

Alteration of Boza Microbiota in the Fermentation Process

Murat Kavruk¹, Mediha Nur ZAFER YURT², Behiye Büşra TAŞBAŞI², Elif Esmâ ACAR², Ali SOYUÇOK³, Osman ALTUNBAŞI⁴, Veli Cengiz ÖZALP⁵, Mert SUDAĞIDAN^{2*}

¹Turkish Standards Institution (TSE), Test and Calibration Center, Gebze 41400, Kocaeli, Turkey

²Konya Food and Agriculture University, KIT-ARGEM R&D Center, Meram, 42080, Konya, Turkey

³Mehmet Akif Ersoy University, Agriculture, Livestock and Food Research and Application Center, 15030, Burdur, Turkey

⁴Konya Food and Agriculture University, SARGEM, Meram, 42080, Konya, Turkey

⁵Atilim University, Medical School, Department of Medical Biology, 06830, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Boza is a fermented beverage containing beneficial microorganisms for human health. In our study, microbiota present in raw materials used boza production (corn flour, wheat flour, and mayşe), 1st day, 3rd day of boza fermentation and 4th day final product of boza, has been identified by Next Generation DNA Sequencing and metagenomic analysis. As a result of genus-level analysis directly from corn flour and wheat flour samples contained dominantly *Streptophyta* and *Pleomorphobacterium*, while in the 1st day, 3rd day, the final product of boza and boza ferment the dominant bacteria were *Leuconostoc* and *Lactococcus* at genus level. In the analysis of the pre-enriched samples, the dominant bacteria in corn flour were *Enterococcus*, *Klebsiella*, and *Micromonospora* and in wheat flour were *Pantoea* and *Bacillus*. Boza ferment, boza on the 1st day, boza on the 3rd day and the final product of boza dominantly contained *Lactococcus*. The bacterial diversity, similarity and differences among samples were analyzed by Principal Coordinate Analysis and dendrogram construction. The contribution of raw materials used in the production of boza change to the products at the fermentation stage and to the microbiota during the fermentation process and their contribution to the final product were determined by metagenomic analysis at DNA level.

Keywords: Boza, Lactic acid bacteria, Metagenomic analysis, Microbiota

Boza Mikrobiyotasının Fermantasyon Sürecindeki Değişimi ÖZ

Boza, insan sağlığı için yararlı mikroorganizmaları içeren fermente bir içecektir. Çalışmamızda boza üretiminde ham madde olarak kullanılan (mısır unu, buğday unu, mayşe) ve boza fermantasyonunun 1. günü, 3. günü ve 4. gün son ürün boza'nın içerdiği mikrobiyota Yeni Nesil DNA Dizileme yöntemi ve metagenomik analiz ile ortaya çıkarılmıştır. Örneklerden doğrudan cins düzeyinde yapılan analiz sonucunda, mısır unu ve buğday ununda dominant olarak *Streptophyta* ve *Pleomorphobacterium* bulunurken; bozanın 1. gün, 3. gün ve son ürün ile boza mayasında dominant bakterilerin *Leuconostoc* ve *Lactococcus* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Ön zenginleştirme yapılan örneklerin analizinde, mısır ununda dominant bakteriler *Enterococcus*, *Klebsiella* ve *Micromonospora*, buğday ununda ise *Pantoea* ve *Bacillus* olduğu, boza mayası, 1. gün boza, 3. gün boza ve satışa sunulan son üründe dominant bakteri *Lactococcus* olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda örnekler arasındaki bakteriyel çeşitlilik, benzerlik ve farklılıklar Principal Coordinate Analiz ve dendrogram oluşturulması ile ortaya konmuştur. Boza üretiminde kullanılan ham maddelerin bozanın fermantasyon aşamalarındaki ürünler ile fermantasyon sürecinde mikrobiyotasına nasıl değiştiği ve son ürüne olan katkıları, DNA düzeyinde yapılan metagenomik analizler ile belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Boza, Laktik asit bakterileri, Metagenomik Analiz, Mikrobiyota

To cite this article: Kavruk M, Zafer Yurt M.N, Taşbaşı B.B, Acar E.E, Soyuçok A, Altunbaş O, Özalp V.C, Sudağidan M. Alteration of Boza Microbiota in the Fermentation Process. Kocatepe Vet J. (2021) 14(2): 238-246.

Submission: 13.03.2021 Accepted: 06.05.2021 Published Online: 27.05.2021

ORCID ID; MK: 0000-0001-5331-7253, MNYZ: 0000-0002-3064-3811, BBT: 0000-0002-2076-3756, EEA: 0000-0002-6264-7550, AS: 0000-0003-2626-5827, OA: 0000-0003-1840-628x, VCCÖ: 0000-0002-7659-5990, MS: 0000-0002-3980-8344

*Corresponding author e-mail: msudagidan@gmail.com

GİRİŞ

Probiyotik gıdaların tüketimi insan sağlığı, gelişimi ve bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesi için son derece önemlidir. Bağırsak mikrobiyotasının insan beyin gelişimi ve psikolojik durumunda önemli bir rol üstlendiği yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur (Smith 2015, Settanni ve ark. 2021, Spichak ve ark. 2021, Troyer ve ark. 2021). İnsan bağırsak mikrobiyotasının obezite ile de doğrudan ilişkili olduğu, son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Bliss ve Whiteside 2018, Rovella ve ark. 2021, Wilkins ve Reimer 2021). Prebiyotik gıdalar bağırsak mikrobiyotasını oluşturan mikroorganizmaların özellikle de bakterilerin başlıca enerji ve beslenme kaynaklarıdır. Prebiyotik gıdaların tanımı güncellenmiştir. Bu bağlamda bir gıdanın prebiyotik tanımına uyabilmesi için sağlık üzerine olumlu katkıları bulunan mikroorganizmalar tarafından seçici substrat olarak kullanılması gerektiği belirtilmiştir (Gibson ve ark. 2017).

