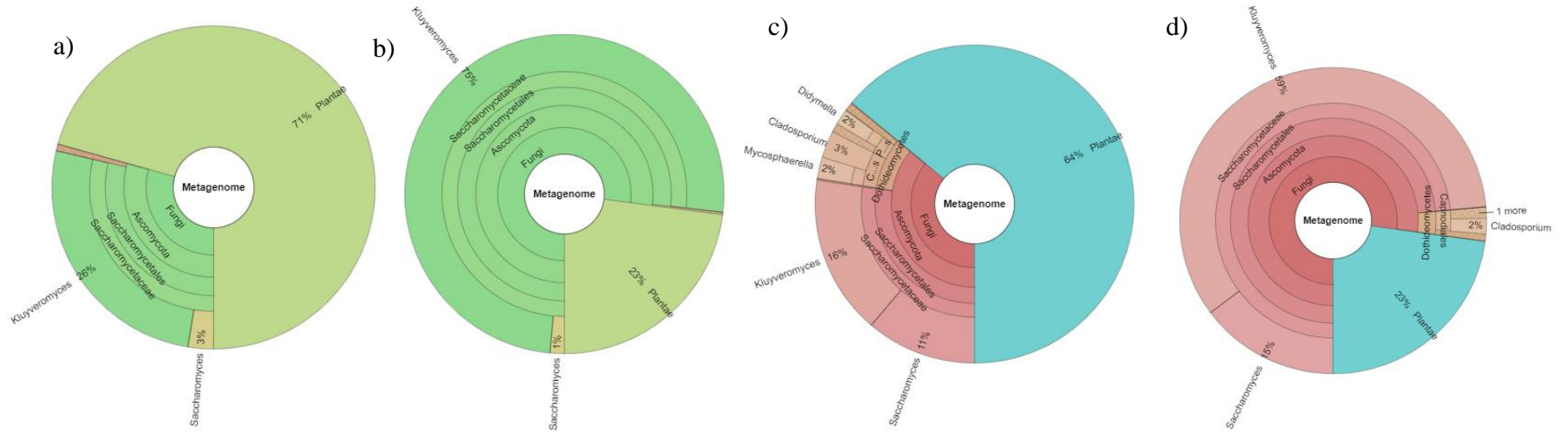


Şekil 4.27. Isparta tarhanası bakteriyel ve fungal mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0 (bakteriyel), b) F1 (bakteriyel), c) F0 (fungal)ve d) F1 (fungal).

4.4.2.2. Maraş Tarhanası

Geleneksel üretim yöntemine göre 24 saatlik fermantasyon işlemi ile hazırlanan Maraş tarhanasında F0'da *Streptococcus* (%11,9) ve *Lactobacillus* (%69,6) cinsi bakteriler bulunurken; 24 saatin sonunda bunların bağıl varlığı ilki için %14,7 ve ikincisi için %73,7 olmuştur (Şekil 4.28). Bu tarhana çeşidinde bulunan ve bağıl varlığı %1'in altında olan diğer cinsler ise *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lactococcus*, *Pantoea*, *Providencia*, *Pseudomonas* ve *Sphingomonas*'tır. Bunların arasından *Lactococcus*, *Providencia* ve *Pseudomonas* cinsleri F1 örneklerinde tespit edilememiştir. Tür düzeyinde ise *Lactobacillus helveticus* bağıl varlığı %22,6'dan (F0) %22,3'e (F1) düşmüştür. Ayrıca, ortamda *Levilactobacillus zymae* türü hem fermantasyon başlangıcında hem de fermantasyon sonunda %1'den düşük oranda tespit edilmiştir.

Fungal mikrobiyota açısından ise baskın cins olarak tespit edilen *Kluyveromyces*'lerin ortamdaki varlığının %16,2'den (F0) %58,8'e (F1) yükseldiği belirlenmiştir. *Saccharomyces* bağıl varlığı da %2,54'den (F0) %1,45'e (F1); *Cladosporium* %2,75'den (F0) %1,64'e (F1); *Didymella* %1,63'den (F0) %0,376'ya (F1) ve *Mycosphaerella* %2,20'den (F0) %1,21'e (F1) düşmüştür. Bağıl varlığı %1'in altında olmak üzere *Alternaria*, *Ascochyta*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Clavispora*, *Filobasidium*, *Pichia* ve *Stemphylium* tespit edilmiştir. Tür düzeyinde ise *Kluyveromyces marxianus* (%16,2, F0 ve %58,5, F1), ve *Cladosporium flabelliforme* (%2,75, F0 ve %1,64, F1), *Didymella chenopodii* (%1,63,F0), *Mycosphaerella tassiana* (%2,20, F0 ve %1,21, F1) gibi bitki patojenleri ve dış ortam küfleri hamur mikrobiyotasında saptanmıştır. Bağıl varlığı %1'in altında olan fungal türler ise *Alternaria alternata*, *Alternaria hordeicola*, *Alternaria hungarica* (F0), *Alternaria infectoria* (F0), *Alternaria metachromatica*, *Ascochyta herbicola*, *Aureobasidium microstictum*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Filobasidium magnum*, *Pichia kluyveri* (F1) ve *Stemphylium herbarum* olmuştur.



Şekil 4.28. Maraş tarhanası bakteriyel ve fungal mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0 (bakteriyel), b) F1 (bakteriyel), c) F0 (fungal) ve d) F1 (fungal).

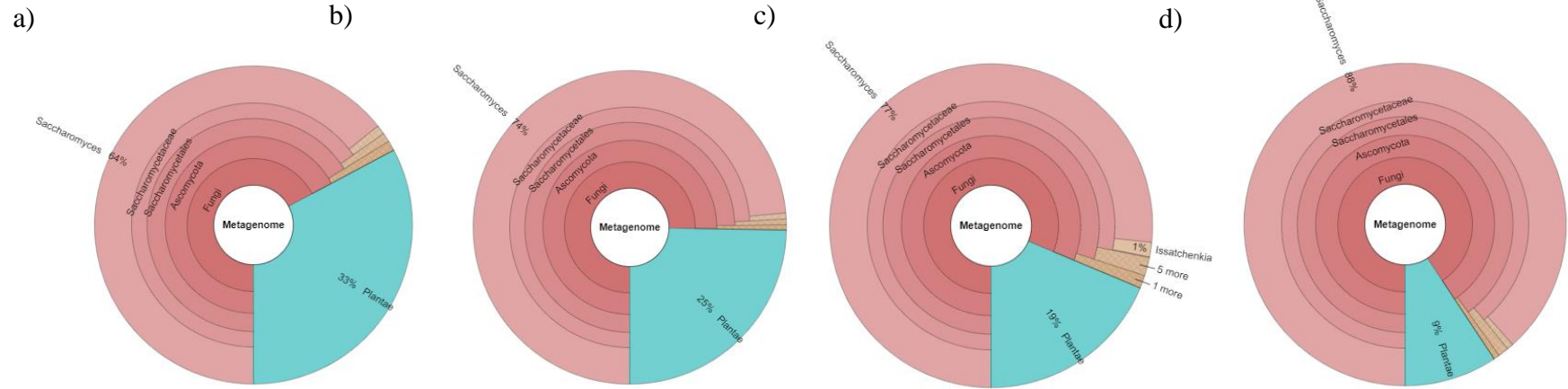
4.4.2.3. Bursa Tarhanası

Bursa tarhanası 10 günlük bir fermantasyon süreciyle hazırlanmakta ve bu sürecin üçüncü gününde hamur yapısına yeni malzemeler eklenmektedir. Fermantasyonun başlangıç anında alınan örneklerde hiçbir bakteriyel cins %1 bağıl varlığın üzerinde tespit edilememiştir. F1 örneklerinde dominant cins olan *Pediococcus* bağıl varlığı %1,12'den F7'de %11,2 ve F10'da %21,2'ye yükselmiştir. Ayrıca *Lactobacillus* cinsinin bağıl varlığı da artarak F7'de %9,69'dan F10'da %19,0'a yükselmiştir (Şekil 4.29). Bursa çeşidinde bağıl varlığı %1'den az olarak tespit edilen cinsler ise *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Escherichia-Shigella*, *Hafnia* (F0), *Klebsiella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pantoea*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* ve *Weissella*'dır. Bursa tarhanası çeşidi, çalışılan diğer geleneksel çeşitlere kıyasla daha yüksek pH değerine sahiptir ve ekşi hamur üzerine yapılan başka bir çalışmada [194], bu durumun hamur mikrobiyotasında *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Weissella* cinslerinin gelişimini teşvik ettiği belirlenmiştir.

Bursa tarhanasında F0 anında hiçbir bakteriyel türün %1'den fazla bağıl varlık göstermediği saptanmıştır. F1 örneklerinde ise sadece *P. pentosaceus* %1,04 oranında tespit edilmiştir. Ayrıca, *P. pentosaceus* bağıl varlığı F7'de %10,5'den F10'da %20,1'e yükselmiştir. Bunların yanında, ikinci en yoğun bakteri türü olan *Lactiplantibacillus plantarum*'un bağıl varlığı F7'de 7,98'den F10'da %16,8'e yükselmiştir. *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lentilactobacillus kisonensis*, *Limosilactobacillus panis*, *Companilactobacillus paralimentarius*, *Limosilactobacillus pontis*, *Lactobacillus* sp. , *Paucilactobacillus vaccinostrercus*, *Leuconostoc citreum* ve *Pediococcus acidilactici* türleri de fermantasyon süresi boyunca ortamda tespit edilmiştir. Bağıl varlığı %1'in altında bulunan diğer türler ise *Buttiauxella ferragutiae*, *Enterococcus italicus*, *Erwinia persicina*, *Hafnia alvei* (F0), *Pantoea agglomerans*, *Raoultella ornithinolytica* (F0 ve F10), *Raoultella planticola* (F0 ve F1) ve *Weissella ghanensis*'dir. Bursa tarhanası çeşidinde diğer çeşitlere kıyasla daha geniş bir LAB çeşitliliği bulunması, formülasyonda ekmeç mayası kullanılması ile açıklanabilir. Çünkü LAB tarafından oluşturulan asidik ortamın maya gelişimini arttırdığı

ve buna karşın da ortamdaki maya varlığının vitaminler ve azotlu bileşikler gibi bileşenleri üreterek bakterilerin büyümesini stimüle ettiği belirtilmiştir [195,196].

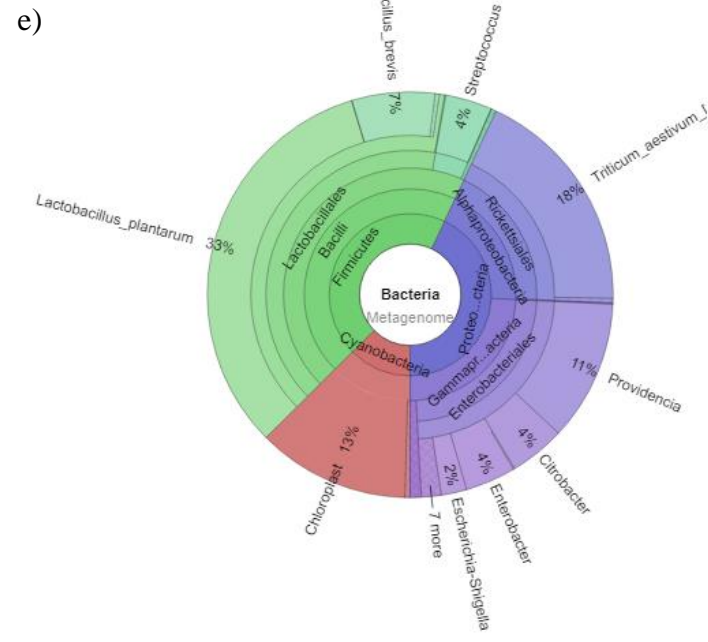
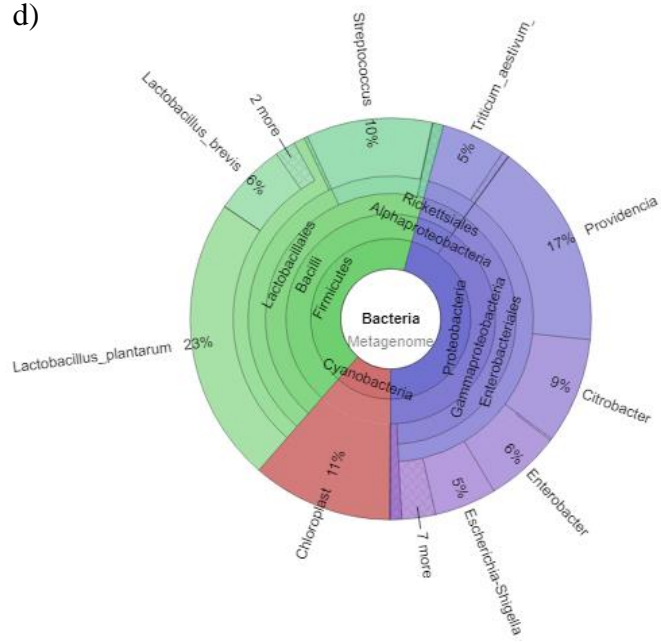
Bursa tarhanasına ait fungal mikrobiyotada ise formülasyona doğrudan ilave edilen ekmekek mayasının etkisi ile baskın cins *Saccharomyces* olmuş ve bağıl varlığı F0'da %64,3 iken F1'de %73,5, F7'de %76,6 ve F10'da %88,4 olarak belirlenmiştir. Fermantasyonun yedinci gününde *Issatchenkia* (1,46%), *Pichia* (1,18%) ve *Alternaria* (1,08%) cinslerinin %1'den fazla bağıl varlığa sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.30). Minervini [197] ekşi hamur çeşitlerinde maya hücresi yoğunluğu ile ekmekek mayası kullanım yüzdesinin paralel olduğunu belirlemiştir. Ortamda %1'den az bağıl varlığa sahip olarak tespit edilen fungal cinsler ise *Alternaria* (F0, F1, F10), *Ascochyta*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Clavispora* (F0, F7, F10), *Didymella* (F7, F10), *Filobasidium*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia* (F0, F1, F10), *Kazachstania*, *Kluyveromyces* (F0, F1, F7), *Mycosphaerella*, *Pichia* (F0, F1, F10) ve *Stemphylium*'dur. Tür düzeyinde ise, *Pichia kluyveri* ve *Issatchenkia orientalis*'in yedinci gün örneklerinde %1'den fazla bağıl yoğunluğa sahip olduğu saptanmıştır. Bağıl varlığı %1'in altında bulunan fungal türler ise *Alternaria alternata*, *Alternaria hordeicola*, *Alternaria hungarica*, *Alternaria infectoria*, *Alternaria metachromatica*, *Ascochyta herbicola*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida tropicalis*, *Cladosporium flabelliforme*, *Clavispora lusitaniae*, *Didymella chenopodii* (F7, F10), *Filobasidium magnum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Issatchenkia orientalis* (F0, F1, F10), *Kazachstania humilis*, *Kluyveromyces marxianus* (F0, F1, F7), *Mycosphaerella tassiana*, *Pichia kluyveri* (F0, F1, F7), *Pichia mandshurica* (F1) ve *Stemphylium herbarum*'dur.



Şekil 4.30. Bursa tarhanası fungal mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7 ve d) F10.

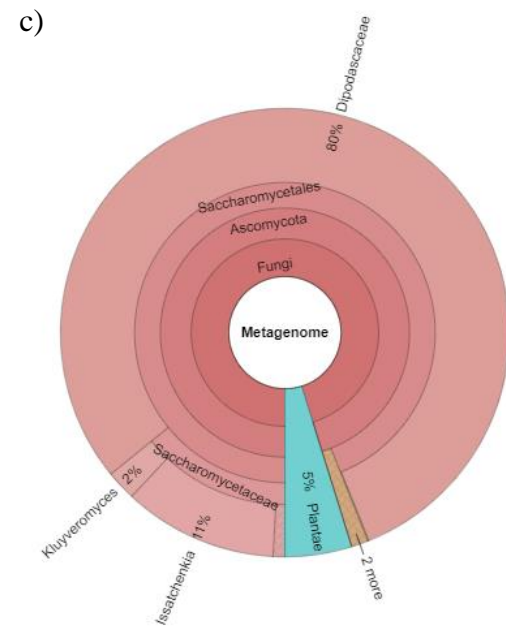
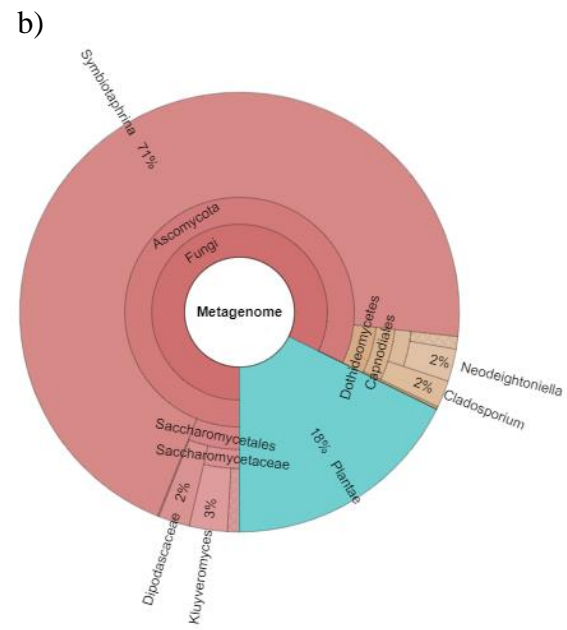
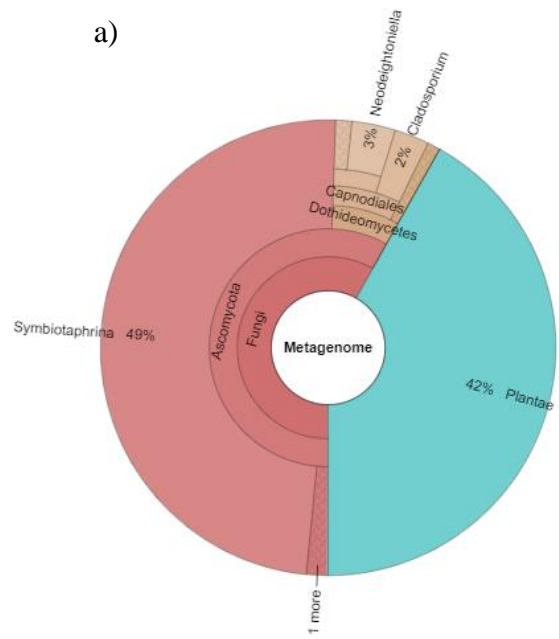
4.4.2.4. Kastamonu Tarhanası

Kastamonu tarhanası çeşidi 15 günlük bir fermantasyon periyoduna sahiptir. Bu süreçte F0 ve F1 anlarında baskın cins olan *Streptococcus*'ların bağıl varlığı F0'da %12,6'dan, F1'de %10,3 ve F7'de %8,55'e düşmüştür. Böylece F7 anından itibaren *Lactobacillus* cinsi baskın hale gelmiş ve bağıl varlığı F7'de %13,3'e, F10'da %31,5'e ve F15'de %40,1'e yükselmiştir. Aynı süreçte *Streptococcus* cinsi F10'da %10,2 ve F15'de %3,71 oranında tespit edilmiştir. Fermantasyonun yedinci gününde yoğurt harcından tarhana hamuru hazırlanması basamağından sonra *Citrobacter* (%6,30), *Providencia* (%3,92), *Enterobacter* (%4,06), *Raoultella* (%1,22) ve *Escherichia/Shigella* (%4,15) cinslerinin bağıl varlıkları %1'in üzerine çıkmıştır. Prosesin devamında *Citrobacter* varlığı %8,53 (F10) ve %4,43 (F15) olurken, *Enterobacter* %6,2 (F10) ve %4,13 (F15); *Escherichia-Shigella* %5,01 (F10) ve %2,02 (F15), *Providencia* %16,6 (F10) ve %11,2 (F15), ve *Raoultella* %1,58 (F10) oranlarında tespit edilmiştir. Tür düzeyinde ise yedinci güne kadar %1'in üzerinde bağıl varlığa sahip bir tanımlama yapılamazken; yedinci günde *Levilactobacillus brevis* %3,01 ve *Lactiplantibacillus plantarum* %7,48 düzeyinde belirlenmiştir. Bu bakterilerden *Levilactobacillus brevis*'in varlığı %5,88 (F10) ve %6,61'e (F15) yükselirken; *Lactiplantibacillus plantarum*'un bağıl varlığı %23,0 (F10) ve %32,7'ye (F15) ulaşmış ve fermantasyon sonunda en baskın bakteri türü olmuştur. Ayrıca *Lactobacillus sp.* varlığı onuncu günde %1,0 oranında tespit edilmiştir. Hamur örnekleri mikrobiyotasında bağıl varlığı %1'in altında tespit edilen diğer bakteri türleri ise *Buttiauxella ferragutiae* (F7, F10, F15), *Erwinia persicina* (F7, F10, F15), *Hafnia alvei* (F7, F10, F15), *Levilactobacillus namurensis* (F15), *Lactobacillus sp.* (F7, F15), *Paucilactobacillus vaccinoferus* (F7, F10, F15), *Levilactobacillus zymae* (F15), *Leuconostoc citreum* (F1, F7, F10, F15), *Pantoea agglomerans* (F1, F7, F10, F15), *P. pentosaceus* (F7, F10, F15), *Raoultella ornithinolytica* (F7, F10, F15) ve *Raoultella planticola* (F7, F10, F15)'dir. De Vuyst [180] ekşi hamur fermantasyonu sırasında LAB'nin Gram negatif enterobakterileri hızlıca baskıladığını, LAB arasında ise homofermentatif laktobasillerin daha dominant olduğunu belirlemiştir.

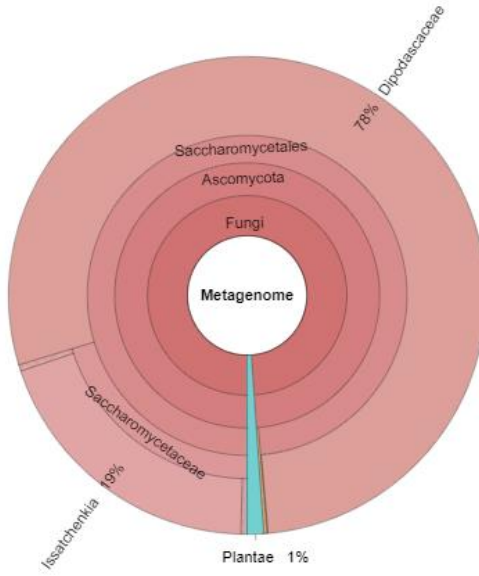


Şekil 4.31. Kastamonu tarhanası bakteriyel mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7, d) F10 ve e) F15.