Fermentasyon, kullanılan en eski ve etkili gıda muhafaza yöntemlerinden biridir. Fermente gıdaların da tanımı yakın zamanda tekrar güncellenmiş olup, istenilen mikrobiyal çoğalma ve gıda bileşenlerinin enzimatik dönüşümlerini içeren gıda veya içecek olarak belirtilmiştir (Marco ve ark. 2021). Fermentasyon sonucunda gıda ortamında asitliğin artması, pH'nın düşmesi ve antimikrobiyal metabolitlerin oluşması bu yöntemin temelini oluşturmaktadır (Palamutoğlu ve Baş 2020). Laktik asit bakterileri (LAB), mayalar ve asetik asetik bakterileri fermente gıdaların üretilmesinde yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardır (De Vuyst ve Leroy 2020). Fermente probiyotik gıdalar, canlı mikroorganizmalar içermesi nedeniyle sağlık üzerinde yararlı etkileri vardır. Bu olumlu etkiler özellikle içerdikleri canlı mikroorganizmalar, LAB ve bunların bağırsak mikrobiyotası üzerine olumlu etkileri, besin sindirimine katkıları ve ürettiği biyoaktif maddelerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle boza da bu sınıfta değerlendirilmektedir (Marco ve ark. 2021).

Boza, alkolsüz, viskozitesi yüksek ve hafif asitli fermente bir içecektir. Bozanın ilk çıkışını 9000 yıl önce Mezopotamya'ya dayandıran kaynaklar yanında, Orta Aysa'da Türklerin göçleri ile dünyada farklı bölgelere yayıldığı ve bu bölgelerde farklı isimler aldığı bilinmektedir. Balkan ülkelerinden (Bulgaristan, Arnavutluk) Türkmenistan ve Kırgızistan'a kadar farklı coğrafyalarda farklı malzemelerle üretilen boza, her bölgede geleneksel bir içecek olarak tüketilmektedir (Çakır 2019). Genel olarak boza, LAB ve mayaların tahıl (darı, mısır, buğday veya pirinç unu) ürünlerini fermente etmesiyle elde edilen geleneksel bir fermente içecek olarak tanımlanmaktadır (Arici ve Daglioglu 2002). Boza fermentasyonunda homo ve hetero-fermantatif LAB ve mayaların görev alarak heterojen boza mikrobiyotasını oluşturduğu bilinmektedir (Gotcheva ve ark. 2000, Altay ve ark. 2013). Boza mikrobiyotasındaki değişkenlik

üretiminde kullanılan ham maddelerin farklı olması, üretim tekniklerindeki ve depolama koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Gotcheva ve ark. 2001, Botes ve ark. 2007).

Boza fermentasyonu boyunca LAB, organik asit, ekzopolisakkarit, antimikrobiyal maddeler ve fitaz gibi yararlı metabolitleri ürettiği ortaya çıkarılmıştır (Doğan ve Tekiner 2020). Ayrıca boza da bulunan *Lactobacillus pentosus* (Todorov ve Dicks 2007), *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* (Altay ve ark. 2013) ve *Lb. brevis* (Dogan ve Ozpinar 2017) probiyotik özellik gösterdiği ve *Lb. pentosus*'un bakteriyosin üreticisi olduğu da tespit edilmiştir (Todorov ve Dicks 2007). Diğer bir çalışmada, bozadan izole edilen *Enterococcus faecium* ST10Bz suşunun *Listeria monocytogenes*'e karşı etkili bakteriyosin ürettiği bulunmuştur (Valledor ve ark. 2020). Cholakov ve ark. (2017) bozadan izole ettikleri *Leuconostoc lactis* BT17 suşunun *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. ve *Klebsiella pneumonia* üzerine antimikrobiyal özellik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Kültüre dayalı yöntemlerde boza içeriğindeki mikrobiyotanın belirlenmesinde seçici ayırt edici besiyerleri kullanılarak sadece hedef mikroorganizmalar tespit edilebilmektedir. Bu çalışmada ise, DNA tabanlı Yeni Nesil DNA Dizileme (Next Generation DNA Sequencing, NGS) yöntemi kullanılarak boza üretiminde ham madde olarak kullanılan gıda maddeleri ve bozanın fermentasyon aşamalarından alınan örnekler içerisinde bakteri çeşitliliği ve bu bakterilerin analiz edilen örnek içerisinde bulunma oranları ve satışa sunulan son ürün şeklindeki boza mikrobiyotasına olan katkıları ve fermentasyon sürecinde mikrobiyotanın nasıl değiştiği metagenomik analiz ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Boza Örneklerinin Toplanması

Boza yapımında kullanılan gıda maddeleri, mayşe, boza mayası ve boza'nın fermentasyon aşamalarındaki örnekler (1. ve 3. gün) ve satışa sunulan son ürün (4. gün) Isparta ilinde lokal olarak boza üretimi yapan bir üreticiden üretimin her aşamasında steril tüpler içerisine Ekim 2019 tarihinde alınmıştır. Örnekler: ham madde (mısır unu ve buğday unu), mayşe, bir önceki bozadan elde edilen boza mayası, fermentasyonun 1. günü, 3. günü ve 4. gün son ürün boza olmak üzere toplam 7 adet örnek alınmıştır. Örnekler çalışılincaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Boza yapımında geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Üretici, mısır unundan %50 ve buğday unundan %50 olacak şekilde hazırlanan un karışımının 5 katı ağırlığı suyla (w/v) ezilerek 1 saat boyunca kaynatmıştır. Bir gece dinlendirildikten sonra hacmi kadar su ilave edilerek süzöldükten sonra %20 (w/v) şeker ilave edilmiştir. Bir önceki bozadan %2 (v/v) oranında ilave edildikten sonra 25 °C sıcaklıkta 3 gün fermentasyona bırakılmıştır. 3. günün sonunda boza +4 °C'ye alınarak depolanmıştır. Üretilen boza

bir gün dinlendirilmiş ve 4. günden sonra son ürün olarak satışa sunulmaya hazır hale getirilmiştir.