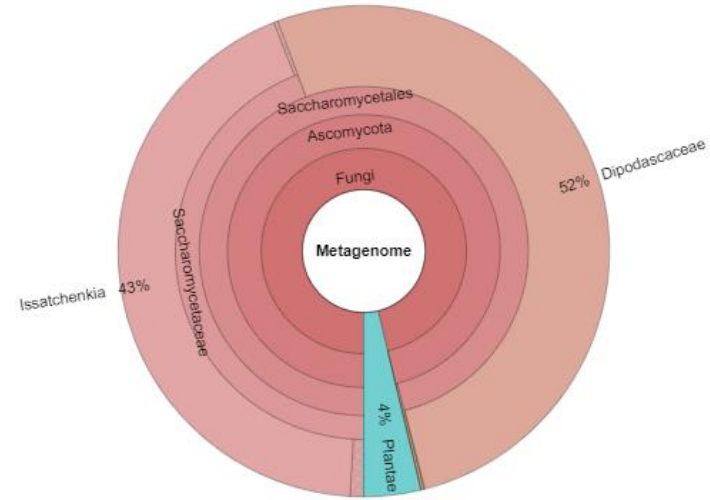
Kastamonu tarhanası fermentasyonu sırasında mikrobiyotada tespit edilen fungal üyeler arasında *Cladosporium* (2,46%), *Mycosphaerella* (1,15%), *Neodeighthoniella* (3,09%) ve *Symbiotaphrina* (49,0%) fermantasyon başlangıcında bağıl yoğunluğu %1'den fazla olan cinslerdir. Fermantasyonun ilk 24 saatinin sonunda ise *Cladosporium* varlığı %2,0, *Kluyveromyces* %2,80, *Neodeighthoniella* %2,39 ve *Symbiotaphrina* %70,70 olmuştur. Fermantasyonun yedinci gününde ortamda bağıl varlığı %1'in üzerinde olan cinsler *Issatchenkia* (%11,1) ve *Kluyveromyces* (%2,16) olarak bulunmuştur. *Issatchenkia* cinsi mayaların bağıl varlığı F10'da %1,94'e gerilemiş ve daha sonra F15'de %43,10'a yükselmiştir. Mikrobiyotada belirlenen diğer üyeler ise *Alternaria*, *Ascochyta*, *Aureobasidium* (F0, F1, F7), *Candida* (F7, F15), *Cladosporium*, *Clavispora*, *Filobasidium* (F0, F1, F7, F15), *Hanseniaspora* (F0), *Kazachstania* (F15), *Kluyveromyces*, *Mycosphaerella*, *Neodeighthoniella*, *Pichia* (F10, F15), *Saccharomyces*, *Stemphylium* (F0, F1, F7, F10) ve *Symbiotaphrina* olmuştur. Tür düzeyinde yapılan tanımlamalar sonucunda ise fermantasyon başlangıcında ortamdaki bağıl varlığı %1'in üzerinde belirlenen türler *Cladosporium flabelliforme* (%2,46), *Mycosphaerella tassiana* (%1,15), *Neodeighthoniella phragmiticola* (%3,09) ve *Symbiotaphrina buchneri* (%49,0)'dir. Bu türlerden *Cladosporium flabelliforme* varlığı 24 saat sonunda %2,0, *Kluyveromyces marxianus* %2,80, *Neodeighthoniella phragmiticola* %2,39 ve *Symbiotaphrina buchneri* %70,7 olarak tespit edilmiştir. Fermantasyonun yedinci gününde *Issatchenkia orientalis* baskın tür (%11,1) olurken; *Kluyveromyces marxianus* bağıl varlığı da %2,16'ya düşmüştür. *Issatchenkia orientalis* (güncel ismi *Pichia kudriavzevii*) bağıl varlığı F10'da %19,4 ve F15'de %43,1'e ulaşmıştır. Mikrobiyotada tespit edilen diğer türler ise *Alternaria alternata*, *Alternaria hordeicola*, *Alternaria infectoria* (F0, F7, F10, F15), *Alternaria metachromatica* (F0, F7, F10, F15), *Ascochyta herbicola* (F0, F7, F15), *Aureobasidium pullulans* (F0, F1, F7), *Candida tropicalis* (F7, F15), *C. flabelliforme*, *Clavispora lusitaniae*, *Filobasidium magnum* (F0, F1 F7, F15), *Hanseniaspora opuntiae* (F0), *Kazachstania humilis* (F15), *Kluyveromyces marxianus*, *Mycosphaerella tassiana*, *Neodeighthoniella phragmiticola*, *Pichia kluyveri* (F10, F15), *Pichia manshurica* (F15), *Stemphylium herbarum* (F0, F1, F7, F10) ve *Symbiotaphrina buchneri*'dir.



d)



e)

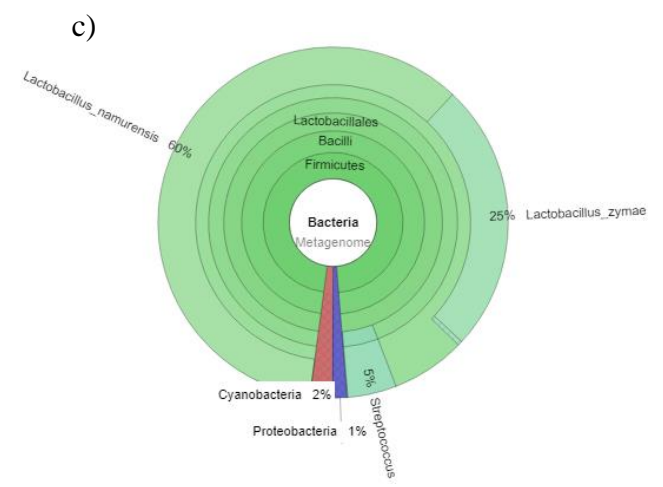
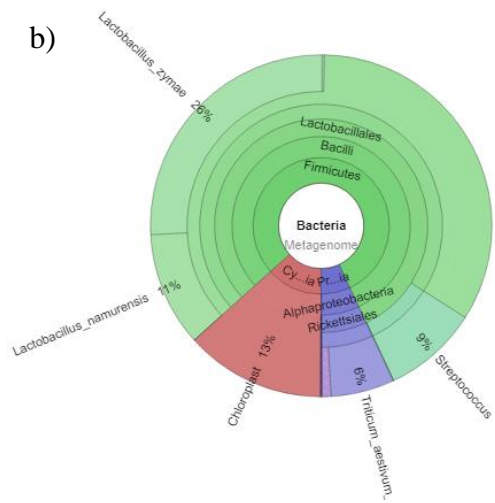
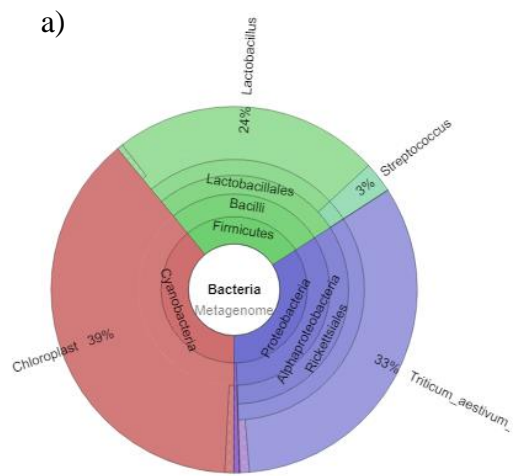


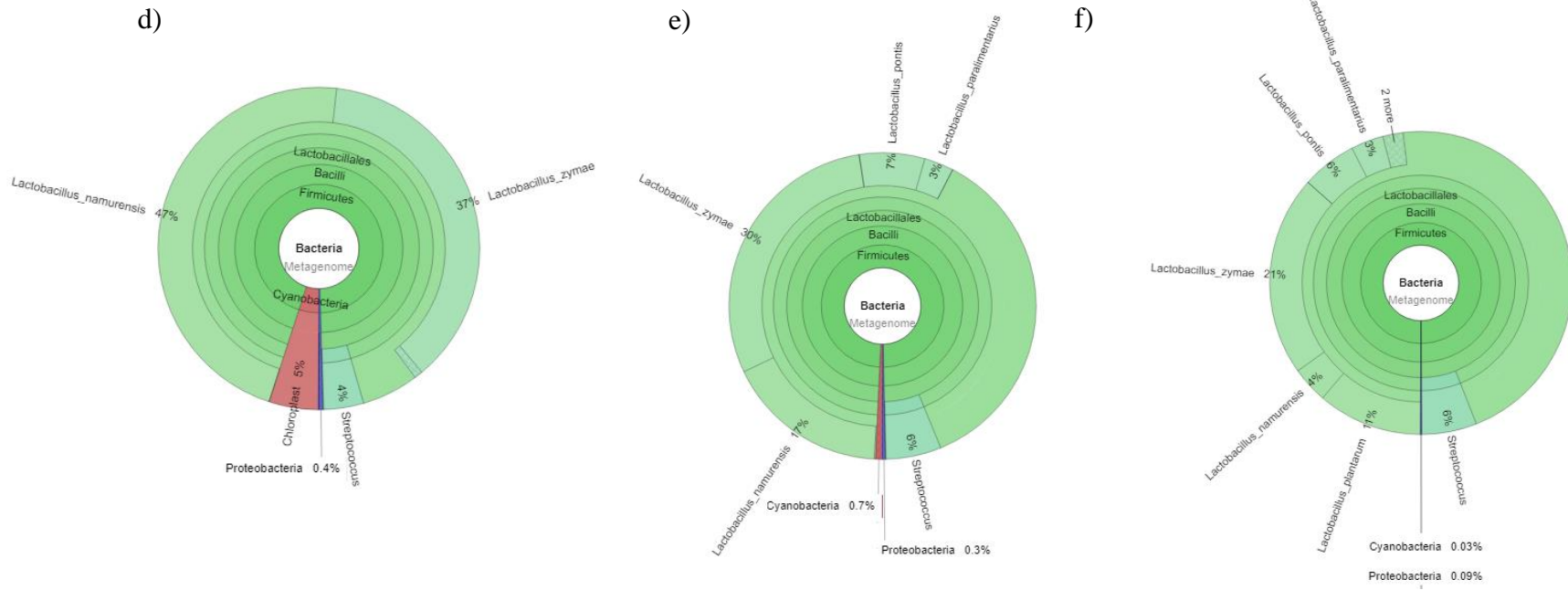
Şekil 4.32. Kastamonu tarhanası fungal mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7, d) F10 ve e) F15.

4.4.2.5. Uşak Tarhanası

Uşak tarhanasının 21 günlük fermantasyonu sırasında örnek alınan tüm günlerde *Lactobacillus* cinsi baskın olarak tespit edilmiştir. Fermantasyon başlangıcında %24,1 olarak bulunan *Lactobacillus* varlığı, F1’de %70,70, F7’de %92,0, F10’da %90,50, F15’de %93,1 ve F21’de %94,0 olmuştur. Uşak tarhanası çeşidinde *Lactobacillus* cinsinin bağıl varlığının fermantasyon süreci boyunca arttığı tespit edilirken, başka bir çalışmada ise bu cinsin hamurdaki yoğunluğunun fermantasyonun ilk dört gününde %75,24’den %85,54’e yükseldiği, daha sonraki süreçte azalan bir trend gösterdiği ifade edilmiştir [29]. *Lactobacillus* cinsi dışında *Streptococcus* varlığı da F0 anında %2,71, F1’de %9,0, F7’de %4,51, F10’da %4,03, F15’de %5,84 ve F21’de %5,88 olarak belirlenmiştir. Mikrobiyotada tespit edilen diğer bakteri cinsleri ise *Acetobacter* (F0, F7), *Acinetobacter* (F0), *Buttiauxella* (F0), *Citrobacter* (F0), *Cronobacter* (F0), *Enterobacter* (F0), *Enterococcus* (F0), *Erwinia* (F0, F1, F7, F10, F15), *Hafnia* (F0), *Klebsiella* (F0), *Leuconostoc* (F0, F1, F7, F10, F15), *Pantoea*, *Pseudomonas* (F0) ve *Weissella*’dır.

Fermantasyon başlangıcında hiçbir bakteri türü %1 bağıl yoğunluğun üzerinde tespit edilememiştir. İlk 24 saatlik fermantasyon süresi sonunda *Levilactobacillus namurensis* varlığı %10,8 olurken *Levilactobacillus zymae* %25,9 oranında bulunmuştur. *Levilactobacillus namurensis* varlığı F7’de %59,8’e yükselirken F10’da %46,8’e, F15’de %17,1’e ve fermantasyonun sonunda %3,87’e gerilemiştir. Buna karşın *Levilactobacillus zymae* varlığı F7’de %24,9’a gerilerken; F10’da %37,2’ye yükselmiş ve ardından F15’de %29,6 ve F21’de %21,4’e düşmüştür. Ayrıca *Limosilactobacillus pontis* türünün oranı da F15’de %6,89 ve F21’de %5,89 olurken, *Companilactobacillus paralimentarius* varlığı F15’de %3,10 ve F21’de %3,48’e yükselmiştir. Bunların dışında fermantasyon sonunda *Lentilactobacillus kisonensis* %1,10, *Limosilactobacillus panis* %1,08 ve *Lactiplantibacillus plantarum* %11,20 oranlarında tespit edilmiştir. Uşak tarhanası çeşidinde tespit edilen diğer bakteriyel türler ise *Buttiauxella ferragutiae* (F0, F10), *Erwinia persicina* (F0, F1, F7, F10, F15), *Hafnia alvei* (F0), *Levilactobacillus brevis* (F0), *Lentilactobacillus kisonensis* (F15, F21), *Levilactobacillus namurensis*, *Limosilactobacillus panis* (F15, F21), *Companilactobacillus paralimentarius*, *Lactiplantibacillus plantarum* (F15, F21), *Limosilactobacillus pontis*, *Lactobacillus* sp. (F7), *Levilactobacillus zymae*, *Leuconostoc citreum* (F0, F1, F7, F10, F15) ve *Pantoea agglomerans*’dır.

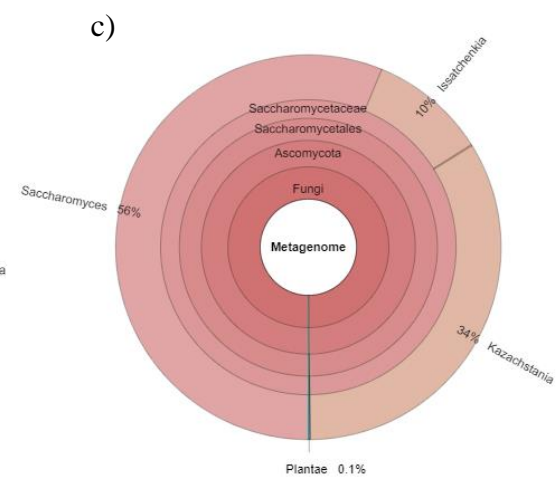
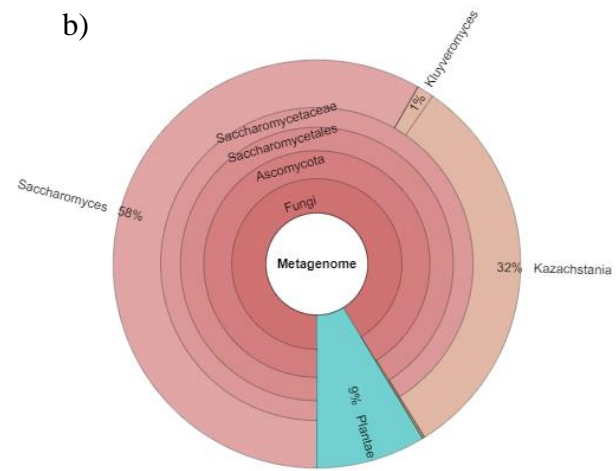
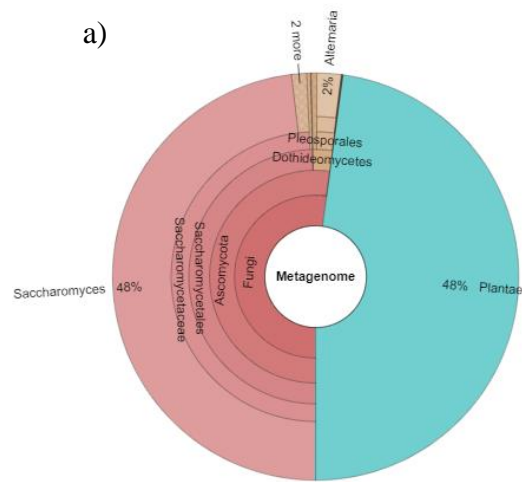


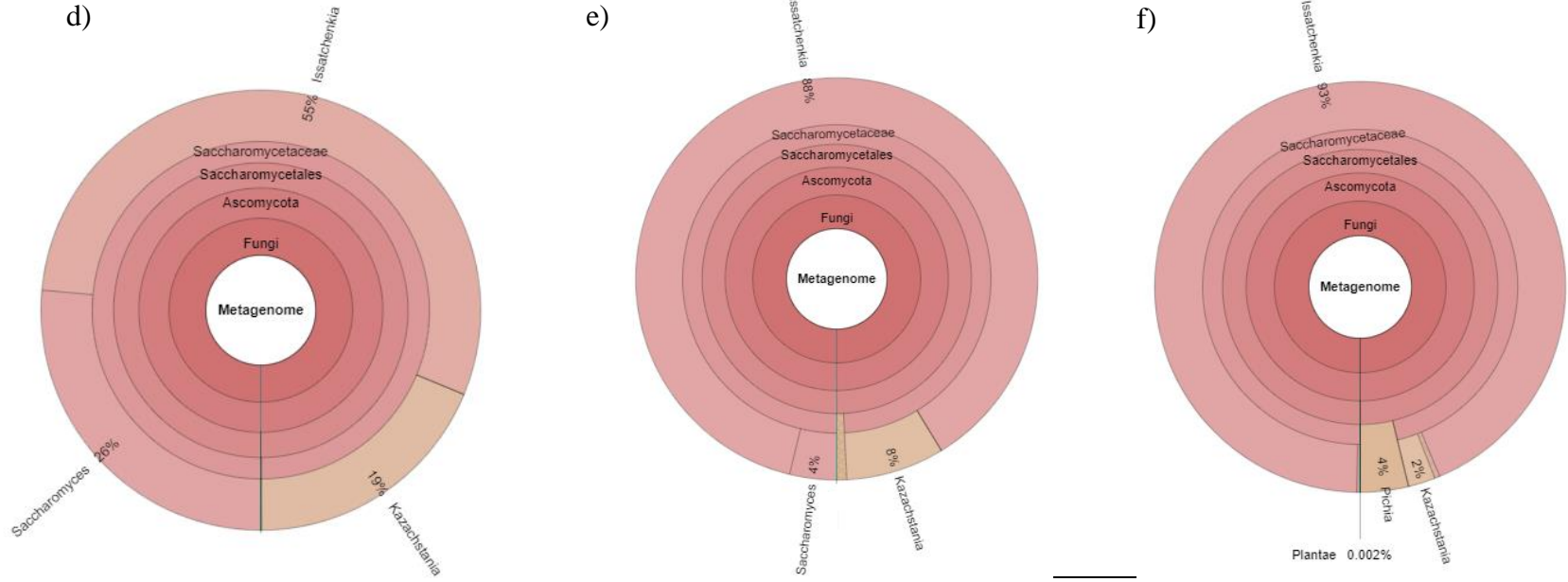


Şekil 4.33. Uşak tarhanası bakteriyel mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7, d) F10, e) F15 ve f) F21.

Uşak tarhanasında tespit edilen fungal cinslerden *Saccharomyces*'lerin bağıl varlığı fermantasyon başlangıcında %48,1'den 24 saatin sonunda %58,3'e yükselmiştir. Yedinci günden itibaren *Saccharomyces* varlığı azalmaya başlayarak F7'de %56,2, F10'da %26,50, F15'de %3,77 oranlarında ölçülmüş, fermantasyon sonunda %1'in altında bulunmuştur. *Kazachstania* cinsi maya türlerinin bağıl varlığı fermantasyon başlangıcında %1'in altındayken F1'de %31,50, F7'de %33,70, F10'da %18,70, F15'de %7,91 ve F21'de %2,12 olmuştur. Buna karşın *Issatchenkia* cinsi F0 ve F1'de ortamda tespit edilemezken F7'de %9,82 bağıl varlıkta bulunmuş; bu oran F10'da %54,80, F15'de %87,50 ve F21'de %93,40'a ulaşmıştır. Ayrıca *Alternaria* cinsi (%1,91) F0'da, *Kluyveromyces* (%1,32) F1'de ve *Pichia* cinsi (%3,78) F21'de %1'den fazla bağıl varlıkta bulunmuştur. Uşak tarhanası çeşidinde tespit edilen diğer fungal cinsler ise *Alternaria* (F0, F1, F7, F10, F21), *Ascochyta* (F0, F1), *Aureobasidium* (F0, F1), *Candida* (F0), *Cladosporium* (F0, F1), *Clavispora* (F1), *Filobasidium* (F0, F1), *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces* (F0, F1, F7), *Mycosphaerella* (F0, F1), *Pichia*, *Stemphylium* (F0) ve *Symbiotaphrina* (F0)'dır.

Bu tarhanada tespit edilebilen fungal türlerden *Kazachstania humilis* F1'da %31,50, F7'de %33,70, F10'da %18,70, F15'de %7,91 ve F21'de %2,12 bağıl varlığa sahiptir. *Issatchenkia orientalis* türünün de F7'de %9,82, F10'da %54,80, F15'de %87,50 ve F21'de %93,40 oranında hamurda yer aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca *Kluyveromyces marxianus* türü F1'de %1,34 ve *Pichia mandshurica* türü de F21'de %3,78 oranında saptanmıştır. Bağıl varlığı %1'in altında bulunan diğer türler ise *Alternaria alternata* (F0, F1), *Alternaria hordeicola* (F0, F1, F7, F10, F21), *Alternaria infectoria* (F0, F1), *Alternaria metachromatica* (F0, F1, F7, F10, F21), *Ascochyta herbicola* (F0, F1), *Aureobasidium pullulans* (F0, F1), *Candida tropicalis* (F0), *Cladosporium flabelliforme* (F0, F1), *Clavispora lusitaniae* (F1), *Filobasidium magnum* (F0, F1), *Hanseniaspora opuntiae*, *Kazachstania humilis*, *Kluyveromyces marxianus* (F0, F1, F7, F21), *Mycosphaerella tassiana* (F0, F1), *Pichia kluyveri* (F0, F1, F7, F21), *Pichia mandshurica* (F10, F15, F21), *Symbiotaphrina buchneri* (F0) ve *Stemphylium herbarum* (F0)'dur.



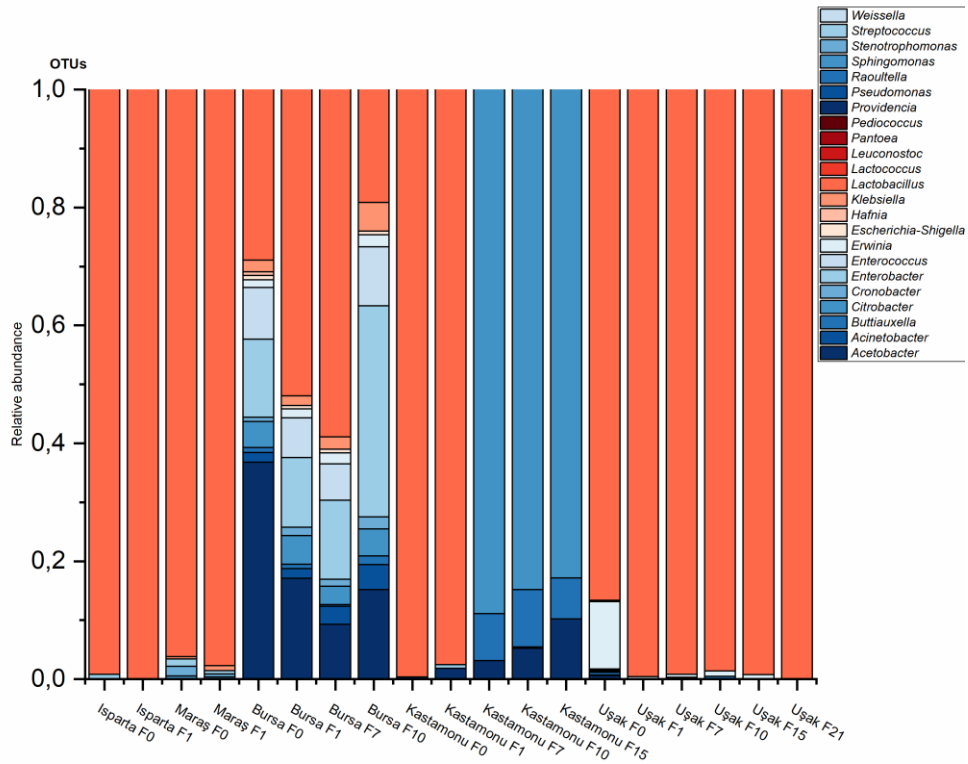


Şekil 4.34. Uşak tarhanası fungal mikrobiyotasına ait Krona grafikleri a) F0, b) F1, c) F7, d) F10, e) F15 ve f) F21.

4.4.3. Farklı Tarhana Çeşitleri Mikrobiyotasının Genel Değerlendirmesi

4.4.3.1. Bakteriye Mikrobiyota

Bu tez çalışmasında tüm tarhana hamurları bakteriye mikrobiyotası bütün olarak değerlendirildiğinde fermantasyon prosesinde başlıca yer alan mikroorganizma cinslerinin *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Providencia* ve *Enterococcus* olduğu bulunmuştur (Şekil 4.35). Fermantasyon sürecinde laktik asit bakterilerinin varlığı tür düzeyinde incelendiğinde ise bunların başlıca zorunlu heterofermentatif (*Levilactobacillus brevis* (%0,5), *Limosilactobacillus fermentum* (%0,5), *Levilactobacillus namurensis* (%0,5), *Limosilactobacillus panis* (%0,5), *Limosilactobacillus pontis* (50,5), *Levilactobacillus zymae* (%2,1)) ve fakültatif heterofermentatif (*Companilactobacillus paralimentarius* (%0,5), *Lactiplantibacillus plantarum* (%1,1), *Leuconostoc citreum* (%0,5), *Pediococcus acidilactici* (%2,7), *Pediococcus pentosaceus* (%1,1)) bakterilerden oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.35. Farklı tarhana çeşitlerinin fermantasyon sürecinde tespit edilen bakteri cinsleri.

Tarhana fermantasyonunda görev alan laktik asit bakterilerinin araştırıldığı bir çalışmada *Lactiplantibacillus plantarum* türünün yedi günlük fermantasyon süreci boyunca mikrobiyotada baskın olarak bulunduğu belirlenmiştir [52]. Fermantasyon başlangıcında *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* türleri tarhana hamurunda tespit edilirken, fermantasyon sonunda ortamda *Lactobacillus delbrueckii* sp. *delbrueckii*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* sp. *cremoris*, *Pediococcus* sp., *Enterococcus durans*, *Lacticaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei* ve *Lactiplantibacillus plantarum* bulunmuştur. Ayrıca *Levilactobacillus brevis* türünün de fermantasyonun birinci gününde ortaya çıktığı ve üçüncü gününde ortamdan kaybolduğu gözlenmiştir [52].

Sıcaklık ve pH değişimlerinin tarhana fermantasyonuna etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis* and *Companilactobacillus alimentarius* türlerinin farklı fermantasyon koşullarında (25°C ve 30°C) ortak baskın türler olduğu ve *Lacticaseibacillus casei* ve *Lactiplantibacillus fabifermentans* türlerinin de değişen fermantasyon koşullarıyla ortamda bulunduğu gözlenmiştir [198]. Aynı çalışma kapsamında yapılan metagenomik analizler de tarhana fermantasyonunda *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* ve *Enterococcus* türlerinin hakim olduğunu, sadece bazı çeşitlerde de *Pediococcus* varlığının belirlendiğini göstermiştir [198]. Settanni [50] de fermantasyon sıcaklığının tarhana hamuru mikrobiyotasına etkilerini incelediğinde daha yüksek sıcaklıklarda (40°C) uygulanan fermantasyon işleminde *Pediococcus acidilactici* türü baskınken, daha düşük sıcaklıklarda (30°C) *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Levilactobacillus brevis* türlerinin baskın olduğunu belirlemiştir.

Şengün [27] geleneksel tarhana çeşitlerinin mikrobiyotasının *Pediococcus acidilactici* (%27), *Streptococcus thermophilus* (%19), *Limosilactobacillus fermentum* (%19), *Enterococcus faecium* (%12), *Pediococcus pentosaceus* (%8), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (%5), *Weissella cibaria* (%4), *Lactiplantibacillus plantarum/paraplantarum* (%3), *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* (%2), *Leuconostoc citreum* (%2) and *Lacticaseibacillus casei* (%0.5)'den oluştuğunu bulmuştur. Başka bir çalışmada ise geleneksel ev yapımı tarhana hamurlarının fermantasyonu sırasında *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*,

Levilactobacillus namurensis, *Levilactobacillus brevis*, *Companilactobacillus farciminis*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Pediococcus acidilactici* farklı hamur örneklerinde gözlenirken, *Lactobacillus crispatus* çalışılan örneklerin yalnızca bir tanesinde tespit edilmiştir [16].