Örneklerden Doğrudan DNA Ekstraksiyonu

Boza ve boza yapımında kullanılan ham maddelerden 1 gr aseptik koşullarda biyogüvenlik kabini (DemAir Class IIA2, Türkiye) içerisinde tartılarak 9 ml peptonlu su (CM0509B, Oxoid, İngiltere) içerisinde stomacher'da homojenize edildikten sonra DNeasy® PowerFood® Microbial kiti (Qiagen, Almanya) tarafından önerilen protokol takip edilerek direkt ham madde ve boza örneklerinden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri 100 µl elüsyon tamponu içerisinde çözündürülmüş, DNA kantitasyonu Take3 plate kullanılarak mikropilaka okuyucuda (Epoch-2, BioTek, ABD) 260 ve 280 nm'de ölçülerek belirlenmiştir. DNA örnekleri amplikon polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmalarına kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Örneklerden Ön zenginleştirme Sonrası DNA Ekstraksiyonu

Boza ve boza yapımında kullanılan ham maddelerden 1 gr aseptik koşullarda biyogüvenlik kabini (DemAir Class IIA2, Türkiye) içerisinde tartılarak 9 ml peptonlu su (CM0509B, Oxoid) içerisine alınmış ve 35 °C'de 24 saat 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edilerek ön zenginleştirmeye tabi tutulmuştur. Ön zenginleştirme işlemi sonrasında kültürlerden 1 ml alınarak santrifuj edilmiş ve elde edilen pellet 4 mg/ml lizozim (Applichem, Almanya) ve 10 µg/ml lizostafin (Sigma, Almanya) içeren 500 µl 1×TE tamponu içerisinde çözündürülmüştür. Liu ve ark. (2004) tarafından önerilen fenol/kloroform/izoamil alkol yöntemi kullanılarak toplam DNA izole edilmiş ve DNA örnekleri 50 µl steril ultra saf su içerisinde çözündürülerek kantitasyonu yapılmış ve amplikon PZR çalışmalarına kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Yeni Nesil DNA Dizileme

Elde edilen toplam DNA örneklerinden amplikon PZR çalışmaları bakterilere özgü universal 16S rRNA V3-V4 gen bölgeleri adaptör DNA dizileri içeren primerler kullanılarak ve 16S metagenomik kütüphane hazırlama protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Illumina, California, ABD). F-primer

5'-

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGA
CAGCTACGGGNGGCWGCAG-3' ve R-primer

5'-

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAG
ACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

16S rRNA gen bölgesinin PZR ile çoğaltılmasında KAPA HiFi HS Mix (Roche, Almanya) kullanılmış ve örneklerin Yeni Nesil DNA Dizileme sisteminde ayırt edilmesini sağlayan index PZR için Nextera® XT index Kit v2 Set-A (Illumina) kiti kullanılmıştır. DNA örneklerinin temizlenmesinde AMPure XP beads

(Beckman Coulter, ABD) ve temizlenen DNA örneklerinin miktarlarının belirlenmesinde AccuBlue® NextGen dsDNA Quantitation kiti (Biotium, Inc., Fremont, CA, ABD) multimode mikropilaka okuyucu (Mithras² LB943, Berthold, Almanya) kullanılmıştır. Yeni Nesil DNA Dizileme işlemi iSeq100 sisteminde (Illumina) gerçekleştirilmiştir.

Metagenomik Analiz

Yeni Nesil DNA Dizileme sisteminden elde edilen diziler 16S Metagenomics (Version: 1.1.0, Illumina) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve örneklerin içerisindeki bakteriyel çeşitlilik alem (kingdom) düzeyinden tür (species) düzeyine kadar belirlenmiştir. Shannon species diversity indeks, Principal Coordinate Analysis (PCoA) ve elde edilen dizilerden oluşturulan dendrogram çiziminde 16S Metagenomics (Version: 1.1.0, 2021) yazılımı kullanılmıştır.