Bu çalışmada yalnızca Bursa tarhanası çeşidinden izole edilmiş olan *Pediococcus acidilactici* türü, daha önce Şengün [27] tarafından tarhana hamurunda kullanılan yoğurttan izole edilmiştir. Ancak, Şengün [27] tarafından da belirtildiği gibi *Pediococcus acidilactici* türünün süt ürünlerinden izole edildiği çalışmalar oldukça kısıtlı olmakla birlikte genellikle bitkilerden, fermente bitki materyallerinden, gıda ve yemlerden, ve insan ve hayvanların bağırsak yollarından izole edilir [199]. Ayrıca, diğer çeşitlere göre daha yüksek bir başlangıç pH değerine (5,41) Bursa tarhanası *Pediococcus acidilactici* türünün gelişimi için uygun bir ortam sağlamış olabilir [200].

Şimşek [16], tarhana fermantasyonu sırasında *Levilactobacillus namurensis*, *Companilactobacillus mindensis*, *Lactobacillus crispatus*, *Companilactobacillus farciminis*, *Fructilactobacillus sanfranciscensis* ve *Lactiplantibacillus fabifermentans* türlerini mikrobiyotada belirlemiştir. Bu tez çalışmasında ise *Levilactobacillus namurensis* türü Uşak tarhanasında fermantasyonun yedinci gününde baskın tür olarak tespit edilmiştir. Daha önceki bir çalışmada *Limosilactobacillus pontis*, *Companilactobacillus paralimentarius*, *Levilactobacillus namurensis* ve *Levilactobacillus zymae* türlerinin ekşi hamur mikrobiyotasında bulunduğu belirlenmiştir [201]. Ayrıca, Belçika tipi ekşi hamurlarda [202] ve Kimchi'de de [203] tespit edilen *Levilactobacillus zymae* türü bu çalışmada Maraş tarhanasında bulunmuştur. Ayrıca, yine Maraş tarhanasında tespit edilen *Lactobacillus helveticus* türü, İsveç tipi ve olgunlaştırılmış İtalyan tipi peynirler, ve fermente süt ürünleri üretiminde kullanılan homofermentatif, termofilik bir laktik asit bakterisidir. Bu bakteri türü sahip olduğu proteolitik sistem ile süt fermantasyonu sırasında biyoaktif bileşenlerin hızlı ve etkin bir şekilde ortaya çıkmasını sağlayarak üretilen gıda ürünün insan sağlığı üzerine olumlu etkiler göstermesine katkı sağlamaktadır [204].

Soyuçok [29], tarhana hamuru fermantasyonu sürecini metagenomik yaklaşımlarla incelediği bir araştırmada, başlangıç anında hamur ortamında *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Lactobacillus*, *Serratia*, *Streptococcus* ve *Weissella* cinsleri baskinken, fermantasyonun dördüncü gününden itibaren baskın olan cinslerin azalarak *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerinin *sensu stricto* olduğunu belirlemiştir. Omeroğlu [205] ise 96 adet kurutulmuş tarhana çeşidinde cins seviyesinde en yüksek bağıl varlıkta bulunan mikroorganizmaların *Bacillus*, *Enterococcus* ve *Paenibacillus* olduğunu tespit etmiştir. Soyuçok [29] ve Settanni [50], bu çalışmada da tarhana hamuru örneklerinde tespit edilen *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* cinsi bakterilerin hamur formülasyonunda kullanılan yoğurt ve süt kremasından kaynaklandığını belirtmiştir. Buna karşın, Minervini [206], tohum mikrobiyotasının undaki LAB varlığını etkilemesi sonucu *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinin buğday unundaki çekirdek florayı oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, cins düzeyinde undaki baskın LAB cinsinin *Enterococcus* olduğu grlmştir [206].

Çiğ tahılların mikroflorasını oluşturan bakteriler, mayalar ve küfler, bu tahıllardan doğal fermantasyonla hazırlanan gıdalarda da bulunmaktadır. Bu mikrobiyotada belirlenen bakteriler *Pseudomonas* gibi Gram negatif aeroblar ve *Enterobacteriaceae* gibi fakültatif anaerobların yanında Gram pozitif laktik asit bakterilerinden homofermentatif rodlar (*Lactocaseibacillus casei*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Latilactobacillus curvatus*, *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Ligilactobacillus salivarius*), heterofermentatif rodlar (*Levilactobacillus brevis* ve *Limosilactobacillus fermentum*), homofermentatif koklar (*Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus parvulus* ve *Pediococcus pentosaceus*) ve heterofermentatif koklar (*Leuconostoc* ve *Weissella*) olmaktadır [180].

4.4.3.2. Fungal Mikrobiyota

Tarhana hamuru fungal mikrobiyotasını metagenomik yaklaşımlarla inceleyen bu çalışmada, fungal türlerin tarhanadaki çeşitliliğinin ve bunların miktarlarının geleneksel formülasyona ve fermantasyon süresine göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir (şekil 4.36).

Daha önceki çalışmalarda Settanni [50], tarhanadaki baskın fungal türün *Saccharomyces cerevisiae* olduğunu belirlerken; Özel [211], *Pichia kudriavzevii* türünün en yüksek miktarda bulunduğunu tespit etmiştir. Ancak, bu tez çalışmasında Bursa çeşidinde *Saccharomyces* cinsi, Isparta ve Maraş çeşitlerinde *Kluyveromyces marxianus*, Kastamonu ve Uşak çeşitlerinde *Issatchenkia orientalis* türleri baskın olarak belirlenmiştir. Literatürde ise tarhana hamurunda tespit edilen diğer maya türleri *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida humilis*, *Candida glabrata*, *Kazachstania barnettii*, *Kazachstania exigua*, *Kazachstania servazzii* ve *Kazachstania unispora* olmuştur [50,211].

Ekşi hamur mikrobiyotasında tespit edilen mayalar *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *Candida humilis*, *Issatchenkia orientalis*'dir [180]. Başka bir çalışmada ise farklı tipte ekşi hamur örneklerinden *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Kazachstania barnettii* ve *Kazachstania exigua* türü mayalar izole edilmiştir [197]. De vuyst [180], ekşi hamur hazırlanmasında kullanılan tahıllarda *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulasporea*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* ve *Sporobolomyces* cinsi fungal türlerin tespit edildiğini belirtmiştir. Ayrıca, bu hammaddelerde tespit edilemeyen *Saccharomyces cerevisiae* türünün ekmek mayası ile hamur yapısına girdiği düşünülmektedir.

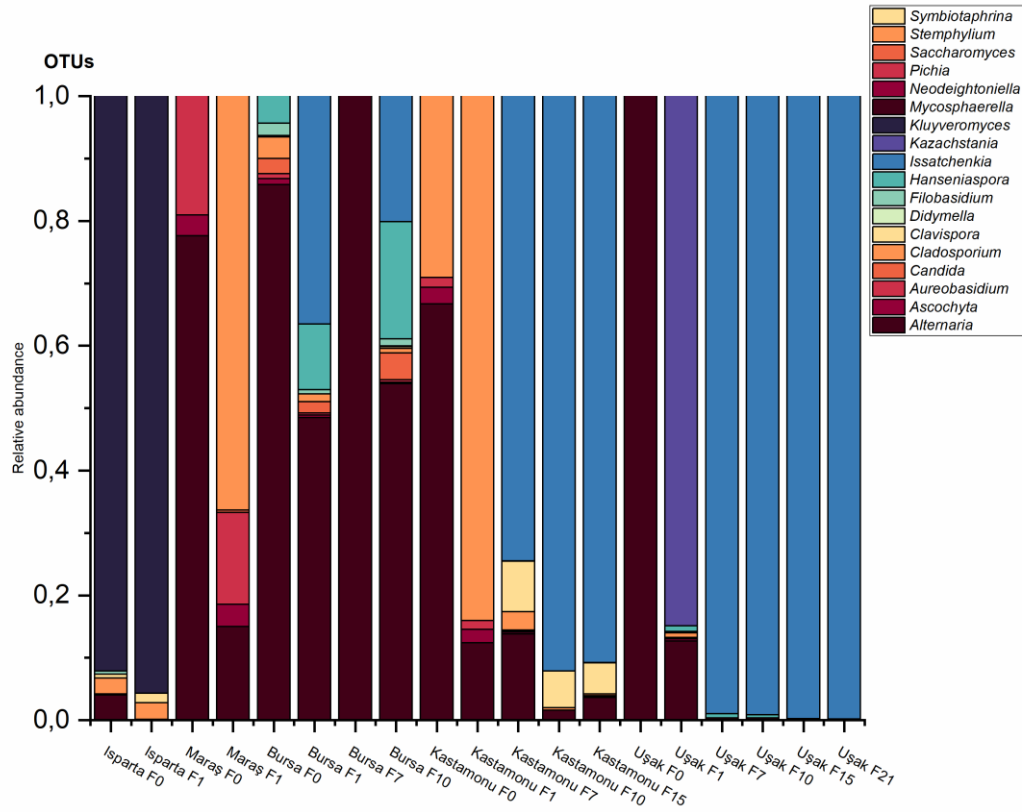
Tomurcuklanan bir maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae*, aerobik ortamlarda da glukozu fermente ederek karbondioksit ve etanol oluşturması açısından fermente içkiler ve ekmek üretiminde önemli bir yere sahiptir. Tarhana çeşitlerinde önemli bağıl varlıkta tespit edilen *Saccharomyces cerevisiae* cinsi mayalar, mikrobiyotada bulunan LAB ile etkileşim halinde yaşamaktadır. Bunun yanında *Saccharomyces cerevisiae* laktozu karbon kaynağı olarak kullanamazken; LAB metabolizması sonucu oluşan laktik asiti metabolize edebilmektedir ve laktik asit üretimi sonucu sürekli yükselen asitliğin kontrol altında tutulmasını sağlamaktadır [212].

Tarhanadan izole edilen maya cinslerinden biri olan *Kluyveromyces*, 26S rDNA dizilemesine göre 6 tane tür içerir ve hemiaskömisetöz mayalar arasında yer alır [82]. Bu cinsin en önemli üyelerinden olan *Kluyveromyces marxianus* türünün laktoz ve ünilin de

dâhil olmak üzere çok çeşitli şekerleri kullanılabilme, yüksek ısıya dayanıklılık, litik enzimler üretebilme, diğer ökaryotlara kıyasla hızlı gelişme gösterme ve fermantasyonla etanol üretebilme özellikleri bulunmaktadır [213,214]. Bu tür mayaların süt, kefir, peynir ve yoğurt gibi geleneksel süt ürünleri ile ilişkisi olduğu bilinmektedir [82,213]. Bu çalışma kapsamında hazırlanan ve bileşiminde yoğurt kullanılan Isparta ve Maraş çeşitlerinde %1 bağıl varlıktan yüksek oranda ve formülasyonunda süt kullanılan Bursa tarhanasında %1 bağıl varlıktan düşük olmak üzere fermantasyon sonuna kadar *Kluyveromyces marxianus* türü tespit edilmiştir. Bunun yanında formülasyonlarında yoğurt bulunan Kastamonu tarhanasında fermantasyonun yedinci ve Uşak tarhanasında birinci günde %1 bağıl varlıktan yüksek olarak *Kluyveromyces marxianus* türü tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda da *Kluyveromyces marxianus*'un laktozu fermente edebilmesi ve sitrik ve süksinik asiti kullanabilme özellikleriyle süt ürünlerinde canlı kalabildiği tespit edilmiştir [82,213,215]. Bu yüzden, Bölüm 4.6.2'de görüldüğü gibi örneklerin sitrik ve süksinik asit içeriklerindeki kümelenme biçimlerinin de *Kluyveromyces marxianus* metabolizmasından etkilendiği düşünülebilir.

Tarhana çeşitlerinde ve ekşi hamur mikrobiyotasında bulunan *Candida* türü ise, bitkiler, çürüyen bitki örtüsü, yaprak yüzeyleri, meyveler ve toprak ile ilişkilidir. Bu yüzden tahıl kökenli fermente gıdaların mikrobiyotasında da yer alan *Candida* anaerobik gelişme gösteremez. *Candida* proteolitik, glikozidik ve pektinolitik aktivite gösterirken, ikincil metabolitler de üretir ve lipolitik ve üreaz aktivitesi de gösterir [216].

Mayalar fermantasyon ve glikoliz aracılığıyla tarhana hamurunda bulunan karbonhidratları etanol ve karbondioksit fermente ederler. Bunun yanında, aminoasit metabolizmaları sonucunda da hamur flavorunun oluşumunda önemli rol oynayan bileşiklerin üretimini sağlarlar.

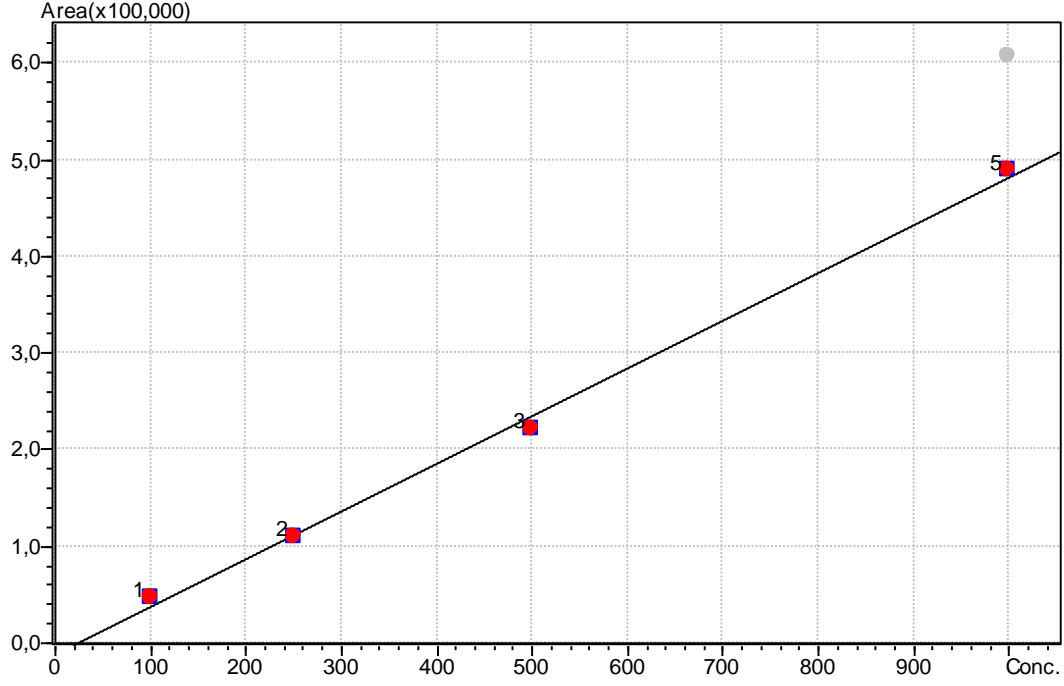


Şekil 4.36. Farklı tarhana çeşitlerinin fermantasyon sürecinde tespit edilen fungal cinsler.

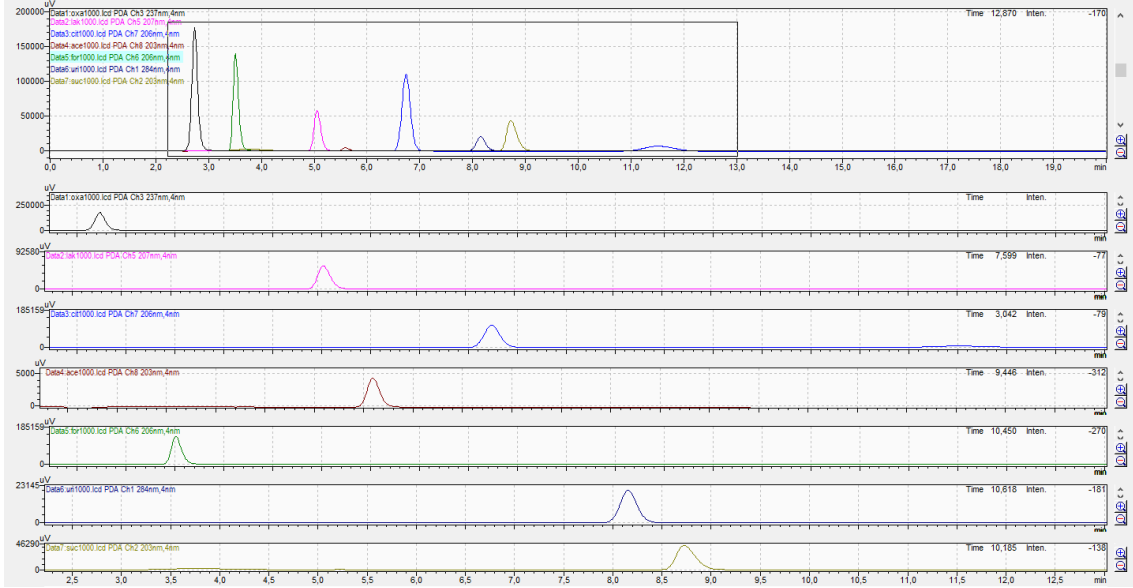
Tarhana ve ekşi maya hamuru benzeri ortamlarda otantik maya türlerinin tespit edilerek izole edilmesi ve kullanılması istenilen karakterde son ürünlerin elde edilmesi için önem arz etmektedir.

4.5. Metabolomik Yaklaşım ile Tarhana Örneklerinde Bulunan Bazı Organik Asitlerin ve Etanol Miktarlarının Belirlenmesi

Geleneksel yöntemlerle hazırlanan beş farklı tarhana çeşidinin fermantasyon süreci boyunca içerdikleri organik asit miktarlarının tespit edilmesi için analizler yapılmıştır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı ile yapılan analizlere ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.37’de gösterilmiştir. Analizlerde yer alan standart organik asitlere ait okuma kanalları ve geliş zamanları Şekil 4.38’de yer almaktadır. Analizler sonucu elde edilen kromatogramlardan laktik asite ait Uşak F0, Uşak F1 ve Uşak F21 örneklerinin sonuçları Şekil 4.39’de gösterilmiştir.

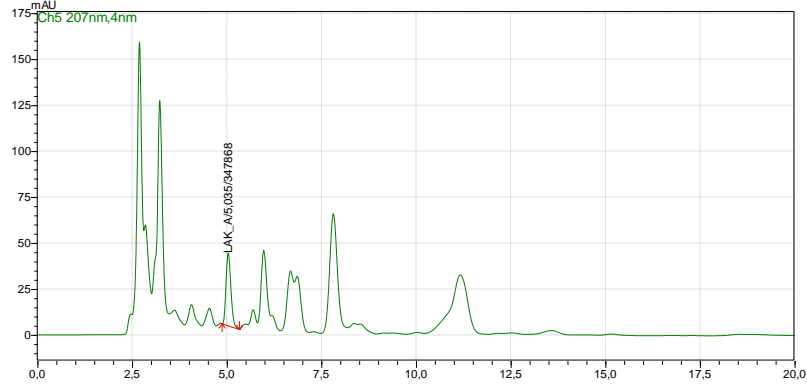


Şekil 4.37. Organik asit analizlerinde kullanılan kalibrasyon grafiği; $Y=493,387X-11.823,4$, $r^2 = 0,9970316$, $r = 0,9985147$.

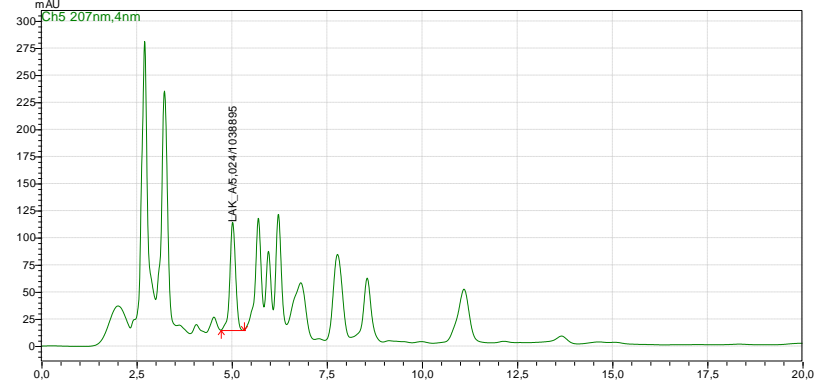


Şekil 4.38. Organik asit standartlarına ait geliş zamanları ve okuma kanalları.

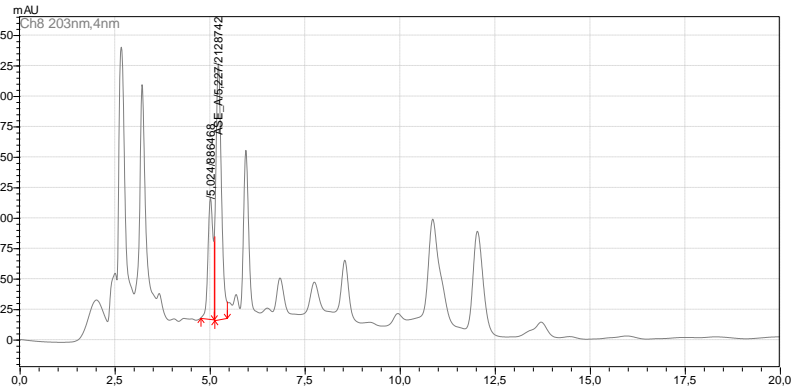
a)



b)



c)



Şekil 4.39. Uşak F0 (a), Uşak F1 (b) ve Uşak F21 (c) örneklerinin laktik asit içeriklerine ait kromatogramlar.

4.5.1. Laktik asit

Tarhana fermantasyonunda bulunan major organik asit laktik asittir ve kullanılan tahıl ununda ve süt ürünlerinde bulunan fermente edilebilir karbonhidratlardan üretilir [10]. Fermantasyon başlangıç anında Kastamonu tarhanası en yüksek (0,681 g/100 g) ve Bursa tarhanası en düşük (0,085 g/100 g) laktik asit içeriğine sahiptir (Çizelge 4.22). Fermantasyon bitiş anları karşılaştırıldığında ise yine Kastamonu çeşidinin en yüksek (F15, 1,364 g/100 g) ve Bursa çeşidinin en düşük (F10, 0,218 g/100 g) miktarda laktik içerdiği tespit edilmiştir.

Isparta tarhanası laktik asit içeriği fermantasyon başlangıcında 0,542 g/100 g'dan 24 saat sonunda 0,628 g/100 g'a ulaşırken; Maraş tarhanası çeşidinin laktik asit içeriği de F0 anında 0,646 g/100 g'dan 24 saatlik fermantasyon sonunda 0,813 g/100 g'a yükselmiştir (Şekil 4.40). Arslan-Tontul [171], tarhana hamurlarının ortalama laktik asit miktarının fermantasyonun ilk 24 saatinde 0,331 g/100 g'dan 0,424 g/100 g'a yükseldiğini tespit etmiştir.

Bursa çeşidinin F0'da laktik asit içeriği 0,085 g/100 g'dır. Fermantasyon sürecinde laktik asit miktarı artarak F7'de 0,227 g/100 g olmuş, daha sonra fermantasyon bitişinde 0,218 g/100 g'a düşmüştür ($p>0.05$). Şekil 4.40'da görüldüğü gibi Bursa tarhanasının laktik asit içeriği fermantasyon boyunca diğer çeşitlerden daha azdır. Bu durumun hamur formülasyonunda yoğurt yerine süt kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, fermantasyonun yedinci gününde LAB grubu içerisinde en yüksek miktarda laktik asit üreticisi olduğu bilinen *Lactiplantibacillus plantarum* ([217]) varlığının yükselmesiyle Bursa çeşidinin laktik asit içeriğinin arttığı görülmüştür.

Kastamonu tarhanasının yoğurt harcı halinde olan başlangıç anında içerdiği laktik asit miktarı 0,681 g/100 g'dır. Fermantasyon prosesinin ilk 24 saatinde bu miktar yükselerek 0,893 g/100 g olmuş; F7'de hamur formu için yeni malzemeler eklenmesiyle ise 0,329 g/100 g'a düşmüştür. Kastamonu tarhanasında en yüksek laktik asit miktarı F10'da 1,460 g/100 g olarak belirlenirken; F15'de 1,364 g/100 g'a düşse de istatistiki olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Metagenomik analiz sonuçları Kastamonu çeşidinde

fermantasyonun onuncu gününden itibaren *Lactiplantibacillus plantarum* türünün baskın olduğunu göstermektedir. *Lactiplantibacillus plantarum* laktik asit fermentasyonunun homofermentatif olduğu ve birincil olarak büyüme ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [218].

Uşak tarhanası çeşidinde fermentasyon başlangıcında 0,328 g/100 g olarak belirlenen laktik asit miktarı 24 saatin sonunda 1,023 g/100 g olmuştur. Fermentasyonun onuncu gününe kadar artan laktik asit içeriği, onuncu günden itibaren düşmeye başlayarak fermentasyon sonunda 0,751 g/100 g olmuştur. Yazıcı [219] ev tipi Uşak tarhanası örneklerinin ortalama laktik asit içeriğini 0,994 g/100 g bulurken; hamurların fermentasyon sonu laktik asit içeriklerinin 0,703 g/100 g–1,151 g/100 g aralığında değiştiğini tespit etmiştir.