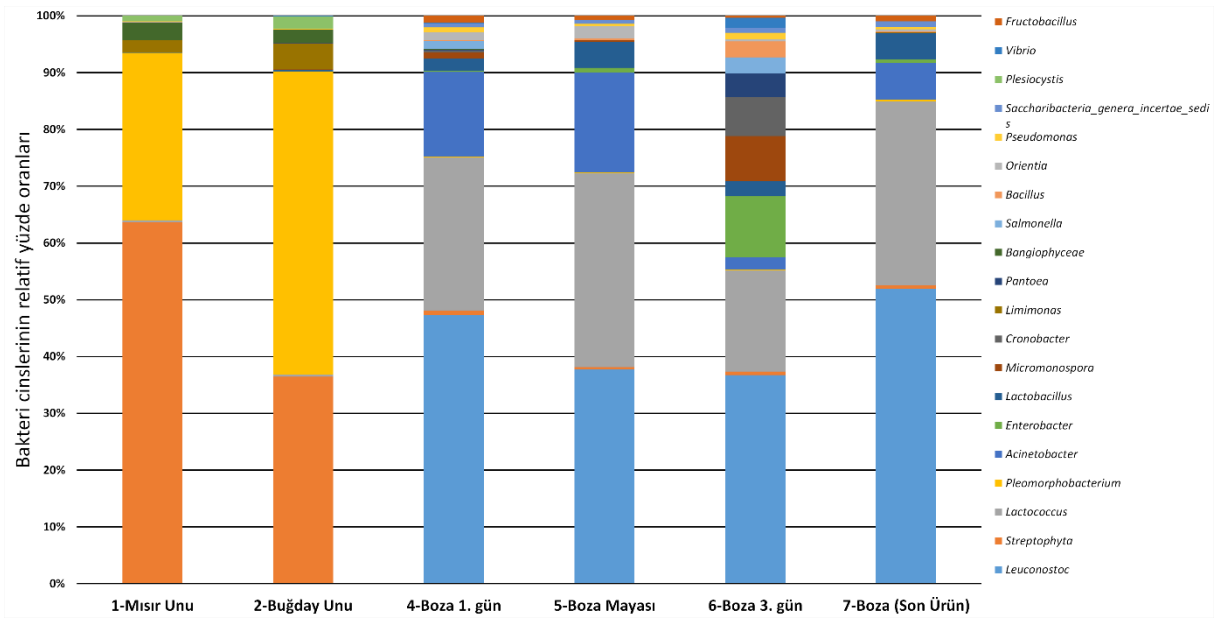
BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmamız kapsamında boza üretiminde ham madde olarak kullanılan gıda maddelerinin ve bozanın üretim aşamalarından alınan örneklerin içerdiği mikrobiyota Yeni Nesil DNA Dizileme yöntemi ve metagenomik analiz ile ortaya çıkarılmıştır. Çalışma iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir: Örneklerden doğrudan DNA ekstraksiyonu ve örneklerden ön zenginleştirme sonrasında DNA ekstraksiyonu. Analiz edilen gıda ham maddesi veya boza örneğinin içerdiği mikrobiyota (doğrudan örnekten izolasyon ile) ve ön zenginleştirme ile çoğaltma sonrasındaki mikrobiyota karşılaştırılmıştır. Örneklerden doğrudan DNA ekstraksiyonu ardından yapılan metagenomik analiz sonucunda mısır unu ve buğday ununda dominant bakteriler, cins düzeyinde *Streptophyta* (2745 okuma mısır unu ve 1262 okuma buğday unu) ve *Pleomorphobacterium* (1854 okuma buğday unu ve 1272 okuma mısır unu) olarak belirlenmiştir. Bozanın 1. gün (*Leuconostoc* 1160 okuma ve *Lactococcus* 659 okuma), 3. gün (*Leuconostoc* 2199 okuma ve *Lactococcus* 1070 okuma) ve son ürün (*Leuconostoc* 1825 okuma ve *Lactococcus* 1138 okuma) ile boza mayasında (*Leuconostoc* 1229 okuma ve *Lactococcus* 1113 okuma) baskın bakteriler cins düzeyinde *Leuconostoc* ve *Lactococcus* olarak tespit edilmiştir (Şekil 1). Boza örneklerinde tür düzeyinde yapılan incelemede baskın olarak *Leu. lactis* ve *Leu. palmae* ile *L. raffinolactis* bulunmuştur. Mayşe örneğinden direkt DNA ekstraksiyonu sonrasında bakteriyel 16S rRNA gen bölgesi amplifiye edilememiştir, bu durum içerdiği bakteri sayısının çok az olduğu şeklinde açıklanmıştır. Diğer yandan ön zenginleştirme sonrasında örneklerden DNA ekstraksiyonu ardından yapılan metagenomik analiz sonucunda mısır ununda dominant bakteriler cins düzeyinde en yüksek bulunma oranlarına göre *Enterococcus* (3080 okuma), *Klebsiella* (1523 okuma), *Micromonospora* (927 okuma) ve *Salmonella* (787 okuma), buğday ununda ise *Pantoea* (1319 okuma), *Bacillus* (1220 okuma), *Micromonospora*

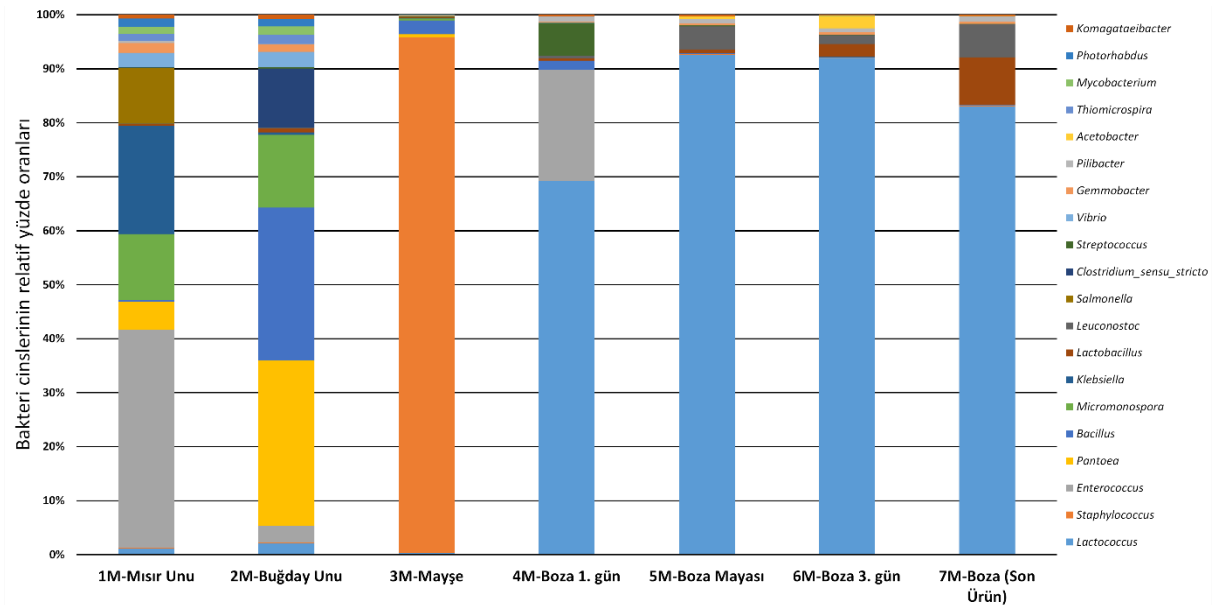
(580 okuma) ve *Clostridium sensu stricto* (471 okuma) olarak belirlenmiştir (Şekil 2). *Lactococcus* cins düzeyinde dominant bakteri olarak boza mayasında (7176 okuma), 1. gün (3871 okuma), 3. gün (7682 okuma) ve satışa sunulan son üründe (7097 okuma) tespit edilmiştir. Sadece 1. gün boza örneğinde *Lactococcus*'tan sonra en yüksek oranda *Enterococcus* (1153 okuma) cinsi bakterilerin olduğu belirlenmiştir. Tür düzeyindeki analizde boza örneklerinde dominant olarak *L. raffinolactis* ve *L. hirvilactis* tespit edilmiştir. Mayşe örneğinde ise *Staphylococcus* (11048 okuma) dominant olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). Direkt örneklerde ve ön zenginleştirme sonrası örneklerde bakteri çeşitliğinin karşılaştırılmasında metagenomik analiz sonucunda elde edilen Shannon species diversity indeks ve tanımlanan toplam tür sayısı verileri kullanılmıştır (Tablo 1). Bu bağlamda mısır unu, buğday unu ve 1. gün boza örneğinde ön zenginleştirme ile içerdikleri bakteri sayısı tür düzeyinde arttığı belirlenirken boza mayası, 3. gün boza ve son ürün bozada ise doğrudan örnekler içerisinde tanımlanan bakteri sayısının tür düzeyinde ön zenginleştirmeden daha yüksek sayıda olduğu bulunmuştur (Tablo 1). PCoA belirlenen taksonomik sınıflandırmaya göre benzerliklere ve farklılıklara göre örnekler arasındaki dağılımı ölçen bir yöntemdir. Doğrudan örneklerden yapılan PCoA sonucunda cins düzeyinde mısır unu (örnek no: 1) ve buğday unu (örnek no: 2), diğer analiz edilen numunelerden farklı olduğu görülmüştür (Şekil 3). Diğer yandan ön zenginleştirme sonrası örneklerinden yapılan PCoA analizinde ise 5M-boza mayası, 6M-boza 3. gün ve 7M-boza son ürün benzer çıkmıştır. 1M-mısır unu ve 2M-buğday unu birbirine yakın dağılım gösterirken 3M-mayşe ve 4M-boza 1. gün örneği birbirinden ve diğer analiz edilen örneklerden farklı dağılım gösterdiği görülmüştür (Şekil 4). Metagenomik analiz kullanılarak cins düzeyinde örnekler arasındaki hiyerarşik kümeleme analizi ile elde edilen dendrogram Şekil 5'te gösterilmiştir. Bu analiz ile doğrudan örnekler kullanılarak sekans sonucunda cins düzeyinde 6-boza 3. gün örneği diğerlerinden farklı bir profil göstermiştir. Dendrogramdaki kümelenmeler incelendiğinde 1-mısır unu ve 2-buğday unu örnekleri ile 4-boza 1. gün ve 7-boza son ürün örnekleri arasında yakın homoloji olduğu görülmüştür (Şekil 5A). Diğer yandan ön zenginleştirmeye tabi tutulan örneklerden sekans sonucunda cins düzeyindeki dendrogram incelendiğinde 3M-mayşe örneği diğer tüm analiz edilen ön zenginleştirmeye tabi tutulan örneklerden farklı olduğu, 1M-mısır unu ve 2M-buğday unu ile 5M-boza mayası ve 6M-boza 3. gün arasında cins düzeyinde yakın homoloji olduğu belirlenmiştir (Şekil 5B). Boza mikrobiyotasının içerdiği bakteri çeşitliliğini belirlemeye yönelik yapılan önceki çalışmalarda genellikle kültüre dayalı yöntemler kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada, boza içerisindeki bakteriler incelendiğinde LAB baskın olduğu ve LAB:maya oranının 2.4 olduğu ifade edilmiştir (Gotcheva ve ark.

2000, Levent ve Cavuldak 2017). LAB arasında laktobasiller bozada yaygın olarak bulunmaktadır (Baschali ve ark. 2017). Ayrıca, Hancıoğlu ve Karapınar (1997) yaptıkları bir çalışmada bozada baskın olarak bazı *Leuconostoc* (*Leu. paramesenteroides* (%25.6), *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (%18.6) ve *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (%7.3)) türleri ile *Lb. sanfrancisco* (%21.9) ve *Lb. coryniformis* (%9.1) rapor ederken Gotcheva ve ark. (2000) *Lb. coprophilus* ve *Leu. raffinolactis*'i raporlamışlardır. Arıcı ve Daglioglu (2002) bozada *Lb. sanfrancisco*, *Lb. coryniformis*, *Lb. confusus*, *Lb. fermentum*, *Leu. oenos*, *Leu. mesenteroides* ve *Leu. paramesenteroides*'in bulunduğunu ifade etmişlerdir. Boza içeriğindeki bakterileri belirlemeye yönelik yapılan benzer bir çalışmada *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. fermentum* tespit edilmiştir (Botes ve ark. 2007). Kıvanç ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada 10 boza örneğinden 45 farklı LAB izole etmişler ve bu bakterileri RiboPrinter® mikrobiyal karakterizasyon sistemi ile tanımlamalarını yapmışlardır. Çalışma sonucunda en yüksek oranda *Lactobacillus* spp. özellikle de *Lb. plantarum* (n:24) ve *Leu. citreum* (n:5) tespit etmişlerdir. *Lactococcus*, *Enterococcus* ve *L. lactis* ise düşük oranlarda tespit edilmiştir. Borcaklı ve ark. (2018) 3 boza örneğinden yaptıkları çalışmada baskın olarak *Pediococcus*, *Leuconostoc* spp. ve *Lactobacillus* spp. bakterilerini izole etmişlerdir. Osimani ve ark. (2015) 3 adet pastörize edilmemiş Bulgaristan bozası üzerine yaptıkları çalışmada 20 bakteri suşu izole etmişler ve bunların karakterizasyonunda 19/20 adedi *Lactobacillus* spp. olarak belirlenmiş ve dominant türler moleküler testler ile *Lb. parabuchneri* (7/20) ve *Lb. casei* group (7/20) olarak tespit edilmiştir. Boza içeriğindeki mikrobiyota bakterilerinin özellikle de laktik asit bakterilerinin farklı olması kullanılan ham maddelerin ve üretim tekniklerinin farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Boza fermente bir ürün olması açısından raf ömrü kısadır. Ticari ve ev ortamında gerçekleştirilen boza üretiminden sonra soğutulmuş +4 °C'de muhafaza edilmekte ve en fazla 12 gün içerisinde tüketilmesi önerilmektedir (Bayat ve Yıldız 2019). Boza mikrobiyotasında bakteriyosin üreten LAB bulunması, ürünün raf ömrünü arttırmaktadır (Lindgren ve Dobrogosz 1990). Boza içeriğindeki mikrobiyotanın korunması ve bağırsak mikrobiyotasına faydalı olabilmesi için uygun muhafaza koşullarında depolanması gerekmektedir. Boza içerisine lizozim ve nisin ilavesinin içeriğindeki laktik asit bakterilerini koruyarak raf ömrünü uzattığı ve duyuşal değerlerini değıştürmeği görülmüştür (Sozbilen ve ark. 2018).