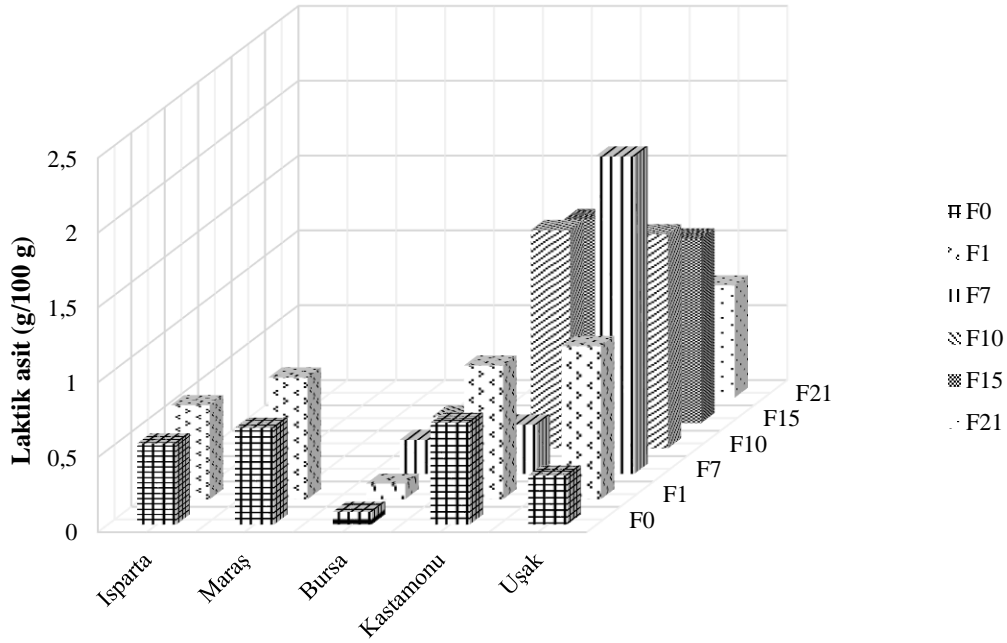
Çizelge 4.22. Tarhana örneklerinin fermentasyon süresi boyunca laktik asit içeriği değişimi (g/100 g).

Laktik asit	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
F0	0,542±0,018 ^{Aab}	0,646±0,030 ^{Aa}	0,085±0,033 ^{Bc}	0,681±0,114 ^{Ba}	0,328±0,034 ^{Cbc}
F1	0,628±0,043 ^{Aab}	0,813±0,133 ^{Aa}	0,104±0,020 ^{ABb}	0,893±0,003 ^{ABa}	1,023±0,308 ^{BCa}
F7	DY	DY	0,227±0,030 ^{Ab}	0,329±0,055 ^{Bb}	2,121±0,359 ^{Aa}
F10	DY	DY	0,218±0,028 ^{Ab}	1,460±0,110 ^{Aa}	1,431±0,028 ^{ABa}
F15	DY	DY	DY	1,364±0,221 ^{Aa}	1,234±0,141 ^{ABCa}
F21	DY	DY	DY	DY	0,751±0,087 ^{BC}

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermentasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Arslan-Tontul [171], ıslak tarhana hamuru örneklerinin ortalama laktik asit içeriğini 0,632 g/100 g olarak saptamış ve 3 günlük fermentasyon sonucunda laktik asit miktarının 0,331 g/100 g’den 1,082 g/100 g’a yükseldiğini belirlemiştir. Erbaş [10] ise yine 3 günlük fermentasyon uygulanan tarhana hamurlarında laktik asit miktarının 1,368 g/100 g’den 2,125 g/100 g’a yükseldiğini ve süreç sırasında laktik asit miktarında yaklaşık %50 oranında artış olduğu bulmuştur. Bunların yanında Magala [220], 144 saatlik fermentasyon sırasında tarhana örneklerinin laktik asit içeriğinin 0,18 g/100 g’den 0,81

g/100 g'a yükseldiğini saptanmıştır. Hamurlardaki karbonhidrat metabolizmasının ana metaboliti olan laktik asit flavouru doğrudan etkilemektedir. Geleneksel tarhana çeşitlerinin fermentasyon süreci boyunca laktik asit içeriklerindeki değişimler, hamurlardaki laktik asit miktarlarının kullanılan hammaddelerden ve geleneksel reçetelerden etkilendiğini göstermektedir.



Şekil 4.40. Tarhana çeşitlerinin fermentasyon süresi boyunca laktik asit içeriği değişimi.

4.5.2. Süksinik asit

Örneklerin fermentasyon boyunca süksinik asit içeriklerinin değişimi Çizelge 4.23'de gösterilmiştir. Fermentasyon başlangıç anları karşılaştırıldığında en düşük süksinik asit içeriği Kastamonu tarhanası (0,015 g/100 g) ve en yüksek süksinik asit içeriği Bursa tarhanası (0,299 g/100 g) örneklerinde bulunmuştur. Fermentasyon bitişleri karşılaştırıldığında ise en düşük süksinik asit içeren örnek Maraş çeşidi (0,109 g/100 g) iken; en yüksek Kastamonu çeşididir (1,129 g/100 g).

Isparta tarhanası hamuru örneklerinde F0'da 0,047 g/100 g olarak tespit edilen süksinik asit miktarı F1'de 0,225 g/100 g'a yükselmiştir. Maraş çeşidinde ise F0'da 0,044 g/100 g

olarak ölçülen süksinik asit miktarının, 24 saatlik fermantasyon sonunda 0,109 g/100 g'a yükseldiği bulunmuştur.

Bursa tarhanası örneklerinde F0'da 0,299 g/100 g süksinik asit tespit edilmiştir. Fermantasyonun ilk 24 saati sonunda süksinik asit miktarında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Ancak, F7'de hamurun süksinik asit miktarı 0,462 g/100 g'a yükselirken fermantasyon sonunda 0,389 g/100 g'a düşmüştür.

Kastamonu tarhanası F0'da 0,015 g/100 g süksinik asit içerirken fermantasyon süresi boyunca bu organik asitin hamurdaki varlığı artmıştır. Fermantasyonun yedinci gününde formülasyona un eklenmesinin ardından F10 örneğinde 0,915 g/100 g ve F15 örneğinde 1,129 g/100 g süksinik asit tespit edilmiştir.

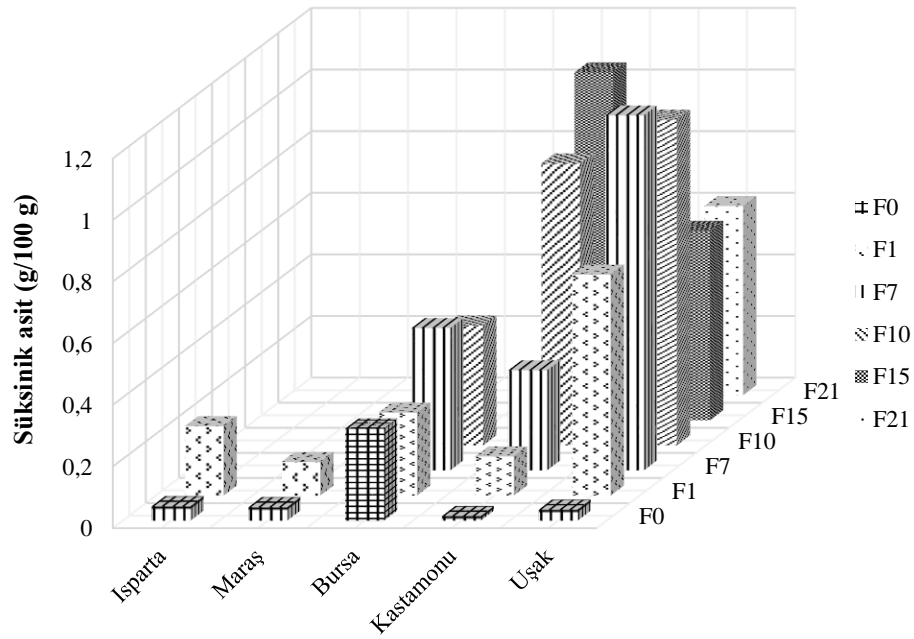
Uşak tarhanası örneklerinin F0'da 0,036 g/100 g süksinik asit içerdiği belirlenmiştir. Fermantasyonun ilk 24 saatinden itibaren süksinik asit içeriğinde hızlı bir artış tespit edilmiş ve F10'da 1,057 g/100 g süksinik asit ölçülmüştür. Ancak F15'den itibaren süksinik asit miktarı azalarak F21 örneklerinde 0,614 g/100 g süksinik asit tespit edilmiştir.

Bursa tarhanası dışındaki tüm çeşitlerde süksinik asit miktarının fermantasyonun ilk 24 saatinde arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.41). Bunun yanında yine hamurların hazırlandığı anda alınan örneklerde Bursa tarhanası dışındaki örnekler süksinik asit içeriği açısından istatistiki olarak benzer bulunmuştur ($p>0.05$). Örneklerin yüksek miktarda süksinik asit içermesi fermantasyon sırasında bakterilerin pirüvat oksidasyonu ya da mayaların glikosilat döngüsünden kaynaklanabilir [21]. Daha önceki bir çalışmada tarhana hamurlarının fermantasyon sürecinde süksinik asit içeriklerinin, fermantasyon başlangıcında 0-0,473 g/100 g aralığından fermantasyon sonunda 0,702-1,434 g/100 g aralığına değiştiğini belirlenmiştir. Magala [26], ise 144 saatlik fermantasyon sonunda tarhana hamurlarının 1,286-1,384 g/100 g aralığında süksinik asit içerdiğini tespit etmiştir. Ekşi hamurlarda ise süksinik asit içeriğinin 0,08-1,11 g/100 g arasında değiştiği bulunmuştur [221].

Çizelge 4.23. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca süksinik asit içeriği değişimi (g/100 g).

Süksinik asit	Isparta	Maras	Bursa	Kastamonu	Uşak
F0	0,047±0,0002 ^{Bb}	0,044±0,002 ^{Bb}	0,299±0,026 ^{Ca}	0,015±0,000 ^{Eb}	0,036±0,003 ^{Cb}
F1	0,225±0,017 ^{Ab}	0,109±0,001 ^{Ab}	0,269±0,001 ^{Cb}	0,127±0,004 ^{Db}	0,717±0,087 ^{Ba}
F7	DY	DY	0,462±0,001 ^{Ab}	0,325±0,008 ^{Cc}	1,152±0,026 ^{Aa}
F10	DY	DY	0,389±0,012 ^{Bc}	0,915±0,009 ^{Bb}	1,057±0,043 ^{Aa}
F15	DY	DY	DY	1,129±0,002 ^{Aa}	0,615±0,016 ^{Bb}
F21	DY	DY	DY	DY	0,614±0,009 ^B

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.



Şekil 4.41. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca süksinik asit içeriği değişimi.

4.5.3. Asetik asit

Tarhana hamurlarından alınan örneklerin asetik asit içerikleri Çizelge 4.24'de gösterilmiştir. Fermantasyon başlangıç anları karşılaştırıldığında Isparta tarhanasında hiç asetik asit tespit edilememişken; Kastamonu tarhanası en yüksek (0,385 g/100 g) asetik asit içeriğine sahiptir. Fermantasyon bitiş anlarına göre ise asetik asit miktarı en düşük olan örnek Maraş tarhanasıyken (0,035 g/100 g), en yüksek olan örnek Kastamonu tarhanasıdır (0,661 g/100 g). Fermente ürünlerin asetik asit içeriği üründe bulunan karbonhidratların konsantrasyonu, nitrojen kaynağı ve pH ile ilişkiyken, şeker içeriğinin fazla olduğu koşullarda da alkolik fermantasyon sırasında belirgin şekilde yükselir [222].

Isparta tarhanasında fermantasyon başlangıcında hiç asetik asit tespit edilemezken, 24 saatlik fermantasyon sonunda 0,053 g/100 g asetik asit bulunmuştur. Ancak istatistiki olarak önemli bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Maraş çeşidinde ise fermantasyon başlangıcında 0,009 g/100 g olan asetik asit içeriği fermantasyon sonunda artarak 0,035 g/100 g olmuştur ($p>0,05$).

Bursa tarhanası örnekleri fermantasyon başlangıcında 0,157 g/100 g asetik asit içermektedir. İlk 24 saatte asetik asit içeriği artmış, ancak daha sonraki süreçte azalarak F10'da 0,167 g/100 g olmuştur. Ancak fermantasyon boyunca asetik asit içeriğinde istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Kastamonu tarhanasından fermantasyon başlangıcında alınan örneklerin 0,385 g/100 g asetik asit içerdiği belirlenmiştir. İlk 24 saatlik fermantasyon süresinde bu miktar 0,025 g/100 g'a düşmüş, ardından yükselmeye başlayarak F15 örneklerinde 0,661 g/100 g'a ulaşmıştır. Ancak süreç boyunca sonuçlar arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Uşak tarhanası örneklerinde fermantasyon başlangıcında 0,142 g/100 g asetik asit tespit edilmiştir. Fermantasyon prosesinin ilk 24 saati sonunda bu miktar 0,181 g/100 g olmuş, F7 örneklerinde ise ortamda hiç asetik asit bulunamamıştır. Fermantasyonun onuncu

gününde ise örneklerde 0,522 g/100 g asetik asit olduğu tespit edilirken, F15 ve F21 örneklerinin hiç asetik asit içermediği görülmüştür.

Çizelge 4.24. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca asetik asit içeriği değişimi (g/100 g).

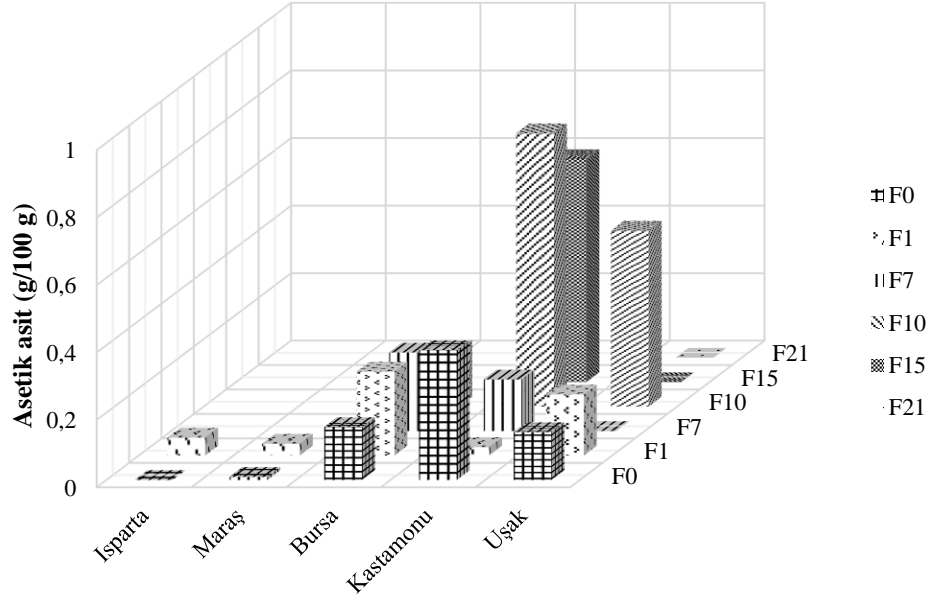
Asetik asit	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
F0	0,000±0,000 ^{Aa}	0,009±0,009 ^{Aa}	0,157±0,117 ^{Aa}	0,385±0,224 ^{Aa}	0,142±0,072 ^{Aa}
F1	0,053±0,053 ^{Aa}	0,035±0,018 ^{Aaa}	0,249±0,157 ^{Aa}	0,025±0,025 ^{Aa}	0,181±0,091 ^{Aa}
F7	DY	DY	0,233±0,180 ^{Aa}	0,153±0,153 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F10	DY	DY	0,167±0,127 ^{Aa}	0,810±0,193 ^{Aa}	0,522±0,262 ^{Aa}
F15	DY	DY	DY	0,661±0,160 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Ab}
F21	DY	DY	DY	DY	0,000±0,000 ^A

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Magala [26], tarhana hamurlarının 144 saatlik fermantasyon sonunda 0,19-0,26 g/100 g asetik asit içerdiğini belirlerken; Bozkurt [223], fermantasyon başlangıcında örneklerde 0,25 g/100 g olan asetik asit miktarının 96 saatlik fermantasyon sonunda 0,46 g/100 g'a yükseldiğini tespit etmiştir. Taşdelen [224] de fermantasyon sonunda tarhana hamurlarında ortalama 0,08 g/100 g asetik asit tespit ederken; Isparta, Maraş, Bursa ve Kastamonu çeşitlerinde olduğu gibi hamurlarda fermantasyon sonunda başlangıç anından daha fazla asetik asit olduğunu belirlemiştir. Özdemir [21], tarhana hamurlarında fermantasyonun beşinci gününde asetik asit oluşumunu tespit etmiş ve asetik asitin fermantasyon sürecinin bir ürünü olduğunu ifade etmiştir. Benzer şekilde, ekşi hamurda asetik asit oluşumunun LAB metabolizmasının sonucu olduğunu belirten Vernocchi [225], ekşi hamur örneklerinin asetik asit içeriğinin 0,126-0,259 g/100 g aralığında değiştiğini belirlemiştir.

Bunun yanında metagenomik analiz sonuçlarının da işaret ettiği gibi tarhana mikrobiyotası çoğunlukla zorunlu ve fakültatif heterofermentatif LAB'den oluşmaktadır.

Gobbetti [85] de ekşi hamurlarda asetik asit oluşumunun başlıca heterofermentatif LAB aktiviteleri sonucu gerçekleştiğini belirtmiştir.



Şekil 4.42. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca asetik asit içeriği değişimi.

4.5.4. Sitrik asit

Tarhana hamuru örneklerinin fermantasyon süreci boyunca sitrik asit içeriklerinde görülen değişimler Çizelge 4.25’de gösterilmiştir. Fermantasyon başlangıç anları kıyaslandığında Maraş çeşidinde sitrik asit tespit edilemezken; en yüksek sitrik asit içeriği Kastamonu tarhanasında (0,263 g/100 g) bulunmuştur. Hamurların fermantasyon sonundaki sitrat içerikleri karşılaştırıldığında ise Uşak tarhanası örneklerinde sitrat tespit edilemezken, Kastamonu örneklerinin en yüksek miktarda (0,172 g/100 g) sitrat içerdiği bulunmuştur. Şekil 4.43’de görüldüğü gibi Bursa, Kastamonu ve Uşak çeşitlerinde fermantasyonun ilk gününden sonra sitrik asit içeriğinde azalma olduğu belirlenmiştir.

Isparta tarhanası F0’da 0,123 g/100 g sitrik asit içermektedir. Fermantasyon süresi sonunda sitrik asit içeriği artarak 0,147 g/100 g olmuş ve 24 saatlik süreçteki artış istatistikî olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Maraş çeşidinde fermantasyon başlangıcında sitrik asit tespit edilememiştir. Bir günlük fermantasyon süresi sonunda ise örneklerde 0,014 g/100 g sitrik asit ölçülmüş; ancak bu değişim istatistiki olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0,05$).

Bursa tarhanasına ait örnekler fermantasyon başlangıcında 0,172 g/100 g sitrik asit içermektedir. İlk 24 saatte sitrik asit içeriğinde artış ve ilerleyen günlerde azalma gözlenerek hamur örneklerinde F10'da 0,159 g/100 g sitrik asit olduğu belirlenmiştir. Ancak, tüm süreç boyunca gözlenen değişimler istatistiki olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0,05$).

Kastamonu tarhanası örneklerinin F0'da 0,236 g/100 g sitrik asit içerdiği ve F7'ye kadar sitrik asit miktarının arttığı tespit edilmiştir. Fermantasyonun yedinci gününde hamur formunun oluşturulmasıyla sitrik asit miktarı 0,144 g/100 g'a düşmüş, prosesinin devamını sitrik asit miktarı yine artarak 0,172 g/100 g olmuştur.

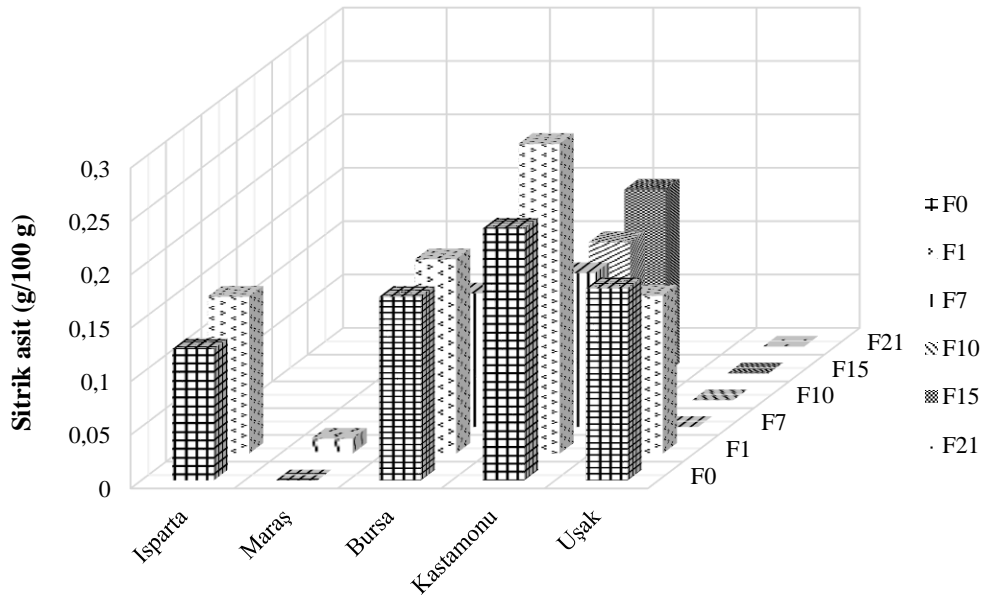
Uşak tarhanası örneklerinde fermantasyon başlangıcında 0,180 g/100 g sitrik asit bulunduğu belirlenmiştir. Hamurun sitrik asit içeriği ilk 24 saatte azalarak 0,148 g/100 g olmuş, prosesin devamında ise örneklerde sitrat tespit edilememiştir.

Magala [26], tarhana hamurlarında fermantasyon başlangıcında 0,134-0,132 g/100 g aralığında tespit edilen sitrik asit miktarının 144 saatlik fermantasyon sonunda 0,055-0,007 g/100 g'a düştüğünü ve bu azalmanın sitrik asitin fermantasyon sırasındaki ikincil reaksiyonlarda kullanılmasından kaynaklandığını belirtmiştir. Sitrat metabolizması sonunda oluşan ürünler karbondioksit, asetat, diasetil, asetoin ve 2,3-bütandiol'dür [195]. Ekşi hamurda ise, De Luca [221], çalışılan örneklerden yalnızca iki tanesinde sitrik asit tespit ederken; bu örneklerin sitrik asit içerikleri de 0,1402 g/100 g ve 0,1417 g/100 g olarak ölçülmüştür. Erbaş [10], tarhana hamurlarının sitrik asit içeriğinin F0'da 0,649 g/100 g'dan fermantasyon sonunda 0,364 g/100 g'a düştüğünü tespit etmiştir. Yine aynı çalışmada, tarhanada tespit edilen sitrik asitin özellikle domates olmak üzere, kullanılan sebzelerden kaynaklandığı ifade edilmiştir.

Çizelge 4.25. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca sitrik asit içeriği değişimi (g/100 g).

Sitrik asit	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
F0	0,123± 0,001Bb	0,000±0,000Ac	0,172±0,045Aab	0,236±0,005Aa	0,180±0,000Aab
F1	0,147±0,002Aab	0,014±0,001Ab	0,182±0,057Aab	0,290±0,063Aa	0,148±0,000Bab
F7	DY	DY	0,125±0,061Aa	0,144±0,058Aa	0,000±0,000Ca
F10	DY	DY	0,159±0,096Aa	0,148±0,007Aa	0,000±0,000Ca
F15	DY	DY	DY	0,172±0,001Aa	0,000±0,000Cb
F21	DY	DY	DY	DY	0,000±0,000C

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.



Şekil 4.43. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca sitrik asit içeriği değişimi.

4.5.5. Pirüvik asit

Tarhana hamuru çeşitlerinin içerdiği pirüvik asit miktarlarının fermantasyon süreci boyunca değişimi Çizelge 4.26’de gösterilmiştir. Buna göre Isparta, Bursa ve Uşak çeşitlerinde fermantasyon başlangıcında pirüvik asit tespit edilememiştir (Şekil 4.44).

Maraş ve Kastamonu çeşitleri arasında ise istatistiki olarak önemli bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). Fermantasyon sonunda ise Isparta ve Kastamonu çeşitlerinin pirüvik asit içermediği belirlenmiştir.

Isparta tarhanasına ait örneklerde 24 saatlik fermantasyon süreci boyunca pirüvik asit tespit edilememiştir. Maraş tarhanasında ise fermantasyon başlangıcında 0,002 g/100 g olan pirüvik asit miktarı 24 saatin sonunda 0,001 g/100 g olmuştur. Bursa çeşidinde F0 ve F1’de pirüvik asit tespit edilemezken, F7’de 0,009 g/100 g ve F10’da 0,011 g/100 g pirüvat saptanmıştır. Kastamonu tarhanası ise başlangıç anında 0,004 g/100 g pirüvat içerirken, bu değer 24 saatlik fermantasyonun sonunda 0,007 g/100 g olmuştur. Ancak, F15’de hamur örneklerinde hiç pirüvat saptanamamıştır. Uşak tarhanası çeşidinde fermantasyon başlangıcından fermantasyonun son gününe kadar hiç pirüvat tespit edilemezken; F21’de 0,089 g/100 g pirüvat bulunmuştur. Aynı tarhana çeşidinin farklı fermantasyon günlerinde ve farklı çeşitlerin aynı fermantasyon anlarında istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunamamıştır.