Şekil 1: Örneklerden (1-7) doğrudan DNA ekstraksiyonu sonrasında içerdikleri bakterilerin cins düzeyinde metagenomik analizi. En yüksek tespit edilen 20 bakteri cins düzeyinde gösterilmiştir.
Figure 1: Metagenomic analysis of the bacteria at genus level after direct DNA extraction from the samples (1-7). Top 20 identified bacteria were shown at the genus level.

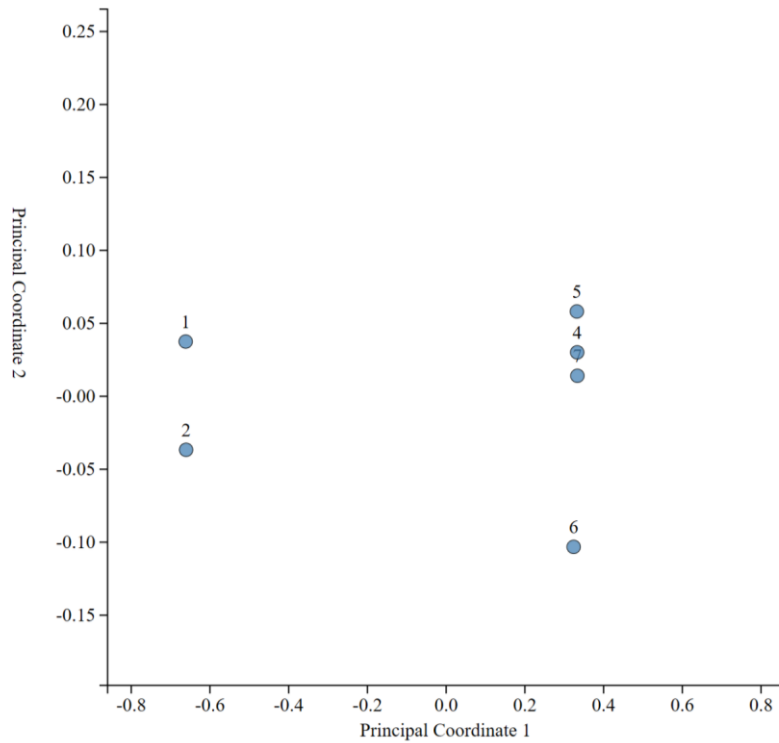


Şekil 2: Örneklerden (1M-7M) ön zenginleştirme sonrasında DNA ekstraksiyonu ile içerdikleri bakterilerin cins düzeyinde metagenomik analizi. En yüksek tespit edilen 20 bakteri cins düzeyinde gösterilmiştir.
Figure 2: Metagenomic analysis of the bacteria at genus level after DNA extraction from pre-enriched samples (1M-7M). Top 20 identified bacteria were shown at the genus level.

Tablo 1. Boza örneklerinden doğrudan ve ön zenginleştirme ile elde edilen DNA içerisindeki bakteriyel çeşitlilik değerleri (Shannon species diversity indeks ve tanımlanan tür sayısı)

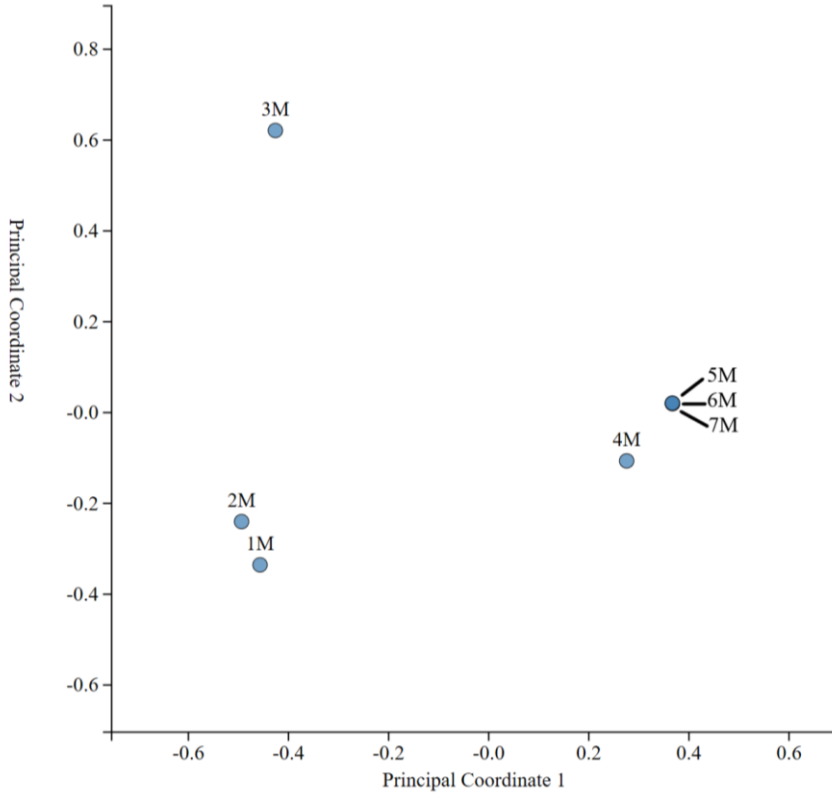
Table 1. Bacterial diversity values in DNA obtained from Boza samples directly and by pre-enrichment (Shannon species diversity index and number of identified species)

Örnek kodu	Örnek adı	Doğrudan Ekstraksiyon Sonrası		Ön zenginleştirme Sonrası	
		Shannon species diversity indeks	Tanımlanan tür sayısı	Shannon species diversity indeks	Tanımlanan tür sayısı
1	Mısır Unu	0.373	30	0.548	125
2	Buğday Unu	0.503	45	0.795	113
3	Mayşe	-	-	0.182	61
4	Boza 1. Gün	0.642	59	0.283	65
5	Boza mayası	0.711	70	0.154	50
6	Boza 3. Gün	0.918	124	0.228	66
7	Son Ürün Boza	0.664	61	0.187	48



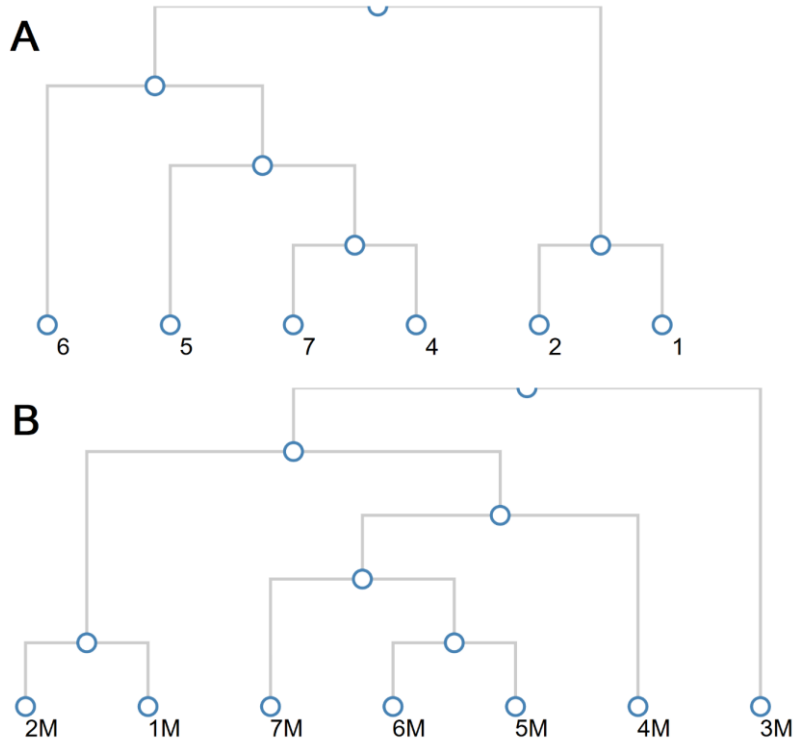
Şekil 3: Doğrudan örneklerden (1-7) elde edilen DNA kullanılarak yapılan sekans sonuçlarına göre cins düzeyinde PCoA analizi

Figure 3: Genus-level PCoA analysis according to sequence results using DNA directly obtained from the samples (1-7)



Şekil 4: Ön zenginleştirme yapılan örneklerden (1M-7M) elde edilen DNA kullanılarak yapılan sekans sonuçlarına göre cins düzeyinde PCoA analizi

Figure 4: Genus-level PCoA analysis according to sequence results using DNA obtained from pre-enriched samples (1M-7M)



Şekil 5: Dendrogram cins düzeyinde sekans sonucunda örnekler arasındaki homolojileri göstermektedir. A. Doğrudan örnekler (1-7) kullanılarak yapılan analiz sonucu, B. Ön zenginleştirmeye tabi tutulan örnekler (1M-7M) kullanılarak yapılan analiz sonucu

Figure 5: Dendrogram shows homologies between samples as a result of sequence at genus level. A. Result of analysis using directly samples (1-7) B. Result of analysis using samples applied to pre-enrichment (1M-7M)

SONUÇ

Boza dünyanın farklı coğrafyalarında farklı isim ve içerikleri ile tüketilen canlı bakteri içeriği ile fermente gıda statüsünde yer alan geleneksel bir içecektir. Kültürel yöntemler kullanılarak bozadan bakteri özellikle de LAB izolasyonu yapılan çalışmalarda baskın bakteri olarak *Lactobacillus* spp. karşımıza çıkmasına rağmen çalışmamızda son ürün boza örneğinde doğrudan örneklerden ekstraksiyonda *Lactobacillus* cinsi 4. sırada ve ön zenginleştirme yapılan son ürün örneğinde 2. sırada en çok tespit edilen cins türünde bakteri olmuştur. Yeni Nesil DNA Dizileme yönteminin bir örnek içerisindeki PZR ile çoğaltılan bakteriyel DNA bölgesinin yüksek sayıda okunması prensibine dayanması nedeniyle kültürel yöntemlere göre daha yüksek hassasiyet ve duyarlılığa sahip olduğu, bir örnek içerisinde hangi bakterilerin bulunduğu ve hangi oranlarda bulunduğunu ortaya çıkarmada önemli bir yöntem olduğu için çalışmamızda boza üretiminde kullanılan ham maddelerin mikrobiyotaya olan katkıları ve fermantasyon sürecinde mikrobiyotanın nasıl değiştiğinin belirlenmesinde bu yöntem tercih edilmiştir. Boza üretimi esnasındaki kaynatılma sonrasında ham madde olarak kullanılan mısır unu ve buğday ununda bulunan baskın bakterilerin son ürün boza içerisinde kaybolduğu gözlemlenmiş, boza mayasında bulunan baskın bakterilerin ise kendilerini muhafaza ederek ve fermantasyonu sağlayarak son ürün bozayı meydana getirdiği belirlenmiştir. Özellikle ön zenginleştirme sonrasında analiz edilen örneklerde, kullanılan ham maddelerde düşük oranda bulunan laktik asit bakterilerinin fermantasyon ile baskın hale geldikleri ve bozaya kendine has özellikleri sağladığı sonucuna varılmıştır.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir. Bu yazıda sunulan veri, bilgi ve belgeler akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edilmiştir..