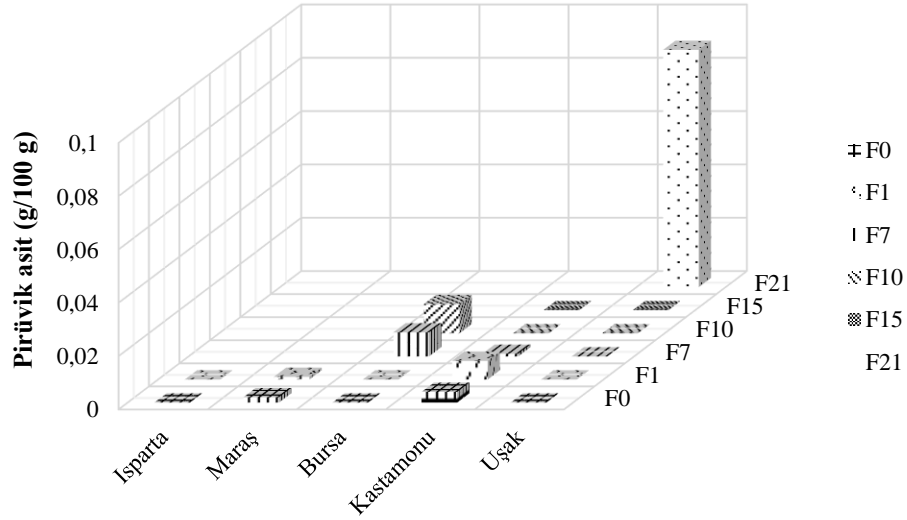
Çizelge 4.26. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca pirüvik asit içeriği değişimi (g/100 g)

Pirüvik asit	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
F0	0,000±0,000 ^{Aa}	0,002±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}	0,004±0,002 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F1	0,000±0,000 ^{Aa}	0,001±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}	0,007±0,004 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F7	DY	DY	0,009±0,004 ^{Aa}	0,001±0,001 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F10	DY	DY	0,011±0,006 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F15	DY	DY	DY	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F21	DY	DY	DY	DY	0,089± 0,089 ^A

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.

Erbaş [10], tarhana hamuru örneklerinin pirüvik asit içeriğinin fermantasyon başlangıcında 0,017 g/100 g’den taze yaş tarhanada 0,059 g/100 g’a ulaştığını belirlemiştir. Bozkurt [223] da 96 saatlik fermantasyon sırasında hamur örneklerinin

pirüvik asit içeriğinin ortalama 0,20 g/100 g'dan 0,38 g/100 g'a yükseldiğini tespit etmiştir. Pirüvik asit EMP izyolunun bir yan ürünü olduğundan bazı örneklerde hamur ortamında birikmiş olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.44. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca pirüvik asit içeriği değişimi.

4.5.6. Ürik asit

Çalışmada yer alan tarhana çeşitlerinden Maraş tarhanası fermantasyon başlangıcında en düşük (0,088 g/100 g) ve Kastamonu tarhanası en yüksek (0,251 g/100 g) miktarda ürik asit içeriğine sahiptir (Çizelge 4.27). Fermantasyon bitiş anları açısından tarhana çeşitleri karşılaştırıldığında ise en düşük ürik asit içeriği Uşak tarhanası örneklerinde (F21, 0,058 g/100 g) tespit edilirken, en yüksek Isparta örneklerinde (F1, 0,162 g/100 g) bulunmuştur. Ürik asit içeriği Isparta, Kastamonu ve Uşak çeşitlerinde fermantasyon sonuna doğru azalma gösterirken Maraş ve Bursa çeşitlerinde artma eğilimindedir (Şekil 4.45). Ayrıca Isparta ve Uşak dışındaki çeşitlerde fermantasyon prosesinin ilk 24 saatinde ürik asit içeriği istatistiksel olarak önemli farklılıklar göstermiştir.

Isparta tarhanası hamurunda fermantasyon başlangıcında 0,172 g/100 g olan ürik asit miktarı 24 saatlik fermantasyon sürecinde azalarak 0,162 g/100 g olmuştur ($p>0,05$). Maraş tarhanası örneklerinde ise ürik asit içeriği F0'da 0,088 g/100 g olarak ölçülmüş,

fermantasyon sonunda 0,115 g/ 100 g'a yükselmiştir. Ancak iki örneklem günü arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunamamıştır.

Bursa tarhanası örneklerinde fermentasyon başlangıcında 0,125 g/100 g olan ürik asit miktarı ilk 24 saatlik süreçte azalma gösterirken, fermentasyonun yedinci gününde 0,155 g/100 g olmuş, onuncu günde ise 0,154 g/100 g olarak belirlenmiştir ($p>0.05$).

Kastamonu tarhanasının yoğurt harcı halinde olduğu F0 örneklerinde ürik asit miktarı 0,251 g/100 g olarak belirlenmiştir. Hamurun ürik asit içeriği fermentasyonun yedinci gününe kadar azalmış ve yedinci günde hamur formunun oluşturulmasıyla 0,102 g/100 g olarak ölçülmüştür. Ancak, onuncu günde ürik asit miktarı tekrar yükselmeye başlamış (0,137 g/100 g) ve fermentasyon sonunda ürik asit miktarı 0,157 g/100 g'a ulaşmıştır. Bununla birlikte günler arasında istatistiki olarak önemli bir fark bulunamamıştır.

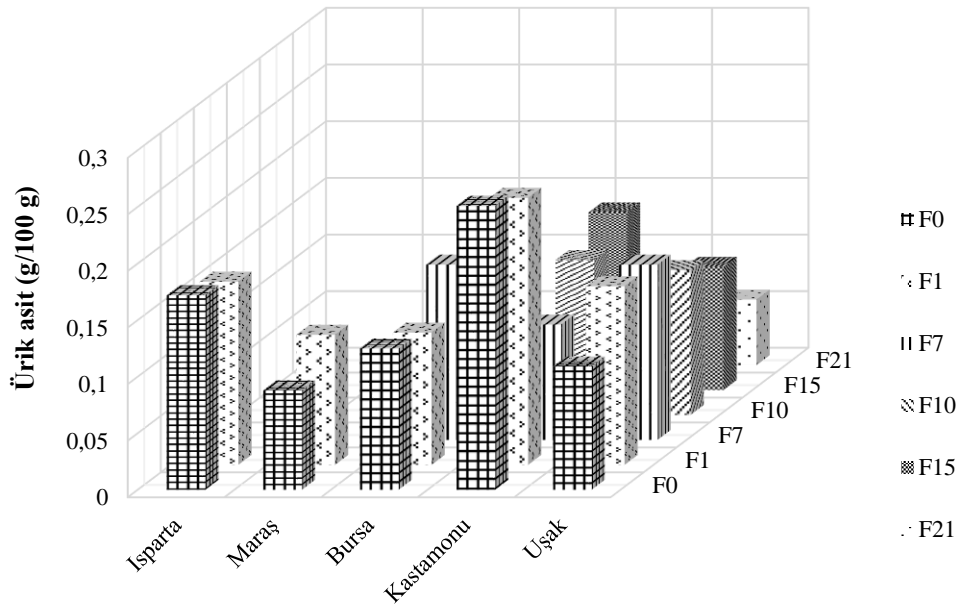
Uşak tarhanasında fermentasyon başlangıcında ürik asit içeriği 0,109 g/100 g olarak ölçülmüştür. Hamurda bulunan ürik asit miktarı fermentasyonun onuncu gününe kadar yükselmiş, ancak onuncu günde yine azalmaya başlayarak fermentasyon sonunda 0,058 g/100 g ürik asit tespit edilmiştir.

Sığırların normal biyomedikal prosesleri sonucunda oluşan ürik asit süt ve süt ürünlerinde bulunabilmektedir. Navder [226], yoğurtta 0. günde 20,06 ppm olan ürik asit miktarının 3 gün sonunda 20,36 ppm olduğunu tespit etmiş ve ürik asit içeriğinin fermentasyon prosesinden etkilenmediğini belirtmiştir. Buna karşın, Hafez [143], *Saccharomyces* sp. metabolizması sonucu birada ürik asit birikimi olduğunu bildirmiştir. Ayrıca mikroorganizmaların pürin katabolizması sonucu oluşan ürik asit, mikroorganizmaya bağlı olarak daha ileri son ürünlere parçalanmakta ya da ürik asit olarak salgılanmaktadır [143].

Çizelge 4.27. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca ürik asit içeriği değişimi (g/100 g)

Ürik asit	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
F0	0,172±0,003 ^{Ac}	0,088±0,011 ^{Ad}	0,125±0,001 ^{ABc}	0,251±0,013 ^{Aa}	0,109±0,002 ^{Bcd}
F1	0,162±0,003 ^{Ab}	0,115±0,002 ^{Ac}	0,117±0,001 ^{Bc}	0,236±0,002 ^{Aa}	0,158±0,018 ^{Ab}
F7	DY	DY	0,155±0,003 ^{Aa}	0,102±0,001 ^{Cb}	0,155±0,003 ^{Aa}
F10	DY	DY	0,154±0,016 ^{Aa}	0,137±0,001 ^{Ba}	0,128±0,002 ^{ABa}
F15	DY	DY	DY	0,157±0,003 ^{Ba}	0,109±0,001 ^{Bb}
F21	DY	DY	DY	DY	0,058±0,001 ^C

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.



Şekil 4.45. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca ürik asit içeriği değişimi.

4.5.7. Okzalik asit

Bu tez çalışmasında yer alan tarhana hamuru örneklerinin fermantasyon süreçleri boyunca okzalik asit içeriği değişimleri Çizelge 4.28’da gösterilmiştir. Fermantasyon başlangıç anları kıyaslandığında en düşük okzalik asit içeriği Maraş tarhanasında (0,079

g/100 g) tespit edilirken, en yüksek miktarda Bursa tarhanasında (0,206 g/100 g) belirlenmiştir. Maraş, Bursa ve Uşak çeşitlerinde fermantasyonun ilk 24 saatinde okzalik asit içeriğinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.46). Fermantasyonun aynı günlerinde farklı tarhana çeşitlerinin okzalik asit içeriği karşılaştırıldığında; F0'da Kastamonu ve Uşak dışında, ve F1'de Maraş ve Kastamonu dışındaki örneklerin istatistiki olarak önemli şekilde farklı olduğu görülmektedir.

Isparta tarhanası örneklerinde fermantasyon başlangıcında 0,108 g/100 g okzalik asit tespit edilmiştir. Bir gün süren fermantasyon prosesi sonunda okzalik asit miktarı azalarak 0,099 g/100 g olarak belirlenmiştir.

Maraş tarhanası çeşidinin fermantasyon başlangıcında 0,079 g/100 g okzalik asit içerdiği ve 24 saatlik fermantasyon sonucu okzalik asit miktarının artarak 0,126 g/100 g olduğu bulunmuştur.

Bursa tarhanası fermantasyon başlangıcında 0,206 g/100 g okzalik asit içermektedir. Fermantasyonun ilk 24 saatinde okzalik asit içeriği artsa da istatistiki olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Sürecin yedinci gününde hamur örneklerinin okzalik asit miktarı 0,314 g/100 g olmuştur. Ardından F10'da bu miktar 0,290 g/100 g'a düşse de F7'ye göre istatistiki olarak önemli bir fark görülmemiştir. Birçok fungal tür tarafından üretilmesinin yanında, ürik asitin de parçalanma ürünü olan okzalik asitin Bursa çeşidinde yüksek miktarda tespit edilmesi bu çeşidin fungal türler açısından zengin olmasından kaynaklanabilir.

Kastamonu tarhanası örneklerinde F0'da 0,157 g/100 g okzalik asit tespit edilmiştir. Fermantasyonun yedinci gününde 0,089 g/100 g'a düşen okzalik asit içeriği F10'da tekrar yükselmeye başlamıştır (0,118 g/100 g). Fermantasyon sonunda ise hamur örneklerinde 0,133 g/100 g okzalik asit tespit edilmiştir.

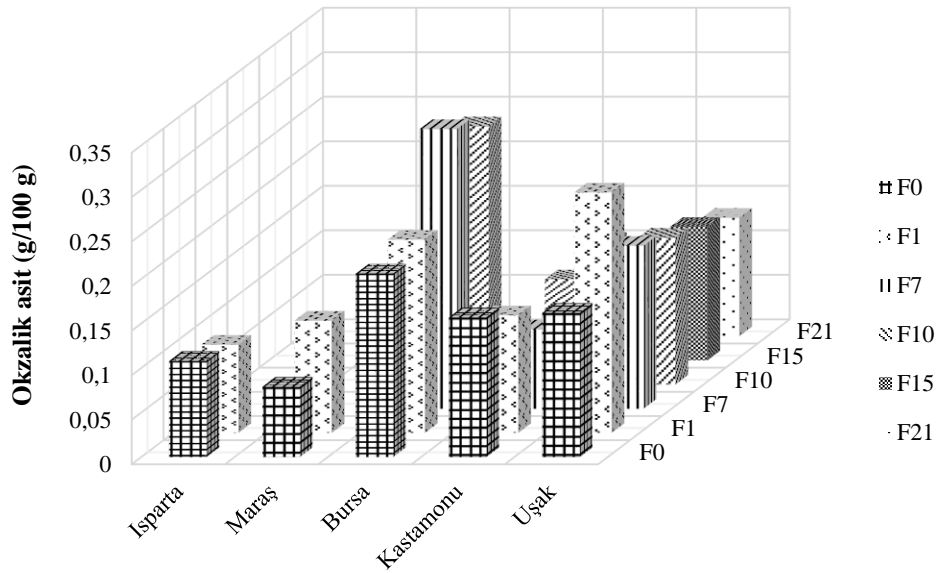
Uşak tarhanası örneklerinin F0'da 0,162 g/100 g okzalik asit içerdiği belirlenmiştir. Fermantasyonun ilk 24 saatinde hamurların okzalik asit içeriği artsa da (0,270 g/100 g)

sürecin devamında örneklerdeki okzalik asit miktarı azalmış ve F21’de 0,133 g/100 g olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.28. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca okzalik asit içeriği değişimi (g/100 g).

Okzalik asit	Isparta	Maras	Bursa	Kastamonu	Uşak
F0	0,108±0,001 ^{Ac}	0,079±0,000 ^{Bd}	0,206±0,001 ^{Ba}	0,157±0,004 ^{Ab}	0,162±0,002 ^{Cb}
F1	0,099±0,002 ^{Bd}	0,126±0,000 ^{Ac}	0,217±0,002 ^{Bb}	0,132±0,000 ^{Bc}	0,270±0,008 ^{Aa}
F7	DY	DY	0,314±0,013 ^{Aa}	0,089±0,001 ^{Dc}	0,183±0,005 ^{Bb}
F10	DY	DY	0,290±0,027 ^{Aa}	0,118±0,000 ^{4Cb}	0,165±0,002 ^{BCb}
F15	DY	DY	DY	0,133±0,001 ^{Bb}	0,150±0,001 ^{CDa}
F21	DY	DY	DY	DY	0,133±0,001 ^D

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.



Şekil 4.46. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca okzalik asit içeriği değişimi.

4.5.8. Formik asit

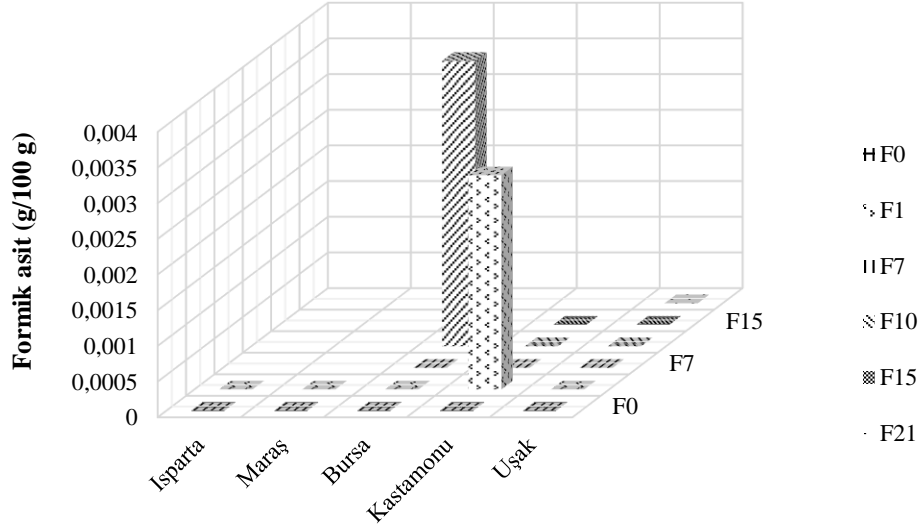
Tarhana hamuru örneklerinde fermantasyon süreci boyunca tespit edilen formik asit miktarları Çizelge 4.29’da gösterilmiştir. Fermantasyon boyunca Isparta, Maraş ve Uşak çeşitlerinde formik asit tespit edilemezken, Bursa F10 örneğinin 0,004 g/100 g ve Kastamonu F1 örneğinin 0,003 g/100 g formik asit içerdiği belirlenmiştir. Ancak hamur örnekleri arasında istatistiki olarak belirgin bir farklılık bulunamamıştır.

Tarhana fermantasyonu sırasında bazı örneklerde formik asit tespit edilemezken bazı örneklerde de görülen düzensiz artış ve azalışlar sonucu tarhana fermantasyonu ile formik asit üretiminin ilişkisi olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca Özdemir [21], formik asit oluşumunun tarhana fermantasyonu sırasında değil, mikroorganizmaların metabolik izyolu sırasında bir ara metabolit olarak oluştuğunu ifade etmiştir.

Çizelge 4.29. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca formik asit içeriği değişimi (g/100 g).

Formik asit	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
F0	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F1	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}	0,003±0,003 ^{Aaa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F7	DY	DY	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F10	DY	DY	0,004±0,004 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F15	DY	DY	DY	0,000±0,000 ^{Aa}	0,000±0,000 ^{Aa}
F21	DY	DY	DY	DY	0,000±0,000 ^A

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). “DY” ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.



Şekil 4.47. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca formik asit içeriği değişimi.

4.5.9. Etanol

Çalışılan farklı tarhana örneklerinin fermantasyon süreci boyunca etanol içeriklerinin değişimi Çizelge 4.30'da gösterilmiştir. Etanol mayaların ana metabolitiyken, heterofermentatif LAB'nin de metabolizma ürünlerinden biridir. Fermantasyon başlangıcında etanol içeriği en düşük olan örnek Uşak tarhanasıyken, en yüksek olan örnek Bursa tarhanasıdır. Fermantasyon sonunda hamurlarda oluşan etanol miktarları değerlendirildiğinde ise en düşük etanol Uşak tarhanasında (0,022 g/100 g) ve en yüksek etanol Bursa tarhanasında (0,225 g/100 g) tespit edilmiştir.

Isparta tarhanası fermantasyon başlangıcında 0,040 g/100 g etanol içermektedir. Bir günlük fermantasyon süresi sonunda hamurdaki etanol miktarı 0,068 g/100 g'a yükselmiştir. Maraş tarhanası hamurunda fermantasyon başlangıcında 0,019 g/100 g etanol tespit edilmiştir. Fermantasyon sonunda etanol miktarı artarak 0,031 g/100 g olmuştur.

Bursa tarhanası örneklerinde fermantasyon başlangıcında 0,135 g/100 g etanol bulunduğu saptanmıştır. Prosesinin ilk 24 saati sonunda hamurun etanol içeriği 0,266 g/100 g'a yükselmiş ve ardından F7'de 0,225 g/100 g'a düşmüştür. Fermantasyon sonunda ise

hamurdaki etanol miktarı değişmemiştir. Bursa tarhanasının diğer çeşitlere kıyasla daha yüksek miktarda etanol içermesinin formülasyonda ekmek mayası kullanılmasından kaynaklandığı düşünölmektedir.

Kastamonu tarhanası F0 örneği 0,065 g/100 g etanol içermektedir. Fermantasyon prosesinin ilk günü sonunda etanol miktarı 0,220 g/100 g'a ulaşmıştır. Yoğurt harcından yedinci günde hamur formunun oluşturulması sonucu etanol miktarı F7'de 0,093 g/100 g olarak ölçölmüştür. Fermantasyonun devamında etanol miktarı tekrar artmaya başlamış ve F15'de 0,150 g/100 g olarak saptanmıştır.

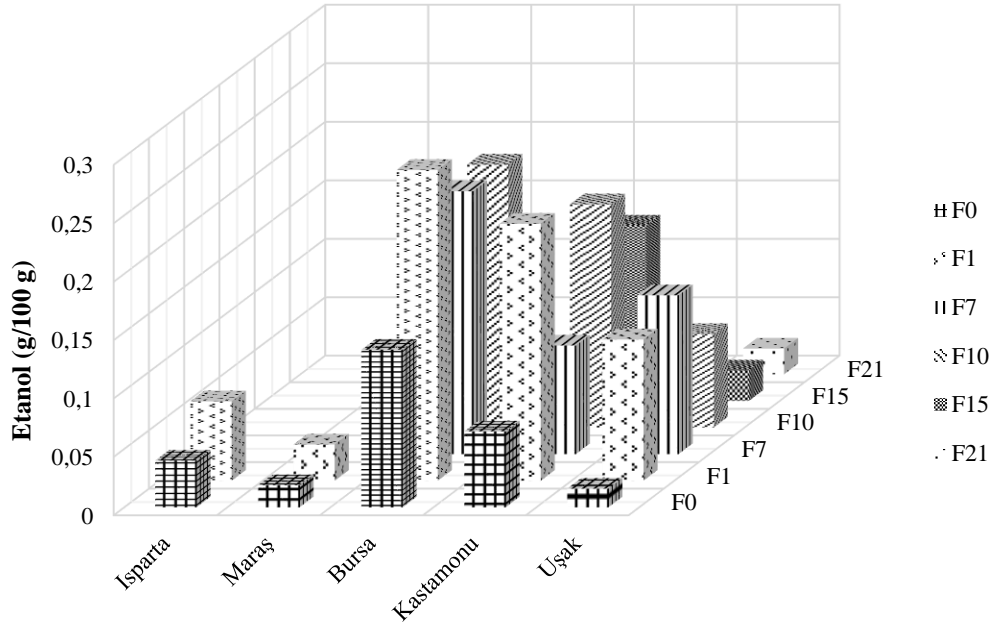
Uşak tarhanasında fermantasyon başlangıcında 0,016 g/100 g etanol bulunduğu ölçölmüştür. Hamur örneklerinde bulunan etanol miktarı F7'de 0,136 g/100 g'a ulaşmış, ancak daha sonra yine azalmaya başlayarak F21'de 0,022 g/100 g olarak belirlenmiştir.

Kumral [227], buğday unundan yapılan tarhana hamurlarının etanol içeriklerinin fermantasyonun başlangıç anında 1,63 g/100 g'dan 3 günlük proses sonunda 2,31 g/100 g'a yükseldiğini belirlemiştir. Ancak, başka bir çalışmada da ekşi hamur örneklerinin etanol içeriği 0,0208 g/100 g olarak bulunmuştur [228].

Çizelge 4.30. Tarhana örneklerinin fermantasyon süresi boyunca etanol içeriği değişimi (g/100 g).

Etanol	Isparta	Maraş	Bursa	Kastamonu	Uşak
F0	0,040±0,008 ^{Aab}	0,019±0,000 ^{Aab}	0,135±0,015 ^{Ba}	0,065±0,053 ^{Aab}	0,016±0,001 ^{Cb}
F1	0,068±0,012 ^{Aa}	0,031±0,008 ^{Aa}	0,266±0,005 ^{Aa}	0,220±0,111 ^{Aa}	0,121±0,027 ^{Aa}
F7	DY	DY	0,225±0,029 ^{Aa}	0,093±0,056 ^{Ab}	0,136±0,004 ^{Aab}
F10	DY	DY	0,225±0,014 ^{Aa}	0,191±0,109 ^{Aa}	0,080±0,011 ^{ABa}
F15	DY	DY	DY	0,150±0,106 ^{Aa}	0,026±0,001 ^{BCa}
F21	DY	DY	DY	DY	0,022±0,006 ^{BC}

Farklı büyük harfler aynı tarhana çeşidi içindeki farklılıkları ve farklı küçük harfler farklı çeşitler için örnek alma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (p<0.05). "DY" ile gösterilen günlerde, belirtilen tarhana çeşidinin fermantasyon süresi bittiği için örnek alınmamıştır.



Şekil 4.48. Tarhana çeşitlerinin fermantasyon süresi boyunca etanol içeriği değişimi.

4.6. Bütünleştirici Analizler: Sınıflandırma, Kümeleme ve Korelasyon Analizleri

Tarhana hamurlarına uygulanan metagenomik ve metabolomik analizler sonucunda elde edilen veriler, sınıflandırma, kümeleme ve korelasyon analizleri uygulanarak bütünleştirici yaklaşımlarla değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, sınıflandırma analizleri için temel bileşen analizi (PCA), kümeleme analizleri için ısı haritaları oluşturulmuş ve korelasyon analizleri uygulanmıştır.

4.6.1. Sınıflandırma Analizleri

Farklı tarhana çeşitlerinin fermantasyon süreçlerinde tespit edilen bakteriyel ve fungal OTU'lara cins seviyesinde sınıflandırma analizleri uygulanması sonucunda elde edilen PCA grafikleri Şekil 4.49 ve 4.50'de gösterilmiştir. Buna göre analizde 3 bileşen şu oranlarda tanımlanmıştır:

- Bakteriyel mikrobiyota için; PC1 %35,41, PC2 %25,11, PC3 %16,22 ve fungal mikrobiyota için PC1 %37,54, PC2 %21,68 ve PC3 %16,99 bulunmuştur.

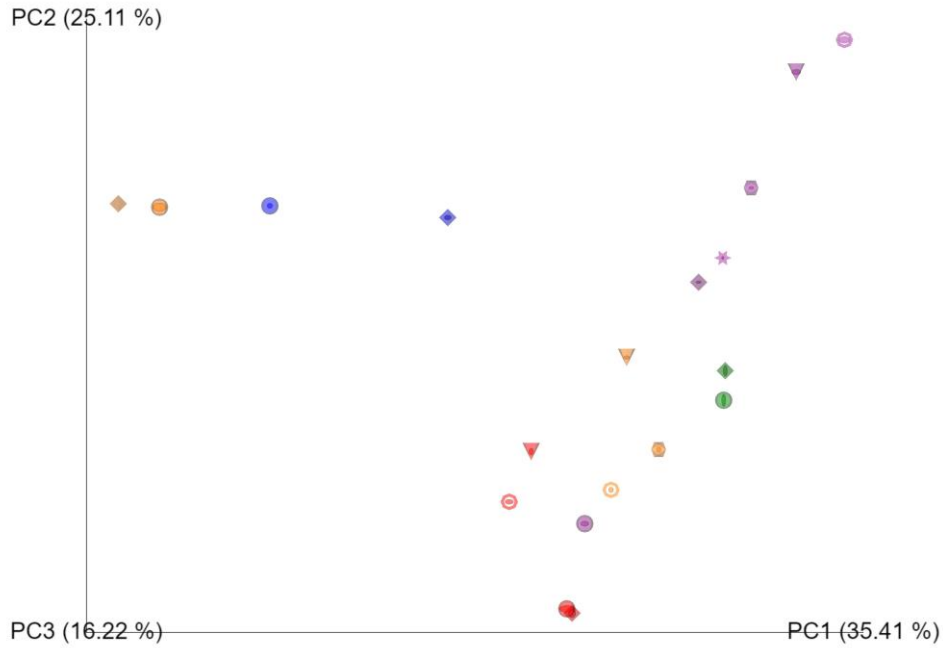
Bakteriyel mikrobiyota açısından incelendiğinde; Isparta F0 ve Kastamonu F0 örneklerinin birbirine yakın bir mesafe bulunduğu; ancak bu iki çeşide ait örneklerin F1’de farklı komponentlere yaklaştığı belirlenmiştir. Metagenomik analiz verileri incelendiğinde de, 24 saatlik fermantasyon sonucunda Kastamonu çeşidinin diğer tarhanalardan farklı bir mikrobiyota yapısı gösterirken Isparta tarhanasının, diğer çeşitlere yaklaştığı görülmektedir. Isparta ve Maraş çeşitlerinin formülasyonlarında buğday dövmesi kullanıldığından mikrobiyal yapılarının benzer olması beklenmiştir. Ancak bu iki tarhana çeşidinin farklı komponentlere yaklaştığı tespit edilmiştir. Bu durumun daha önceki çalışmalarda [201,229] da belirlendiği gibi, kullanılan tahıl unu tipi ve kalitesinin, ekşi hamurda doğal olarak LAB’ni belirleyerek fermantasyon sırasında gelişen mikrobiyal yapıyı belirlemesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Bursa F0 ve F1 örneklerinin mikrobiyotalarının benzerliği Şekil 4.49’da görülmektedir. Bununla birlikte fermantasyon sürecinin üçüncü gününde hamura sebzelerin ve baharatların eklenmesiye *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin bağıl varlıkları yükselmiş ve F7 ve F10 örneklerinde mikrobiyota yapısı değişim göstermiştir. Ayrıca, Bursa çeşidinin yoğurt içermemesi sebebiyle *Streptococcus* varlığı bakımından diğer örneklerden farklılığı komponentlere yansımıştır.

Kastamonu tarhanası F0 ve F1 örnekleri ikinci bileşene yakın olarak tespit edilmişken, formülasyonunun F7’de un eklenmesiyle hamur formuna dönüşmesi sonucu, F7, F10 ve F15 örneklerinde mikrobiyota diğer un tarhanalarına ait örneklerin (Bursa ve Uşak) komponentlerine yaklaşmaktadır. Uygulanan PCA analizi Kastamonu F7 örneği bakteriyel mikrobiyotasının Bursa F7, Bursa F10 ve Uşak F0 örnekleri komponentleri arasında olduğunu işaret etmektedir.

Uşak tarhanası çeşidinin başlangıç anındaki mikrobiyotası, fermantasyon sürecinin ilerlemesiyle birlikte *Lactobacillus* cinsi varlığındaki artış sebebiyle komponentler arasında belirgin farklılıklar göstermektedir. Fermantasyonun yedinci gününde mikrobiyotadaki değişim devam etmesine rağmen, Uşak tarhanası hamurunun F10’daki mikrobiyal yapısı F1 örneğinin komponentlerine yaklaşmaya başlamaktadır. Uşak çeşidinin fermantasyon başlangıcındaki mikrobiyotası, Bursa ve Kastamonu çeşitlerinin

fermantasyon süreçlerinin ilerleyen aşamaları ile yakın mesafede bulunmasına rağmen; süreç boyunca gelişen ve değişen mikrobiyal ilişkiler F1 ve F21 örneklerinin benzer yapılar göstermesine sebep olmuştur.



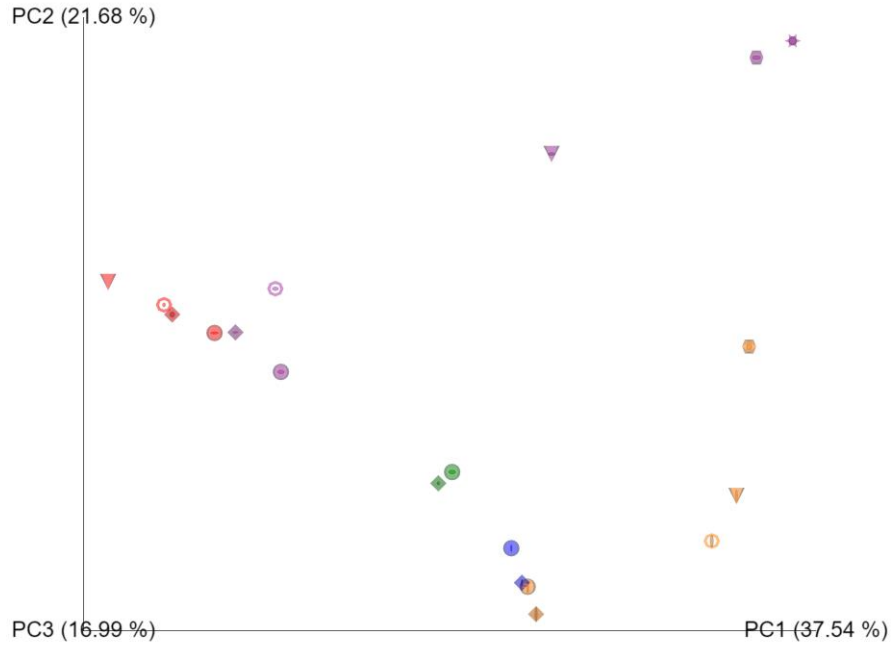
Şekil 4.49. Farklı tarhana çeşitlerinin bakteriyel OTU'larının fermentasyon sürecinde cins seviyesinde değişimi, küre:F0, karo:F1, halka:F7, koni:F10, yirmiyüzlü:F15, yıldız:F21; mavi:Isparta, yeşil:Maraş, kırmızı:Bursa, turuncu:Kastamonu, mor:Uşak.

Tarhana örneklerinde tespit edilen fungal mikrobiyotaların bakteriyel yapıdan daha dağınık bir yapı gösterdiği Şekil 4.50'de görülmektedir. Fermentasyonun 24 saatlik sürecinde Isparta tarhanasının fungal mikrobiyotasının aynı grup içinde kaldığı temel bileşenlere yansımıştır. Bunun yanında Maraş tarhanası F0 ve F1 örnekleri de ayrı bir grup oluşturarak 24 saatlik fermentasyon sürecinde birbirine yakın komponentlerde kalmıştır.

Isparta, Maraş ve Kastamonu çeşitlerinden belirgin şekilde farklılık gösteren Bursa tarhanasının mikrobiyotasında, formülasyona eklenen ekmek mayası nedeniyle *Saccharomyces* cinsi baskındır ve fungal mikrobiyota fermantasyon süreci boyunca yakın komponentlerde kalmıştır. Bunun yanında F1 ve F7 örneklerinde tespit edilen fungal OTU'lar F0 ve F10 örneklerine kıyasla birbirlerine daha yakındır. Çünkü, *Saccharomyces* bağıl varlığı fermantasyon boyunca artsa da; F1 ve F7 günleri arasında LAB sayısında bir artış gözlenirken *Saccharomyces* birikiminde bir azalma belirlenmiştir. Sonuç olarak bu eğilim LAB ve mayalar arasındaki etkileşim sonucu LAB'nin yarattığı asidik ortamın mayaların yayılımını arttırırken; mayaların da vitaminler ve çözünen azotlu bileşikler gibi besin öğeleri sağlayarak LAB gelişimini desteklemesinden kaynaklanmaktadır [195,196]. Dahası, Bursa tarhanasının diğer çeşitlere kıyasla daha geniş bir LAB çeşitliliğine sahip olması formülasyonda kullanılan ekmek mayasından kaynaklanabilir.

Kastamonu tarhanasının fungal yapısının Isparta F0 ve F1 örnekleri ile benzerlik gösterdiği PCA analizlerinde belirlenmiştir. Fermantasyonun yedinci gününe kadar yoğurt harcı formunda olan Kastamonu çeşidi ile Isparta tarhanası yalnızca bitkisel bileşenler açısından benzerlikler göstermektedir. Formülasyona un eklendikten sonra ise hamur ortamında *Issatchenkia* baskınlığı fungal yapıyı belirgin şekilde değiştirmiştir. Kastamonu çeşidine ait örneklerine ait komponentlerin fermantasyon boyunca farklılaştığı Şekil 4.50'de görülmektedir.

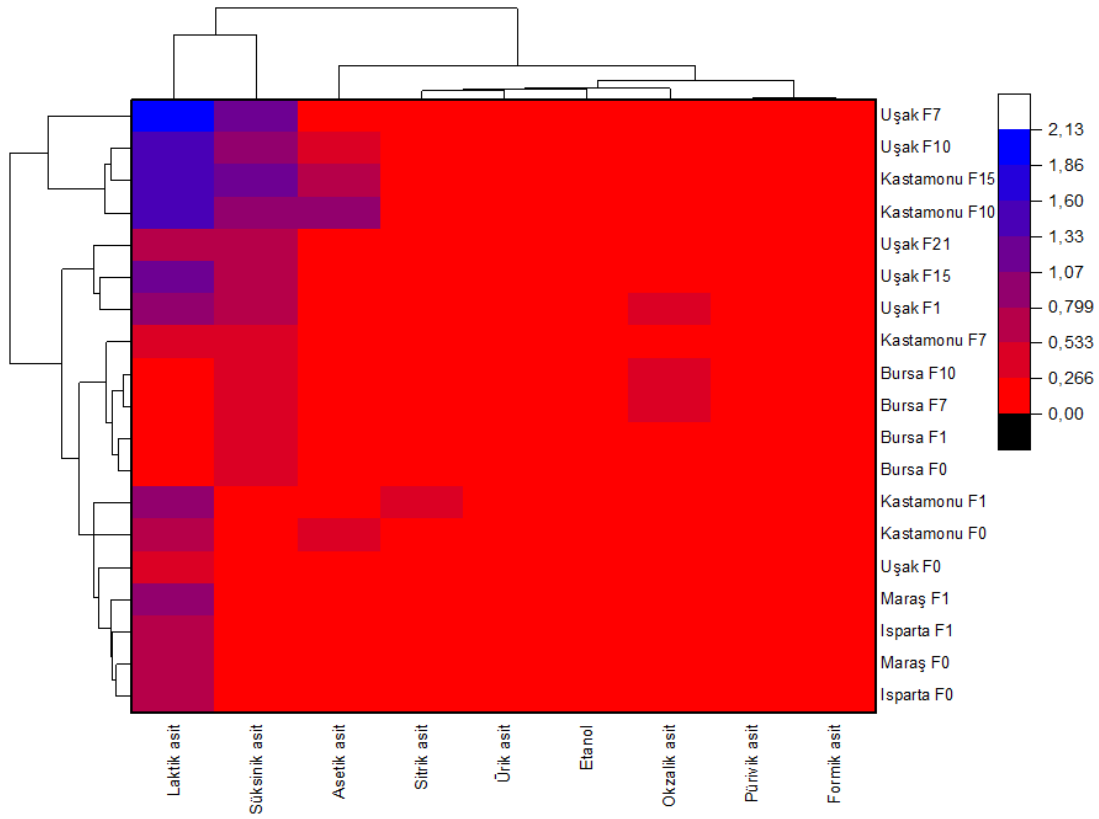
Fermantasyonun ilk 7 günü boyunca Uşak ve Bursa tarhanaları mikrobiyotaları *Saccharomyces* cinsi varlığı açısından benzerlikler göstermektedir. Onuncu günden itibaren ise *Issatchenkia* ve *Kazachstania* varlıklarında görülen belirgin artışlar sebebiyle mikrobiyota ve bunları yansıtan komponentler değişmeye başlamıştır. Bu 2 fungal cinsin baskınlığı Uşak tarhanası F10, F15, ve F21 örneklerinin diğer çeşitlerden ayrılmasına neden olmaktadır.



Şekil 4.50. Farklı tarhana çeşitlerinin fungal OTU'larının fermantasyon sürecinde cins seviyesinde değişimi, küre:F0, karo:F1, halka:F7, koni:F10, yirmiyüzlü:F15, yıldız:F21; mavi:Isparta, yeşil:Maraş, kırmızı:Bursa, turuncu:Kastamonu, mor:Uşak.

4.6.2. Kümeleme Analizleri

Tarhana örneklerinde tespit edilen metabolitlerin kümeleme analizleri sonuçları Şekil 4.51.'de gösterilmiştir. Tüm metabolitler arasında tarhana hamurlarında sırasıyla en yüksek miktarlarda laktik, süksinik ve asetik asitler bulunmuştur. Çalışılan 19 adet örnek 2 ana kümeye ayrılmıştır. Bu ana kümelerden ilki de 2 alt kümeden oluşmaktadır. Alt kümelerden ilkinin oluşturduğu Uşak F7 örneği en yüksek miktarda laktik ve süksinik asit içermektedir. İkinci alt kümede yer alan Uşak F10 ve Kastamonu F15 örnekleri de ayrı bir küme oluştururken; Kastamonu F10 örneği onlardan farklı bir kümede yer almıştır. İkinci alt kümede yer alan bu üç örnek görece olarak diğer örneklerden daha yüksek laktik asit içerirken; Uşak F7 örneğinden daha az laktik ve daha fazla asetik aside sahiptir. Ayrıca Kastamonu F10 örneğinin çalışılan tüm örneklerden daha fazla asetik asit içerdiği görülmektedir. De Vuyst [180], heterolaktik fermantasyonun önemli bir son ürünü olan asetik asidin, ekşi hamur aroması oluşumunda önemli bir yeri olduğunu belirtmiştir.



Şekil 4.51. Tarhana hamuru örneklerinin ısı haritası oluşturulması yöntemiyle elde edilen kümeleme analizi sonuçları.

Oluşan ana kümelerden ikincisi 2 alt kümeye ayrılmıştır. Bu alt kümelerden ilki Uşak F21, Uşak F15, Uşak F1 ve Kastamonu F7 örneklerini içermektedir. Bu kümede yer alan Uşak F15 ve F1 örnekleri, diğer örneklerle kıyasla daha fazla miktarda laktik asit içerirken; Uşak F1 örneği tespit edilen okzalik asit miktarı nedeniyle de diğer örneklerden ayrılmaktadır. Kalan örnekler ikinci alt kümenin içinde yer almakla birlikte bunlar da 2 ayrı kümeye ayrılmıştır. Bursa çeşidine ait örneklerin hepsi bir küme oluşturmuştur. Ayrıca Bursa tarhanası örnekleri diğer tüm örneklerden daha az miktarda laktik asit ve daha yüksek miktarda süksinik asit içermektedir. Bunun yanında Bursa F10 ve F7 örnekleri, başka bir kümede bulunan Uşak F1 örneğiyle benzer şekilde diğer örneklerden daha fazla miktarda okzalik asit içermektedir.

Oluşan son alt küme Kastamonu F1, Kastamonu F0, Uşak F0, Maraş F1, Isparta F1, Maraş F0 ve Isparta F0 örneklerinden oluşmaktadır. Bu örnekler bir üst kümede yer alan Bursa tarhanasından daha yüksek miktarda laktik asit içerirken, süksinik asit miktarları

diğer tüm örneklerden daha düşük ölçüde saptanmıştır. Bununla birlikte Kastamonu F0 örneğinin asetik asit ve Kastamonu F1 örneğinin sitrik asit içeriği bu alt kümede yer alan diğer tüm örneklerden daha fazladır.

4.6.3. Korelasyon Analizleri

Tarhana örneklerinin bakteriyel ve fungal mikrobiyotaları ile içerdikleri metabolik bileşenler arasındaki ilişkileri incelemek için korelasyon analizi uygulanmıştır (Şekil 4.52). Bu analiz sonucunda *Lactobacillus* cinsi ile sitrik asit oluşumu arasında güçlü negatif korelasyon bulunmuştur. Daha önceki bir çalışmada da tarhanada sitrik asit varlığının fermantasyon prosesi sonucu oluşmadığı, formülasyonda yer alan bileşenlerden kaynaklandığı bulunmuştur [230]. Diğer yandan *Lactobacillus* cinsinin laktik asit, süksinik asit ve pürivik asit metabolitleriyle ve *Streptococcus*, *Aureobasidium*, *Didymella*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces* ve *Pichia* cinsleri arasında pozitif korelasyonlar belirlenirken; *Filobasidium* ve *Mycosphaerella* cinsleri arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Ancak, bunlar dışında kalan metabolitler ve mikroorganizma cinsleri ile *Lactobacillus* cinsi arasında değişen ölçülerde negatif korelasyonlar vardır.

Isparta, Maraş ve Kastamonu çeşitlerinde en yüksek bağıl varlıkta tespit edilen bakteri cinslerinden olan *Streptococcus*'lar ile yalnızca *Kluyveromyces* cinsi arasında güçlü bir pozitif korelasyon saptanırken; *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Pantoea*, *Weissella*, *Candida*, *Hanseniaspora* ve *Saccharomyces* cinsleri arasında negatif korelasyonlar belirlenmiştir. Ayrıca süksinik, asetik, pürivik, formik, ve okzalik asitler, ve etanol ile de negatif korelasyonlar bulunmaktadır.

Bursa tarhanası çeşidinde en yüksek oranda tespit edilen bakteri cinsi olan *Pediococcus*'lar formik asit, okzalik asit ve etanol ile pozitif korelasyonlara sahiptir. *Pediococcus* cinsinin pozitif korelasyon gösterdiği mikroorganizma cinsleri de *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* ve daha az oranlarda olmak üzere *Issatchenkia*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pantoea* ve *Weissella* olmuştur. *Pediococcus* cinsinin diğer fungal türlerle ise zayıf negatif korelasyonlar gösterdiği belirlenmiştir.

Kastamonu çeşidinde yüksek oranda tespit edilen *Citrobacter* cinsi, *Buttiauxella*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Lactococcus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Stenotrophomonas* ve *Clavispora* cinsleri ile güçlü pozitif korelasyonlar göstermektedir. Buna karşın, okzalik asit ve *Saccharomyces* cinsi ile de negatif korelasyonlar tespit edilmiştir. Kastamonu tarhanasında yüksek bağıl varlıkta tespit edilen diğer bir cins olan *Enterococcus*'lar, *Citrobacter* cinsi ile pozitif korelasyon göstermektedir.

Isparta, Maraş ve Uşak çeşitlerinde yüksek bağıl varlıkta belirlenen *Kluyveromyces* cinsi mayalar tüm metabolitlerle ve bakteriyel cinslerin çoğu ile negatif korelasyon gösterirken; analiz edilen tüm parametreler içinde en güçlü pozitif korelasyonu *Streptococcus*'lar ile göstermiştir. Bursa ve Uşak çeşitlerinde yüksek miktarda tespit edilen *Saccharomyces* cinsi ise okzalik asit, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Pantoea*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Candida* ve *Hanseniaspora* cinsleri ile güçlü pozitif korelasyonlara sahiptir. *Saccharomyces* cinsi ile *Streptococcus* cinsi arasında güçlü negatif korelasyon görülmektedir.

Tarhana hamurlarında laktik ve süksinik asit oluşumu ve *Kazachstania* cinsi mayaların varlığı arasında güçlü pozitif korelasyonlar saptanmıştır. Bunun yanında laktik asit oluşumu ile asetik, pürivik ve ürik asitler, ve *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Raoultella*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Clavispora* cinsleri arasında pozitif korelasyonlar saptanmıştır. Ancak, sitrik asit ile *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Pantoea*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Alternaria*, *Candida* ve *Hanseniaspora* cinsleri arasında negatif korelasyonlar olduğu görülmüştür.

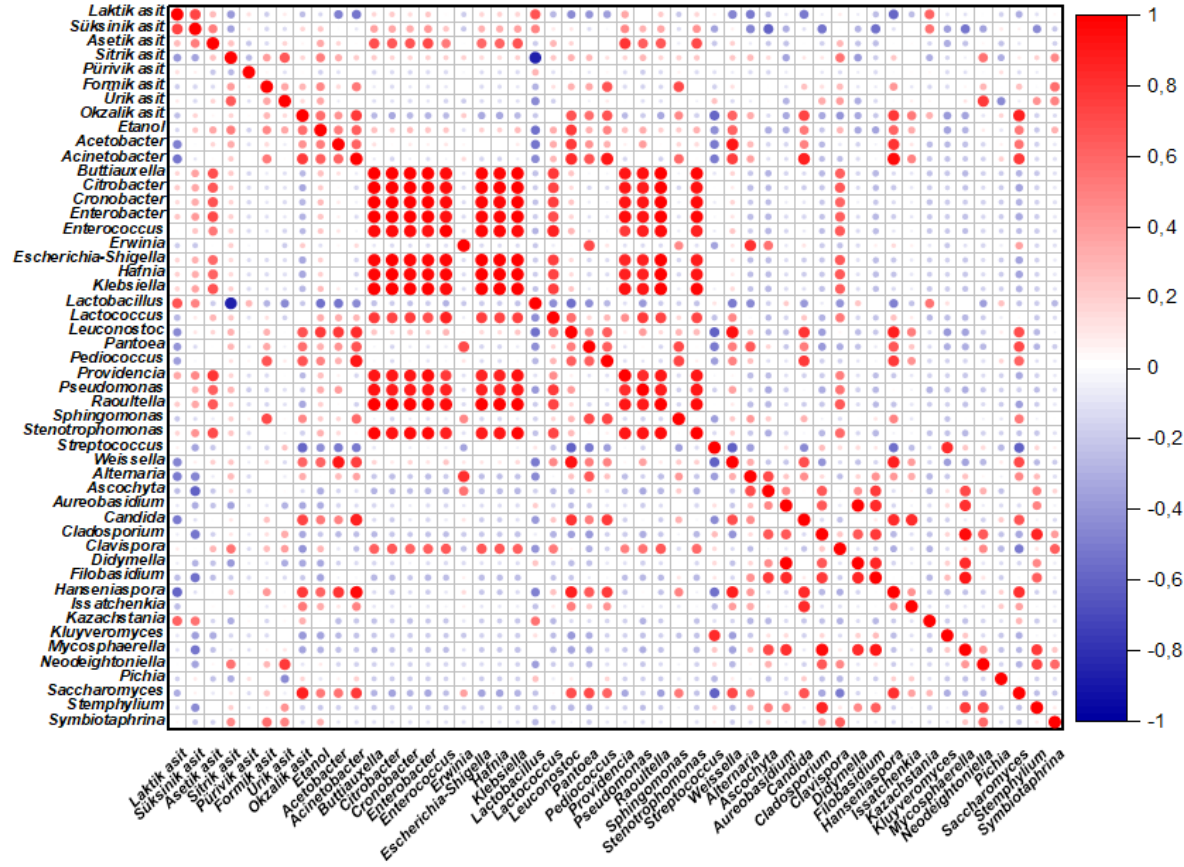
Örneklerde süksinik asit oluşumu ile laktik asit, asetik asit, *Lactobacillus*, *Providencia*, *Stenotrophomonas* ve *Kazachstania* cinsleri arasında pozitif korelasyonlar olduğu saptanmıştır. Negatif korelasyonlar incelendiğinde ise; sitrik asit, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Cladosporium*, *Filobasidium*, *Mycosphaerella* ve *Stemphylium* cinsleri ile ilişkiler saptanmıştır. Dahası, süksinik asit oluşumu bakteriyel türlerin varlığı arasında çoğunlukla pozitif korelasyonlar saptanırken; fungal türler tersi bir eğilim göstermiştir.

Tarhana hamurunda tespit edilen metabolitlerden olan asetik asitin, *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Raoultella* ve *Stenotrophomonas* cinsleri ile pozitif korelasyonlar gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşın, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Kluyveromyces*, *Mycosphaerella*, *Kazachstania*, *Pichia*, *Filobasidium*, *Didymella*, *Cladosporium*, *Ascochyta* ve *Aureobasidium* cinsleri ile asetik asit oluşumu arasında düşük düzeyde negatif korelasyonlar belirlenmiştir.

Çalışılan örneklerde tespit edilen sitrik asit; ürik asit ve etanol metabolitleri ve *Cladosporium*, *Neodeighthoniella* ve *Symbiotaphrina* cinsleri pozitif korelasyonlar göstermektedir. Pirüvik asit varlığı da mikrobiyotanın birçok üyesi ile negatif korelasyonlara sahipken; *Pichia* cinsi mayalar ile pozitif korelasyona sahiptir. Formik asit ise etanol ve *Acinetobacter*, *Pediococcus*, *Sphingomonas* ve *Symbiotaphrina* cinsleri ile pozitif korelasyonlar göstermektedir. Ürik asit metabolitinin de *Neodeighthoniella* cinsi ile güçlü bir pozitif korelasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, ürik asit oluşumu *Lactobacillus* varlığı arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir.

Okzalik asit; etanol ve *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Pantoe*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Candida*, *Hanseniaspora* ve *Saccharomyces* cinsleri ile pozitif korelasyonları saptanmıştır. Buna karşın, okzalik asit ile *Streptococcus* cinsi arasında belirgin bir negatif korelasyon saptanmıştır.

Etanol oluşumu ile pozitif korelasyona sahip olan mikroorganizma cinsleri *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Candida*, *Hanseniaspora* ve *Saccharomyces* olarak belirlenmiştir. Etanol ile belirgin negatif korelasyonlar ise *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Kluyveromyces* cinsleri arasında bulunmuştur.