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir. Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Teşekkür: Çalışma kapsamında boza ve ham madde örneklerini sağlayan Sayın Mustafa Günnaz'a ve laboratuvar alt yapısının kullanıldığı Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi, Kit-ARGEM Araştırma Merkezi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Altay F, Karbancıoğlu-Güler F, Daskaya-Dikmen C, Heperkan D. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation

process and quality characteristics. *Int J Food Microbiol.* 2013; 167(1): 44-56.

Arici M, Daglioglu O. Boza: A lactic acid fermented cereal beverage as a traditional Turkish food. *Food Rev Int.* 2002; 18(1): 39-48.

Baschali A, Tsakalidou E, Kyriacou A, Karavasiloglou N, Matalas AL. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: A neglected food group. *Nutr Res Rev.* 2017; 30(1): 1-24.

Bayat G, Yıldız G. The special fermented Turkish drink: Boza. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies* 2019; 7(4): 2438-2446.

Bliss ES, Whiteside E. The gut-brain axis, the human gut microbiota and their integration in the development of obesity. *Fron Physiol.* 2018; 9: 900.

Borcaklı M, Öztürk T, Yeşilada E. Cereal source and microbial consortia of the starter culture influence the chemical composition and physicochemical characteristics of boza. *Turk J Agric For.* 2018; 42: 412-422.

Botes A, Todorov SD, von Mollendorff JW, Botha A, Dicks LM. Identification of LAB and yeast from boza. *Process Biochem.* 2007; 42(2): 267-270.

Cholakov R, Tumbarski Y, Yanakieva V, Dobrev I, Salim Y, Denkova Z. Antimicrobial activity of *Leuconostoc lactis* strain BT17, isolated from a spontaneously fermented cereal beverage (Boza). *J Microbiol Biotech Food Sci.* 2017; 7(1): 47-49.

Çakır C. Tarihi, Etimolojisi ve Edebiyatı ile Boza Kitabı, Türk Dünyası Araştırmaları Vakfı Yayınevi, 1. Baskı, İstanbul. 2019; pp. 17-19.

De Vuyst L, Leroy F. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria, and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiol Rev.* 2020; 44(4): 432-453.

Dogan M, Ozpinar H. Investigation of probiotic features of bacteria isolated from some food products. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2017; 23(4): 555-562.

Doğan M, Tekiner İH. Extracellular phytase activities of lactic acid bacteria in sourdough mix prepared from traditionally produced boza as starter culture. *Food and Health.* 2020; 6(2): 117-127.

Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017; 14(8): 491-502.

Gotcheva V, Pandiella SS, Angelov A, Roshkova ZG, Webb C. Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochem.* 2000; 36(1-2): 127-130.

Gotcheva V, Pandiella SS, Angelov A, Roshkova Z, Webb C. Monitoring the fermentation of the traditional Bulgarian beverage boza. *Int J Food Sci Tech.* 2001; 36: 129-134.

Hancıoğlu Ö, Karapinar M. Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage. *Int J Food Microbiol.* 1997; 35(3): 271-274.

Kıvanç M, Yılmaz M, Çakır E. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turk J Biol.* 2011; 35(3): 313-324.

Levent H, Cavuldak ÖA. Geleneksel Fermente Bir İçecek: Boza. *Akademik Gıda.* 2017; 15(3): 300-307.

- Lindgren SW, Dobrogosz WJ.** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev.* 1990; 87: 149-164.
- Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML.** Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2004; 91(3): 297-304.
- Marco ML, Sanders ME, Gänzle M, Arrieta MC, Cotter PD, De Vuyst L, Hill C, Holzapfel W, Lebeer S, Merenstein D, Reid G, Wolfe BE, Hutkins R.** The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021.
- Osimani A, Garofalo C, Aquilant L, Milanović V, Clementi F.** Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. *Int J Food Microbiol.* 2015; 194: 62-70.
- Palamutoğlu Mİ, Baş M.** Traditional Fermented Foods of Turkey. *J Health Sci Res.* 2020; 2(3): 200-220.
- Rovella V, Rodia G, Di Daniele F, Cardillo C, Campia U, Noce A, Candi E, Della-Morte D, Tesauro M.** Association of gut hormones and microbiota with vascular dysfunction in obesity. *Nutrients.* 2021; 13(2): 613.
- Settanni CR, Ianiro G, Bibbò S, Cammarota G, Gasbarrini A.** Gut microbiota alteration and modulation in psychiatric disorders: Current evidence on fecal microbiota transplantation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021; 109: 110258.
- Smith PA.** Brain, meet gut. *Nature.* 2015; 526: 312-314.
- Spichak S, Bastiaanssen TFS, Berding K, Vlckova K, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF.** Mining microbes for mental health: Determining the role of microbial metabolic pathways in human brain health and disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021; Mar 3:S0149-7634(21)00103-2.
- Sozbilen GS, Korel F, Yemenicioğlu A.** Control of lactic acid bacteria in fermented beverages using lysozyme and nisin: Test of traditional beverage boza as a model food system. *Int J Food Sci Tech.* 2018; 53(10): 2357-2368.
- Todorov SD, Dicks LM.** Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Braz J Microbiol.* 2007; 38(1): 166-172.
- Troyer EA, Kohn JN, Ecklu-Mensah G, Aleti G, Rosenberg DR, Hong S.** Searching for host immune-microbiome mechanisms in obsessive-compulsive disorder: A narrative literature review and future directions. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021; Feb 24:S0149-7634(21)00094-4.
- Valledor SJD, Bucheli JEV, Holzapfel WH, Todorov SD.** Exploring beneficial properties of the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* ST10Bz strain isolated from Boza, a Bulgarian cereal-based beverage. *Microorganisms.* 2020; 8: 1474.
- Wilkins AT, Reimer RA.** Obesity, early life gut microbiota, and antibiotics. *Microorganisms.* 2021; 9(2): 413.