Şekil 4.52. Tarhana hamuru örneklerinin korelasyon analizi sonucu elde edilen pozitif ve negatif yönlü ilişkiler; beyazdan kırmızıya doğru pozitif yönlü artan ve beyazdan maviye doğru negatif yönlü artan korelasyonlar.

Ekşi hamur ortamında LAB ile mayalar arasındaki besleyici ilişkiler antagonistik bir etkileşimden sorumludur [231]. Bu iki popülasyon arasındaki istikrarlı ilişkiler besin rekabeti eksikliğinden kaynaklanmaktadır [231]. Ekşi hamur mikrobiyotası ile ilişkili yapılan daha önceki çalışmalar [55,85,232,233], ekşi hamur tipine, hammaddeye, orijin ülkeye, fermantasyon sıcaklığı ve süresine göre mikrobiyota üyelerinin, bu üyelerin birbirleriyle etkileşimlerinin ve son üründe oluşan metabolitlerin farklı olduğunu ortaya koymuşlardır. Ekşi hamur ve benzeri ekosistemlerde sıcaklık, pH, redoks potansiyeli, iyonik güç, hamur verimi, laktat, asetat, karbondioksit, etanol gibi mikrobiyal ürünler, tahıl fraksiyonu ve, endojen ve mikrobiyal enzimatik reaksiyonlar gibi ekolojik faktörlerin mikroorganizmaların gelişme oranı ve verimlerini etkilediği tespit edilmiştir [180]. Bu çalışmanın sonuçları da tarhana mikrobiyotasının geleneksel reçeteden etkilendiğini belirlemiştir.

5. YORUM

Gıda fermantasyonları tahıllar, meyveler, sebzeler, et, süt ve balık gibi dayanıksız gıda materyallerinin muhafazası amacıyla yüzyıllardır kullanılmaktadır. Günümüzde fermantasyonda görev alan laktik asit bakterileri ve mayaların, ve bunların metabolitlerinin sağlık üzerine etkilerinin anlaşılmasıyla geleneksel fermente ürünlerin tüketimine olan ilgi artmaktadır. Sağlığı teşvik eden fermente gıdalar hakkında bilimsel gelişmeler ışığında yeni fırsatlar ortaya çıkmaktadır.

Diğer geleneksel fermente gıdalar gibi, önemli bir geleneksel Türk fermente ürünü olan tarhananın formülasyonu ve fermantasyon prosesi de uzun fermantasyon tarihinin bir sonucudur. Laktik asit bakterileri ve maya fermantasyonlarının birlikte gerçekleştiği tarhana hamuru fermantasyonu, proses sırasında bu iki grup mikroorganizma arasında gerçekleşen karmaşık ilişkiler açısından önemlidir. Yürütülen bu proje ile farklı geleneksel tarhana çeşitlerinin karakterizasyonu kimyasal, klasik mikrobiyolojik, kültüromik, metagenomik ve metabolomik analizlerle gerçekleştirilirken; fermantasyon sürecinin araştırma konusu olan tarhana çeşitleri için etkileri de incelenmiştir.

Proje kapsamında Isparta, Kahramanmaraş, Bursa, Kastamonu ve Uşak illerine ait geleneksel reçetelerle, ilgili illerden temin edilen hammaddeler kullanılarak laboratuvar koşullarında tarhana hamurları hazırlanmış ve fermantasyon süreçleri her tarhana çeşidi için ayrı ayrı takip edilmiştir. Proje kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıdaki gibidir:

- a) Kimyasal analizler kapsamında pH, asitlik tayini, yağ, protein, kül ve kuru madde miktarı analizleri gerçekleştirilmiştir. Uygulanan pH ve % toplam asitlik analizleri sonuçlarına göre hem pH hemde % toplam asitliğin tarhana çeşitliliğine bağlı olarak önemli farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında ise bu farklılıkların, çeşide bağlı olmak üzere, tutarlı olduğu görülmüştür. AB coğrafi işaret tescili Maraş tarhanası temel veri seti incelendiğinde pH ve asitlik değerleri ürün tanımlaması için önem arz etmektedir. Bu durumda diğer tarhana çeşitleri için de ürün karakterizasyonu amacıyla bu çalışmada elde edilen veriler dikkate alınabilir.

- b) Klasik kültürel yöntemler kullanılarak çalışmaya konu tarhana örnekleri arasında en yüksek laktobasil sayısı fermantasyon süresinin hem başlangıcı ve hem de sonunda Isparta tarhanasında tespit edilmiştir. Ayrıca toplam maya-küf sayımlarına göre en yüksek fungal yük fermantasyon başlangıcında Bursa çeşidinde tespit edilirken, fermantasyon sonunda Isparta tarhanasında belirlenmiştir.
- c) Tarhana hamurlarından klasik kültürel yöntemler ile izole edilen 513 adet farklı mikroorganizma suşunun 199 adedi örneklerdeki suşları veya türleri kapsamlı bir şekilde tanımlamayı amaçlayan yüksek verimli bir teknik olan MALDI TOF MS kullanılarak tanımlanmıştır. Burada elde edilen tanımlama doğruluk skorunun %75.0 ve %99.9 aralığında olduğu belirlenmiştir. MALDI TOF MS cihaz yazılımı veri tabanında tanımlı bulunan LAB çeşitliliğinin sınırlı olması yaklaşık 300 adet mikroorganizma suşunun tanımlanamamasına yol açmıştır. Kültüromik yaklaşımının, mikroorganizmaların tanımlanması için yalnızca proteine dayalı tanımlama yöntemleri ile değil aynı zamanda DNA ve/veya RNA'ya dayalı yöntemlerle de desteklenmesi gerektiği bilinmektedir. Proteine dayalı kültüromik yaklaşım ile tanımlanabilen 199 izolat içinde tüm tarhana çeşitlerinde en yüksek miktarda tespit edilen tür %63,87 oranıyla *Lactiplantibacillus plantarum* olmuştur. *Lactiplantibacillus plantarum* dışındaki LAB çeşitliliğine tarhana türlerine bağlı olarak bakıldığında *Lactobacillus delbrueckii* suşları yalnızca Maraş çeşidinde tespit edilmişken, *Levilactobacillus brevis* türü Maraş, Kastamonu ve Uşak tarhanalarında bulunmuştur. Ayrıca Maraş tarhanası F1 örneğinde *Lactobacillus helveticus* ve Uşak tarhanası F21 örneğinde *Lacticaseibacillus rhamnosus* tespit edilmiştir. Çalışmada, tanımlanabilen bakteriyel ve fungal türlere ait stok kültürler Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Süt Ürünleri Gen Bankası'nda muhafaza edilmektedir.
- d) Bu çalışmada ayrıca metagenomik analizler gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlara göre Illumina MiSeq platformunda yapılan dizileme analizleri sonunda ortalama 71,853 okuma/örnek 16S rRNA taksonomik analizlerde

kullanılmış %97 benzerlik oranına dayanarak 188 adet OTU tespit edilmiştir. 18S rRNA dizileme çalışmaları sırasında ise ortalama 147,073 okuma/örnek kullanılarak %97 benzerlik oranına dayanarak 62 OTU tespit edilmiştir. Alfa çeşitlilik değerlendirmelerine göre hem bakteriyel hem fungal mikrobiyota açısından Kastamonu F10 örneği en yüksek Shannon indeksine sahiptir. Oluşturulan seyrekleştirme eğrilerinin platoya ulaşması ve doyumluğa yakın bir noktada olması örnekleme derinliğinin tüm bakteriyel ve fungal komünitelerin yeterli düzeyde yansıttığını göstermektedir. Ancak yine de daha fazla dizileme yapılmasıyla az miktarda başka türler de tespit edilme ihtimali bulunmaktadır. Oluşturulan OTU'lara >%60 eşik değeri temel alınarak yapılan taksonomik atamalar sonucunda bakteriyel metagenomun %38 kloroplast, %26 Proteobacteria ve %35 oranında Lactobacillales'den oluştuğu belirlenmiştir. Fungal tanımlamalar sonucunda ise metagenomda %20 oranında Plantae ve %80 oranında Fungi geni bulunduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde Bursa tarhanasında diğer tarhana çeşitlerine kıyasla daha geniş bir LAB çeşitliliği olduğu görülmüştür.

- e) Uşak tarhanası fermantasyonunda örnek alınan tüm günlerde *Lactobacillus* cinsi baskın olarak tespit edilmiş ve F21'de bağıl varlığı %94 olmuştur. Fermantasyon sonunda *Levilactobacillus namurensis*, *Levilactobacillus zymae*, *Limosilactobacillus pontis*, *Companilactobacillus paralimentarius*, *Lentilactobacillus kisonensis*, *Limosilactobacillus panis* ve *Lactiplantibacillus plantarum* belirlenmiştir. Fungal mikrobiyotada ise F0'da *Saccharomyces* baskın cinsi oluştururken; fermantasyon sonunda %2,12 *Kazachstania* ve %93,4 *Issatchenkia* tespit edilmiştir.
- f) Bazı tarhana hamurlarında fermantasyon sonunda patojen özellik gösteren *Pantoea* ve *Raoutella* cinsi bakteriler %1 bağıl varlıktan az olmak üzere tespit edilmiştir. Ancak hem bu mikroorganizmaların düşük bağıl varlıkta tespit edilmeleri, hem de ilgili besiyerlerine yapılan klasik mikrobiyolojik ekimler sonucu patojen bakterilerin tespit edilmemesi sebepleriyle yaş tarhananın fermantasyondan sonraki ilk 7 gün içinde tüketilmemesini tavsiye eden daha önceki çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir.

- g) Tarhana hamurunda bulunan fungal türlerin çeşitliliğinin ve miktarlarının geleneksel formülasyona ve fermentasyon süresine göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir.
- h) Çalışmada metabolomik analizler kapsamında bazı organik asitler ve etanol miktarları tayin edilmiştir. Kastamonu tarhanası hem fermentasyon başlangıcında hem de sonunda en yüksek laktik asit içeriğine sahiptir. Hamur formülasyonunda yoğurt yerine süt kullanılması sebebiyle Bursa tarhanasının laktik asit içeriği fermentasyon boyunca diğer çeşitlerden daha düşüktür. Bunun yanında *Lactiplantibacillus plantarum* varlığının Bursa çeşidinde F7’de yükselmesiyle birlikte, hamurun laktik asit içeriğinin arttığı belirlenmiştir. Etanol içeriği hem fermentasyon başlangıcında hem de sonunda en yüksek olan çeşit Bursa tarhanasıdır. Bu durumun formülasyonda ekmek mayası kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- i) Çalışmada gerçekleştirilen bütünleştirici analizler sonucunda ise öncelikle sınıflandırma analizlerine göre Bursa çeşidinin yoğurt içermemesi sebebiyle *Streptococcus* varlığı bakımından diğer örneklerden farklı olduğu temel bileşenlere yansımıştır. Yine sınıflandırma analizlerine göre fermentasyonun ilk 7 günü boyunca Uşak tarhanası ve Bursa tarhanası mikrobiyotaları *Saccharomyces* cinsi varlığı açısından benzerlikler göstermektedir. Tarhana çeşitlerinin metabolomik bileşenlerinin kümelenme analizlerine göre tüm bileşenler arasında laktik, süksinik ve asetik asitler sırasıyla en yüksek miktarlarda bulunurken; çalışılan 19 adet örnek 2 ana kümeye ayrılmıştır. Korelasyon analizlerine göre ise *Lactobacillus* cinsi ile sitrik asit oluşumu arasında güçlü negatif korelasyon bulunmuştur. Isparta, Maraş ve Kastamonu çeşitlerinde en yüksek bağıl varlıkta tespit edilen bakteri cinslerinden olan *Streptococcus*’lar ile yalnızca *Kluyveromyces* cinsi arasında güçlü bir pozitif korelasyon saptanmıştır. Bursa tarhanası çeşidinde en yüksek oranda tespit edilen bakteri cinsi olan *Pediococcus*’lar formik asit, okzalik asit ve etanol ile pozitif korelasyonlara sahiptir. Etanol oluşumu ile belirgin negatif korelasyonlar ise *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Kluyveromyces* cinsleri arasında bulunmuştur.

- j) Bu tez çalışması kapsamında geleneksel tariflerde yer alan malzemeler ilgili illerden temin edilerek Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bursa laboratuvarlarına ulaştırılmış ve tarhana üretimleri laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları orijinal geleneksel ürün özelliklerinin yansıtıldığını göstermektedir. Bu durum geleneksel tarfin ait olduğu ilden temin edilen ürünler kullanıldığında üretim başka bölgelerde de yapılırsa geleneksel ürünün hazırlanabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma ile geleneksel fermente bir gıda olan tarhananın omik teknolojiler kullanılarak karakterizasyonu için yöresel malzemeler kullanılarak farklı tarhana çeşitleri üretilmiş ve fermantasyon süreci izlenmiştir. Bu fermantasyon sürecinin izlenmesi için uygulanan kimyasal analizler yanında kültüromik, metagenomik ve metabolomik yaklaşımlardan yararlanılmıştır. Çeşitli moleküler araçlar ve omik yaklaşımların bütüncül şekilde geleneksel bir ürünün araştırılmasında kullanılmasıyla her tarhana çeşidi için kendine özgü parmak izi oluşturabilecek ve fermantasyon sürecini kimyasal, mikrobiyolojik ve metabolik açıdan tanımlayan veriler elde edilmiştir. Bu verilere göre sağlığa yararlı olduğu önceden bilinen mikroorganizmaların metabolik süreçlerinden elde edilen organik asitler gibi biyoaktif maddeleri içeren tarhana örneklerinin postbiyotik olarak tanımlanması için olanak vardır. Geleneksel fermente bir ürünümüz olan tarhana çeşitlerinin tamamı için postbiyotik tanımını destekleyen ve sağlık etkisinin mekanizmalarını araştıran kapsamlı çalışmalar yapılması gereklidir.

Geleneksel fermente gıdalar, Türkiye’de tüketicilerin sosyo-ekonomik büyümesi, gıda güvenliği, beslenmesi ve postbiyotik özellikleri nedeniyle sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca geleneksel fermantasyon süreçleri, gıdanın korunması, raf ömrünün uzatılması ve gıda ürünlerindeki besin değerlerinin artırılması için bir araç sağlamaktadır. Herhangi bir fermente gıdada olduğu gibi, farklı tarhana çeşitlerine ait kimyasal özellikler, mikrobiyota, metabolik profilin ortaya çıkarılması ve karşılaştırmalı analizleri büyük önem arz eder. Gelecek çalışmalar ile fermente gıdaların özellikleri ve bu gıdaların ve insan sağlığı geliştirme potansiyeline katkısının araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] E. Caplice, G.F. Fitzgerald, *International Journal of Food Microbiology*, 50 (1999) 131–149.
- [2] A. Blandino, M.E. Al-Aseeri, S.S. Pandiella, D. Cantero, C. Webb, *Food Research International*, 36 (2003) 527–543.
- [3] O. Dağlıoğlu, *Nahrung/Food*, 44 (2000) 85–88.
- [4] A. Temiz, T. Pirkul, *Gida*, 15 (1990) 119–126.
- [5] J. Lv, C. Li, S. Li, H. Liang, C. Ji, B. Zhu, X. Lin, *Lwt*, 114 (2019) 108391.
- [6] T. Bharucha, C. Oeser, F. Balloux, J.R. Brown, E.C. Carbo, A. Charlett, C.Y. Chiu, E.C.J. Claas, M.C. de Goffau, J.J.C. de Vries, M. Eloit, S. Hopkins, J.F. Huggett, D. MacCannell, S. Morfopoulou, A. Nath, D.M. O’Sullivan, L.B. Reoma, L.P. Shaw, I. Sidorov, P.J. Simner, L. Van Tan, E.C. Thomson, L. van Dorp, M.R. Wilson, J. Breuer, N. Field, *Lancet Infectious Disease*, 20 (2020) e251–e260.
- [7] A. Escobar-Zepeda, A. Sanchez-Flores, M. Quirasco Baruch, *Food Microbiology*, 57 (2016) 116–127.
- [8] G. Kergourlay, B. Taminiau, G. Daube, M.-C. Champomier Vergès, *International Journal of Food Microbiology*, 213 (2015) 31–39.
- [9] A. Ceugniez, B. Taminiau, F. Coucheney, P. Jacques, V. Delcenserie, G. Daube, D. Drider, *International Journal of Food Microbiology*, 258 (2017) 89–93.
- [10] M. Erbaş, M. Kemal Uslu, M. Ozgun Erbaş, M. Certel, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (2006) 294–301.
- [11] J. Adebo, C. Chinma, A. Omoyajowo, P. Njobeh, *Metabolomics and its application in fermented foods. Indigenous Fermented Foods for the Tropics*, O.A. Adebo, C.E. Chinma, A.O. Obadina, A. G. Soares, S.K. Panda, R. Gan (Eds), Academic Press, 361–376, 2023.
- [12] N.S. Terefe, *Food Fermentation. Reference Module in Food Fermentation*, Elsevier, 2016.
- [13] H. Tangüler, *Turkish Journal of Agriculture*, 2 (2014) 144–149.
- [14] W.P. Hammes, M.J. Brandt, K.L. Francis, J. Rosenheim, M.F.H. Seitter, S.A. Vogelmann, *Trends in Food Science & Technology*, 16 (2005) 4–11.
- [15] P. Petrova, *Nutrients*, 12 (2020) 1–26.
- [16] Ö. Şimşek, S. Özel, A.H. Çon, *Food Science and Biotechnology*, 26 (2017) 181–187.
- [17] Y.C. O’Callaghan, A. V. Shevade, T.P. Guinee, T.P. O’Connor, N.M. O’Brien, *Food Chemistry*, 278 (2019) 110–118.
- [18] B. Kabak, A.D.W. Dobson, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51

- (2011) 248–260.
- [19] C. Chaves-López, C. Rossi, F. Maggio, A. Paparella, A. Serio, *Fermentation*, 6 (2020) 36.
- [20] E. Osorio Cadavid, C. Chaveslopez, R. Tofalo, A. Paparella, G. Suzzi, *Food Microbiology*, 25 (2008) 771–777.
- [21] N. Özdemir, G. Yazıcı, Ö. Şimşek, S.G. Özkal, A.H. Çon, *Food Bioscience*, 26 (2018) 30–37.
- [22] I. Çelik, F. Işık, O. Simsek, O. Gursoy, *Czech Journal of Food Sciences*, 23 (2005) 190–195.
- [23] TSE, Tarhana Standardı, TS2282, Türkiye, 2004.
- [24] C. Fatma, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9 (2014) 69–79.
- [25] D. Göçmen, O. Gürbüz, I. Şahin, *GIDA* 28 (2003) 13–18.
- [26] M. Magala, Z. Kohajdová, J. Karovičová, *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 12 (2013) 295–302.
- [27] I.Y. Sengun, D.S. Nielsen, M. Karapinar, M. Jakobsen, *International Journal of Food Microbiology*, 135 (2009) 105–111.
- [28] M.F. Ertugay, M. Certel, A. Gurses, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (2000) 2001–2004.
- [29] A. Soyuçok, M.N. Zafer Yurt, O. Altunbas, V.C. Ozalp, M. Sudagidan, *Food Bioscience*, 39 (2021) 100824.
- [30] E. Köse, Ö.S. Çağindi, *International Journal of Food Science and Technology*, 37 (2002) 219–222.
- [31] M. Köten, A.M. Karahan, L.E. Karahan, M.M. Yazman, *Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi*, 4 (2019) 120–129.
- [32] S. Ozdemir, D. Gocmen, A.Y. Kumral, *Food Reviews International*, 23 (2007) 107–121.
- [33] B. Siyamoğlu, *Türk Tarhanalarının Yapılışı ve Terkibi Üzerine Araştırma*, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Bornova, 1961.
- [34] F. Coşkun, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, (2002).
- [35] A.F. Koca, F. Yazici, M. Anil, *European Food Research and Technology*, 215 (2002) 293–297.
- [36] M. Erbaş, M. Certel, M. Kemal Uslu, *Lwt*, 38 (2005) 409–416.
- [37] I.Y. Sengun, D.S. Nielsen, M. Karapinar, M. Jakobsen, *International Journal of Food Microbiology*, 135 (2009) 105–111.
- [38] H. Soyuyiğit, *Isparta ve Yöresinde Üretilen Ev Yapımı Tarhanaların Mikrobiyolojik ve Teknolojik Özellikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, **2004**.

- [39] M. KAYA, Y. Seçim, Journal of Social and Humanities Sciences Research, 7 (2020) 1618–1628.
- [40] Kahramanmaraş Ticaret Borsası, Mahreç İşareti Maraş Tarhanası, No. 154, Kahramanmaraş, **2012**.
- [41] T. Yörükoğlu, K. Sinan DAYISOYLU, Atatürk University, Journal of Agricultural Faculty, 47 (2016) 53–63.
- [42] European Commission, Maraş Tarhanası, Publication of an application for registration of a name pursuant to Article 50(2)(a) of Regulation (EU) No 1151/2012 of the European Parliament and of the Council on quality schemes for agricultural products and foodstuffs, PGI-TR-02611, **2023**.
- [43] S. Avşar, Maraş Tarhanasında Ağır Metal, Uçucu Bileşen Ve Mikroorganizmaların Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2020**.
- [44] A. Temiz, Kültür Mirasımız Tarhana, 1. Baskı, T.C. Kültür Bakanlığı, İstanbul, **2020**.
- [45] M. Hendek Ertop, Z.G. Cerit, R. Atasoy, Food Science and Quality Management, 83 (2019) 61–67.
- [46] N. İÇLİ, Sağlık Akademisi Kastamonu, 3 (2017) 171–184.
- [47] N. Özdemir, L. Betül ALKAN, Ahmet Hilmi ÇON, Alınteri, 23 (2012)35-40.
- [48] Türk Patent ve Marka Kurumu, Uşak Tarhanası Menşe Adı, No. 209, **2015**.
- [49] O. Ponomarova, N. Gabrielli, D.C. Sévin, M. Mülleder, K. Zirngibl, K. Bulyha, S. Andrejev, E. Kafkia, A. Typas, U. Sauer, M. Ralsler, K.R. Patil, Cell Systems, 5 (2017) 345-357.
- [50] L. Settanni, H. Tanguler, G. Moschetti, S. Reale, V. Gargano, H. Erten, Food Microbiology, 28 (2011) 1367–1373.
- [51] E. Güney Funda, Ülkemizde Tüketilen Tarhanaların Mikrobiyolojik ve Bazı Kimyasal Özelliklerinin Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2009**.
- [52] M. Kıvanç, E.G. Funda, Food Science and Technology, 37 (2017) 269–274.
- [53] E.S. Lazos, G. Aggelousis, M. Bratakos, Plant Foods for Human Nutrition, 44 (1993) 45-62.
- [54] F. Tabatabaei-Yazdi, B. Alizadeh-Behbahani, M. Mohebbi, A. Mortazavi, A. Ghaitaranpour, Science Journal of Microbiology, 135 (2012) 152–159.
- [55] L. De Vuyst, S. Van Kerrebroeck, H. Harth, G. Huys, H.-M. Daniel, S. Weckx, Food Microbiology, 37 (2013) 11-29.
- [56] A. Corsetti, P. Lavermicocca, M. Morea, F. Baruzzi, N. Tosti, M. Gobbetti,

- International Journal of Food Microbiology, 64 (2001) 95–104.
- [57] von A. Wright, L. Axelsson, Lactic Acid Bacteria An Introduction. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, G. Vinderola, A. Ouwehand, S. Salminen, von A. Wright (Eds.), 5th ed., Taylor and Francis Group, CRC Press, **2019**.
- [58] K.H. Schleifer, W. Ludwig, Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria, B.J.B. Wood, W. Holzapfel (Eds.), Springer New York, New York, **1999**.
- [59] L. Axelsson, Lactic acid bacteria: Classification and physiology. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, S. Salminen, von A. Wright, A. Ouwehand (Eds.), Marcel Dekker, New York, **2004**.
- [60] F. Leroy, L. De Vuyst, Trends Food Science and Technology, 15 (2004) 67–78.
- [61] A. Corsetti, L. Settanni, Food Residuals International, 40 (2007) 539–558.
- [62] M. Doman-Pytka, P. Renault, J. Bardowski, Lait, 84 (2004), 33–37.
- [63] R. Holland, W. Crow, B. Curry, Lactic acid bacteria. Encyclopedia of Dairy Sciences, J. Fuquay (Ed.), Elsevier, **2011**.
- [64] A. Issa, R. Tahergorabi, Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract: Microbial Composition of Milk. Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases, R. Watson, V. Preedy (Eds.), Academic Press, **2019**.
- [65] H. König, J. Fröhlich, Lactic acid bacteria. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, H. König, G. Uden, J. Fröhlich (Eds.), Springer Berlin Heidelberg, **2009**.
- [66] M.G. Gänzle, Current Opinions in Food Science, 2 (2015) 106–117.
- [67] W.H. Holzapfel, B.J.B. Wood, Lactic acid bacteria in contemporary perspective. The Genera of Lactic Acid Bacteria, W. H. Holzapfel, B. J. B. Wood (Eds), Springer, Boston, **1995**.
- [68] C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. The Yeasts, C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout (Eds), Elsevier B.V., **2011**.
- [69] J. R. Dickinson, A. L. Kruckeberg, Carbohydrate metabolism. Yeasts in Food and Beverages, A. Querol, G. Fleet (Eds.), Springer Berlin Heidelberg, **2011**.
- [70] C. Flores, T. Petit, C. Gancedo, C. Rodr, FEMS Microbiology Reviews, 24 (2000) 507–529.
- [71] R.H. Deken, Microbiology, (1966) 149–156.
- [72] A. Merico, P. Sulo, J. Piškur, C. Compagno, The FEBS Journal, 274 (2007) 976–989.
- [73] L.H. Stuckland, Biochemistry Journal, 64 (1956) 515–523.

- [74] M.R. Wijsman, J.P. van Dijken, B.H.A. van Kleeff, W.A. Scheffers, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 50 (1984) 183–192.
- [75] R.A. Weusthuis, W. Visser, J.T. Pronk, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken, *Microbiology*, 140 (1994) 703–715.
- [76] C. Larsson, L. Gustafsson, *Archives of Microbiology*, 147 (1987) 358–363.
- [77] J.T. Pronk, H.Y. Steensma, J.P. Van Dijken, *Yeast*, 12 (1996).
- [78] A.P. Lin, M.T. McCammon, L. McAlister-Henn, *Biochemistry*, 40 (2001) 14291–14301.
- [79] E. Walker, D.L. Val, M. Rohde, J.C. Wallace, J. Devenish, *Biochemical and Biophysical Research Communities*, 176 (1991) 1210–1217.
- [80] F. Palmieri, A. Estoppey, G.L. House, A. Lohberger, S. Bindschedler, P.S.G. Chain, P. Junier, *Advances in Applied Microbiology*, 106 (2019) 49–47.
- [81] J.A. Barnett, K.D. Entian, *Yeast*, 22 (2005) 835–894.
- [82] M.M. Lane, N. Burke, R. Karreman, K.H. Wolfe, C.P. O’Byrne, J.P. Morrissey, *Antonie van Leeuwenhoek*, 100 (2011) 507–519.
- [83] B. Viljoen, *Yeast ecological interactions. Yeast'yeast, yeast'bacteria, yeast'fungi interactions and yeasts as biocontrol agents*, A. Querol, G. Fleet (Eds.), *Yeasts Food Beverages*, Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [84] C. Kennes, H.C. Dubourguier, G. Albagnac, H. Naveau, M. Veiga, E.J. Nyns, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35 (1991) 369–372.
- [85] M. Gobbetti, A. Corsetti, J. Rossi, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11 (1995) 625–630.
- [86] A.M. Omemu, O.B. Oyewole, M.O. Bankole, *Food Microbiology*, 24 (2007) 571–576.
- [87] I.A. Akinrele, *Journal of the Science of Food Agriculture*, 21 (1970) 619–625.
- [88] M.J.R. Nout, F.M. Rombouts, A. Havelaar, *International Journal of Food Microbiology*, 8 (1989) 351–361.
- [89] N.T.L. Doan, K. Van Hoorde, M. Cnockaert, E. De Brandt, M. Aerts, B. Le Thanh, P. Vandamme, *Letters in Applied Microbiology*, 55 (2012) 265–273.
- [90] M. Nacef, M. Chevalier, S. Chollet, D. Drider, C. Flahaut, *International Journal of Food Microbiology*, 247 (2017) 2–8.
- [91] M. Pavlovic, I. Huber, R. Konrad, U. Busch, *Open Microbiology Journal*, 7 (2013) 135–141.
- [92] E. Carbonnelle, C. Mesquita, E. Bille, N. Day, B. Dauphin, J.L. Beretti, A. Ferroni, L. Gutmann, X. Nassif, *Clinical Biochemistry*, 44 (2011) 104–109.
- [93] A. Freiwald, S. Sauer, *Nature Protocols*, 4 (2009) 732–742.

- [94] M. Dušková, O. Šedo, K. Kšicová, Z. Zdráhal, R. Karpíšková, *International Journal of Food Microbiology*, 159 (2012) 107–114.
- [95] S.R. Vartoukian, R.M. Palmer, W.G. Wade, *FEMS Microbiology Letters*, 309 (2010) 1–7.
- [96] J. Handelsman, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (2005) 195–195.
- [97] T. Thomas, J. Gilbert, F. Meyer, *The Role of Bioinformatics in Agriculture*, (2014) 357–383.
- [98] D.J. Lane, B. Pace, G.J. Olsen, D.A. Stahl, M.L. Sogint, N.R. Pace, *PNAS*, 82 (1985) 6955–6959.
- [99] D. Ercolini, *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (2013) 3148–3155.
- [100] G. Cardinali, L. Corte, V. Robert, *Current Opinions in Food Science*, 17 (2017) 62–67.
- [101] H.P.J. Buermans, J.T. den Dunnen, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842 (2014) 1932–1941.
- [102] E. Dijk, H. Auger, Y. Jaszczyszyn, C. Thermes, *Trends in Genetics*, 30 (2014) 418–426.
- [103] W.J. Ansorge, *Nature Biotechnology*, 25 (2009) 195–203.
- [104] L. Quigley, O. O’Sullivan, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, P.D. Cotter, *Applied Environmental Microbiology*, 78 (2012) 5717–5723.
- [105] D. Ercolini, F. De Filippis, A. La Storia, M. Iacono, *Applied Environmental Microbiology*, 78 (2012) 8142–8145.
- [106] M.M. Fuka, S. Wallisch, M. Engel, G. Welzl, J. Havranek, M. Schloter, *PLoS One*, 8 (2013) 1–10.
- [107] T. Silveti, E. Capra, S. Morandi, P. Cremonesi, M. Decimo, F. Gavazzi, R. Giannico, I. De Noni, M. Brasca, *Lwt*, 84 (2017) 821–831.
- [108] S. Andrews, Babraham Bioinformatics, <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (Erişim tarihi: **10 Ocak 2023**).
- [109] Illumina, Errors, <https://emea.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/fastqc/> (Erişim tarihi: **10 Ocak 2023**).
- [110] X. Yang, D. Liu, F. Liu, J. Wu, J. Zou, X. Xiao, F. Zhao, B. Zhu, *BMC Bioinformatics*, 14 (2013) 2–5.
- [111] P. Ewels, M. Magnusson, S. Lundin, M. Kaller, *Bioinformatics*, 32 (2016) 3047–3048.
- [112] M. Martin, *EMBnet Journal*, 17 (2011) 10–12.
- [113] R.C. Edgar, *Bioinformatics*, 26 (2010) 2460–2461.

- [114] A. Masella, A. Bartram, J. Truszkowski, D. Brown, D. Neufeld, *BMC Bioinformatics*, 13 (2012).
- [115] J. Bengtsson-Palme, M. Ryberg, M. Hartmann, S. Branco, Z. Wang, A. Godhe, P. De Wit, M. Sánchez-García, I. Ebersberger, F. de Sousa, A. Amend, A. Jumpponen, M. Unterseher, E. Kristiansson, K. Abarenkov, Y.J.K. Bertrand, K. Sanli, K.M. Eriksson, U. Vik, V. Veldre, R.H. Nilsson, *Methods in Ecology and Evolution*, 4 (2013) 914–919.
- [116] R.C. Edgar, H. Flyvbjerg, *Bioinformatics*, 31 (2015) 3476–3482.
- [117] R.C. Edgar, *PeerJ*, 2017.
- [118] R.C. Edgar, *PeerJ*, 2018 (2018) 1–29.
- [119] A.K. Thukral, *Agricultural Residuals Journal*, 54 (2017) 1.
- [120] A.D. Willis, *Frontiers in Microbiology*, 10 (2019).
- [121] P. Khati, A. Sharma, P. Chaudhary, A.K. Singh, S. Gangola, R. Kumar, *Biocatal. Agricultural Biotechnology*, 20 (2019).
- [122] M. de Jong, A.Y. Alekseeva, K.F. Miraji, S. Phiri, A.R. Linnemann, S.E. Schoustra, *Microorganisms*, 10 (2022).
- [123] D.M. Raup, *Paleobiology*, 1 (1975) 333–342.
- [124] T. Liu, J. Kang, L. Liu, X. Hu, X. Wang, X. Li, Z. Ma, T. Ren, *Annals of Microbiology*, 70 (2020) 1–9.
- [125] Z. Zheng, L. Wei, M. Zhu, Z. Qian, J. Liu, L. Zhang, Y. Xu, *Food Residuals International*, 174 (2023).
- [126] M. Manchester, A. Anand, *Advances in Virus Research*, 98 (2017) 57–81.
- [127] V. Garcia-Canas, C. Simo, *Food metabolomics: An overview*, Elsevier, 2019.
- [128] F. Capozzi, A. Trimigno, *Using Metabolomics to Describe Food in Detail*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, *Metabolomics as a Tool in Nutrition Research*, L. Sébédio, L. Brennan (Eds) Elsevier, 2015.
- [129] J. Ran, Y. Su, P. Wang, W. Yang, R. Li, L. Jiao, R. Zhao, *Lwt*, 190 (2023) 115360.
- [130] W. Xu, Q. Dong, G. Zhao, B. Han, *Heliyon*, 9 (2023) e18522.
- [131] C.R. Balcázar-Zumaeta, E.M. Castro-Alayo, I.S. Cayo-Colca, G. Idrogo-Vásquez, L.D. Muñoz-Astecker, *Food Residuals International*, 163 (2023).
- [132] A. Chahardoli, F. Jalilian, Z. Memariani, M. Farzaei, Y. Shokohinia, *Analysis of organic acids*. S. Nabavi, M. Saedi, S. Nabavi, A. Silva (Eds.), *Recent Advances in Natural Products Analysis*, Elsevier, 2020.
- [133] M. Theron, J.F.R. Lues, *Nature and composition of organic acids*. *Organic Acids and Food Preservation*, CRC Press, New York, 2011.

- [134] M. Matthey, *Critical Reviews in Biotechnology*, 12 (1992) 87–132.
- [135] EMBL-EBI, CHEBI:28358, rac-laktik asit, <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:28358> (Erişim tarihi: **18 Ekim 2023**).
- [136] EMBL-EBI, CHEBI:30769 - Süksinik asit, <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:30769> (Erişim tarihi: **18 Ekim 2023**).
- [137] M. Stratford, T. Eklund, *Organic acids and esters. Food Preservatives*, N.J. Russell, G.W. Gould (Eds.), Kluwer Academic Publishers, **2003**.
- [138] EMBL-EBI, CHEBI:15366 - Asetik asit, <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:15366>, (Erişim tarihi: **18 Ekim 2023**).
- [139] EMBL-EBI, Sitrik asit, <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:30769>, (Erişim tarihi: **18 Ekim 2023**).
- [140] EMBL-EBI, CHEBI:32816 - Pürivik asit, <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:32816>, (Erişim tarihi: **18 Ekim 2023**).
- [141] Y. Li, J. Chen, S.Y. Lun, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (2001) 451–459.
- [142] EMBL-EBI, CHEBI:30751 - Formik asit, <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:30751> (Erişim tarihi: **18 Ekim 2023**).
- [143] R.M. Hafez, T.M. Abdel-Rahman, R.M. Naguib, *Journal of Advanced Research*, 8 (2017) 475–486.
- [144] M. Mahomoodally, D. Desire, D. Dilmar, E. Rosette, *Uric acid. Antioxidants Effects in Health*, S. Nabavi (Ed.), Elsevier, **2022**.
- [145] F. Scientific, Uric acid, +99%, Thermo Scientific Chemicals, <https://www.fishersci.se/shop/products/uric-acid-99-thermo-scientific-1/10205560> (Erişim tarihi: **20 Eylül 2023**).
- [146] EMBL-EBI, CHEBI:16995 - Okzalik asit, <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:16995> (Erişim tarihi: **18 Ekim 2023**).
- [147] A.P. Oliveira, J.A. Pereira, P.B. Andrade, P. Valentão, R.M. Seabra, B.M. Silva, *Food Chemistry*, 111 (2008) 393–399.
- [148] G. Gadd, *Fungal production of Citric and Oxalic Acid: Importance in Metal Speciation, Physiology and Biogeochemical Processes. Advances in Microbia Physiology*, R.K. Poole (Ed.), Academic Press, **2011**.

- [149] M. Kohlmeier, carbohydrates, alcohols and organic acids. Nutrient Metabolism, M. Kohlmeier (Ed.), Academic Press, **2003**.
- [150] P. Kalathenos, N.. Russell, Organic acids and esters. Food Preservatives, N. Russell, G. Gould (Eds.), Kluwer Academic Publishers, **2003**.
- [151] EMBL-EBI, CHEBI:16236 - Etanol, <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:16236> (Erişim tarihi: **18 Ekim 2023**).
- [152] Ö. Işık Doğan, R. Yılmaz, Food Biotechnology, 37 (**2023**) 191–217.
- [153] N. Őimřekli, İ.S. Doğan, Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 5 (**2015**) 33–40.
- [154] Ö. Işık Doğan, R. Yılmaz, Uşak Tarhanası Mikrobiyotası, 13. Gıda Mühendisliği Kongresi, **2023**.
- [155] T.S.E, TS EN ISO 659-Yağlı Tohumlar - Yağ Muhtevasının Tayini (Referans Yöntem), Türkiye, **2010**.
- [156] A. of O.A. Chemists, AOAC 990.03-2002, Protein (Crude) in Animal Feed. Combustion Met, **2002**.
- [157] T.S. Enstitüsü, TS 1511 ISO 2171-Tahıllar ve Öğütölmüş Tahıl Ürünleri- Toplam Kül Muhtevası Tayini, Türkiye, **2010**.
- [158] T.S. Enstitüsü, TS EN ISO 712-Tahıl ve Tahıl Ürünleri-Rutubet Muhtevası Tayini-Referans Yöntem, Türkiye, **2012**.
- [159] J.R. Cole, Q. Wang, J.A. Fish, B. Chai, D.M. McGarrell, Y. Sun, C.T. Brown, A. Porras-Alfaro, C.R. Kuske, J.M. Tiedje, Nucleic Acids Research, 42 (**2014**) 633–642.
- [160] P.J. McMurdie, S. Holmes, PLoS Computational Biology, 10 (**2014**).
- [161] J. Oksanen, F. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P.R. Minchin, R.B. O’Hara, G.L. Simpson, P. Solymos, M.H.H. Stevens, H. Wagner, Scientific Research, (**2014**).
- [162] AOAC, AOAC 984.14-1988, Ethanol in Beer. Gas Chromatographic Method, **1988**.
- [163] E. Bolyen, J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C.C. Abnet, G.A. Al-Ghalith, H. Alexander, E.J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J.E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C.J. Brislawn, C.T. Brown, B.J. Callahan, A.M. Caraballo-Rodríguez, J. Chase, E.K. Cope, R. Da Silva, C. Diener, P.C. Dorrestein, G.M. Douglas, D.M. Durall, C. Duvallet, C.F. Edwardson, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, J.M. Gauglitz, S.M. Gibbons, D.L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B. Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G.A. Huttley, S. Janssen, A.K. Jarmusch, L. Jiang, B.D. Kaehler, K. Bin Kang, C.R. Keefe, P. Keim, S.T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciölek, J. Kreps, M.G.I. Langille, J. Lee, R. Ley, Y.-X. Liu, E. Loftfield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz, B.D.

- Martin, D. McDonald, L.J. McIver, A. V. Melnik, J.L. Metcalf, S.C. Morgan, J.T. Morton, A.T. Naimey, J.A. Navas-Molina, L.F. Nothias, S.B. Orchanian, T. Pearson, S.L. Peoples, D. Petras, M.L. Preuss, E. Pruesse, L.B. Rasmussen, A. Rivers, M.S. Robeson, P. Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer, A. Shiffer, R. Sinha, S.J. Song, J.R. Spear, A.D. Swafford, L.R. Thompson, P.J. Torres, P. Trinh, A. Tripathi, P.J. Turnbaugh, S. Ul-Hasan, J.J.J. van der Hooft, F. Vargas, Y. Vázquez-Baeza, E. Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K.C. Weber, C.H.D. Williamson, A.D. Willis, Z.Z. Xu, J.R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight, J.G. Caporaso, *Nature Biotechnology*, 37 (2019) 852–857.
- [164] M. Mannaa, G. Han, Y.S. Seo, I. Park, *Foods*, 10 (2021).
- [165] H. Erinç, S. Çifçi, *GIDA / Journal of FOOD*, 43 (2018) 114–121.
- [166] Ş. İbanoğlu, E. İbanoğlu, P. Ainsworth, *Food Chemistry*, 64 (1999) 103–106.
- [167] N. Türüt, E. Oruç, E. Dinçel, G. Özay, malatya tarhanası ile uşak tarhanası' nın üretim teknikleri ve ürün karakterizasyonu, 4.Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 2014, pp. 112–116.
- [168] Ö. Şimşek, D. Zehir, *Akademik Gıda*, (2018) 403–410.
- [169] Ö. Şimşek, S. Özel, A.H. Çon, *GIDA*, 37 (2012) 341–348.
- [170] S. İbanoglu, P. Ainsworth, G. Wilson, G.D. Hayes, *Food Chemistry*, 53 (1995) 143–147.
- [171] S. Arslan-Tontul, C. Mutlu, C. Candal, M. Erbaş, *Journal of Food Science Technology*, 55 (2018) 4770–4781.
- [172] C.E. Tamer A. Kumral, M. Aşan, İ. Şahin, *Journal of Food Processing and preservation*, 31 (2006) 116–126.
- [173] R. Çifci, Uşak Tarhanasının Bazı Kalite Karakteristiklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi, Karaman, 2021.
- [174] O.B. Oyewole, S. Ayo Odunfa, *Journal of Food Composition Analysis*, 2 (1989) 170–176.
- [175] S.G. Nkhata, E. Ayua, E.H. Kamau, J.B. Shingiro, *Food Science & Nutrition*, 6 (2018) 2446–2458.
- [176] M.A. Osman, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10 (2011) 1–6.
- [177] M. El Hag, A.H. El Tinay, N.E. Yousif, *Food Chemistry*, 77 (2002) 193–196.
- [178] N. Ertaş, S. Durmuş, M. Kürşat Demir, A. Elgün, *Food Science and Technology Residuals*, 15 (2009) 51–58.
- [179] A. Çağlar, N. Erol, M.S. Elgün, *Journal of Food Processing and Preservation*, 37 (2013) 670–675.
- [180] L. De Vuyst, P. Neysens, *Trends Food Science and Technology*, 16 (2005) 43–56.

- [181] N. İçli, F.I. Kesbiç, Turkish J. Agric. - Food Science and Technology, 9 (2021) 2333–2338.
- [182] K. Ateş, Tarhana Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerin İzolasyonu Ve Bazı Probiyotik Özelliklerinin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Aydın Üniversitesi, İstanbul, 2019.
- [183] NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools., Database (Oxford), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4909&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (Erişim tarihi: **19 Aralık 2023**).
- [184] NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools., Database (Oxford), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4909> (Erişim tarihi: **19 Aralık 2023**).
- [185] E. Litopoulou-Tzanetaki, N. Tzanetakis, Fermented Milks: Range of Products. Encyclopedia of Food Microbiology, C. A. Batt, M. L. Tortorello (Eds), Elsevier, 2014.
- [186] F. Jussiaux, C. Miot-Sertier, D. Nguyen-Lopez, C. Badet, J. Samot, Archives of Oral Biology, 121 (2021).
- [187] K. Sören Schubert, M. Kostrzewa, Current Issues in Molecular Biology, 23 (2017) 17–20.
- [188] A. Van Belkum, M. Welker, D. Pincus, J.P. Charrier, V. Girard, Annals of Laboratory Medicine, 37 (2017) 475–483.
- [189] M. De Angelis, F. Minervini, S. Siragusa, C.G. Rizzello, M. Gobbetti, International Journal of Food Microbiology, 302 (2019) 35–46.
- [190] E. Lhomme, A. Lattanzi, X. Dousset, F. Minervini, M. De Angelis, G. Lacaze, B. Onno, M. Gobbetti, International Journal of Food Microbiology, 215 (2015) 161–170.
- [191] C.E. Shannon, The Bell System Technical Journal, 3 (1948).
- [192] E. Simpson, Nature, 163 (1949) 688.
- [193] N. Tian, X. Guo, M. Wang, C. Chen, H. Cui, L. Zhang, H. Tang, Journal of Food Biochemistry, 44 (2020) 1–11.
- [194] G. Vrancken, T. Rimaux, S. Weckx, F. Leroy, L. De Vuyst, Applied Environmental Microbiology, 77 (2011) 2716–2726.
- [195] J.K. Mugula, J.A. Narvhus, T. Sørhaug, International Journal of Food Microbiology, 83 (2003) 307–318.
- [196] M. Gobbetti, A. Corsetti, J. Rossi, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10 (1994) 275–279.

- [197] F. Minervini, R. Di Cagno, A. Lattanzi, M. De Angelis, L. Antonielli, G. Cardinali, S. Cappelle, M. Gobbetti, *Applied Environmental Microbiology*, 78 (2012) 1251–1264.
- [198] B. Özel, Ö. Şimşek, L. Settanni, H. Erten, *International Journal of Food Microbiology*, 335 (2020).
- [199] E. Säde, J. Björkroth, Introduction to the Genera *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, and *Carnobacterium*. *Lactic Acid Bacteria Microbiological Functions and Aspects*, G. Vinderola, A. Ouwehand, S. Salminen, von A. Wright (Eds.), Taylor and Francis Group, CRC Press, 2019.
- [200] M. Papagianni, S. Anastasiadou, *Microbial Cell Factories*, 8 (2009) 3.
- [201] L. De Vuyst, G. Vrancken, F. Ravyts, T. Rimaux, S. Weckx, *Food Microbiology*, 26 (2009) 666–675.
- [202] H.G. Le, Z. Yao, J.A. Kim, S.J. Lee, Y. Meng, J.Y. Park, J.H. Kim, *Microbiology and Biotechnology Letters*, 48 (2020) 287–295.
- [203] M. Vancanneyt, P. Neysens, M. De Wachter, K. Engelbeen, C. Snauwaert, I. Cleenwerck, R. Van der Meulen, B. Hoste, E. Tsakalidou, L. De Vuyst, J. Swings, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (2005) 615–620.
- [204] M.W. Griffiths, A.M. Tellez, *Frontiers in Microbiology*, 4 (2013).
- [205] E.E. Omeroglu, Ö. Can, Ş.N. Temiz, R. Al, O. Altunbas, A. Soyuçok, M.N.Z. Yurt, V.C. Ozalp, M. Sudagidan, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 12 (2023) 1–8.
- [206] F. Minervini, G. Celano, A. Lattanzi, L. Tedone, G. de Mastro, M. Gobbetti, M. de Angelis, *Applied Environmental Microbiology*, 81 (2015) 6736–6748.
- [207] J. Dutkiewicz, B. Mackiewicz, M.K. Lemieszek, M. Golec, J. Milanowski, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23 (2016) 206–222.
- [208] A.T. Cruz, A.C. Cazacu, C.H. Allen, *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (2007) 1989–1992.
- [209] M. Kanki, T. Yoda, T. Tsukamoto, T. Shibata, *Applied Environmental Microbiology*, 68 (2002) 3462–3466.
- [210] F. Turantaş, K. Kemahlioğlu, *Journal of Food Science and Technology*, 49 (2012) 601–607.
- [211] S. Özel, S. Sabanoğlu, A.H. Çon, Ö. Şimşek, *Food Biotechnology*, 29 (2015) 117–129.
- [212] S. Sieuwerts, P.A. Bron, E.J. Smid, *Lwt*, 90 (2018) 201–206.
- [213] A. Karim, N. Gerliani, M. Aïder, *International Journal of Food Microbiology*, 333 (2020) 108818.

- [214] E.A. Johnson, C. Echavarri-Erasun, *Yeast Biotechnology. The Yeasts*, C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout, Elsevier B.V., **2011**.
- [215] A. Lourens-Hattingh, B.C. Viljoen, *Food Microbiology*, 19 (**2002**) 597–604.
- [216] R. Hommel, *Candida*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, C. Batt, M. Tortorello (Eds.), Academic Press, **2014**.
- [217] L. Iacumin, F. Cecchini, M. Manzano, M. Osualdini, D. Boscolo, S. Orlic, G. Comi, *Food Microbiology*, 26 (**2009**) 128–135.
- [218] Y. Zhang, P. V. Vadlani, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (**2015**) 694–699.
- [219] G. Yazıcı, Uşak Tarhanasının Organik Asit İçeriğinin Ve Laktik Asit Bakteri Çeşitliliği İle İlişkisinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, **2016**.
- [220] M. Magala, Z. Kohajdová, J. Karovičová, M. Greifová, G. Greif, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3 (**2014**) 498-504.
- [221] L. De Luca, A. Aiello, F. Pizzolongo, G. Blaiotta, M. Aponte, R. Romano, *Applied Sciences*, 11 (**2021**) 1–16.
- [222] P. Sroka, T. Tuszyński, *Food Chemistry*, 104 (**2007**) 1250–1257.
- [223] O. Bozkurt, O. Gürbüz, *Food Chemistry*, 108 (**2008**) 198–204.
- [224] E. Taşdelen, Ö. Şimşek, *Food Bioscience*, 43 (**2021**).
- [225] P. Vernocchi, S. Valmorri, I. Dalai, S. Torriani, A. Gianotti, G. Suzzi, M.E. Guerzoni, D. Mastrocola, F. Gardini, *Journal of Food Science*, 69 (**2004**) 182–186.
- [226] K.P. Navder, R.-F.S. Huang, E.B. Fryer, H.C. Fryer, *Journal of Food Science*, 55 (**1990**) 585–586.
- [227] A. Kumral, *Chemistry Central Journal*, 9 (**2015**) 16.
- [228] A. Sevgili, O. Erkmén, S. Koçaslan, *Czech Journal of Food Science*, 39 (**2021**) 312–318.
- [229] F. Minervini, R. Di Cagno, A. Lattanzi, M. De Angelis, L. Antonielli, G. Cardinali, S. Cappelle, M. Gobbetti, *Applied Environmental Microbiology*, 78 (**2012**) 1251–1264.
- [230] M. Magala, Z. Kohajdová, J. Karovičová, M. Greifová, G. Greif, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 3 (**2014**) 498–504.
- [231] J. Jin, T.T.H. Nguyen, S. Humayun, S.H. Park, H. Oh, S. Lim, I.K. Mok, Y. Li, K. Pal, D. Kim, *Food Chemistry*, 345 (**2021**) 128.
- [232] M. Gobbetti, A. Corsetti, J. Rossi, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10 (**1994**) 275-279.
- [233] M. Venturi, S. Guerrini, M. Vincenzini, *Food Microbiology*, 31 (**2012**) 107–115.