

PAPER DETAILS

TITLE: Farkli Sürelerde Uygulanan Ultrases Isleminin *S. boulardii*'nin Probiyotik ve Antioksidan Özelliklerine Etkisi

AUTHORS: Hamza Goktas, Demet Turali, Cansu Agan, Osman Sagdiç

PAGES: 245-253

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/3240587>



Farklı Sürelerde Uygulanan Ultrases İşleminin *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*'nin Probiyotik ve Antioksidan Özelliklerine Etkisi

Hamza Goktas^{1*}, Demet Turali², Cansu Agan³, Osman Sagdic⁴

^{1*}İstinye Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Programı, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0001-9802-9378), hamzagoktas@yandex.com

²İstinye Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Programı, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0009-0008-1973-3315), demetturali@icloud.com

³İstinye Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Programı, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0001-9043-8767), cagan@istinye.edu.tr

⁴Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0002-2063-1462), sagdic@gmail.com

(İlk Geliş Tarihi 7 Temmuz 2023 ve Kabul Tarihi 25 Ağustos 2023)

(DOI: 10.31590/ejosat.1321968)

ATIF/REFERENCE: Goktas, H., Turali, D., Agan, C. & Sagdic, O. (2023). Farklı Sürelerde Uygulanan Ultrases İşleminin *S. boulardii*'nin Probiyotik ve Antioksidan Özelliklerine Etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (51), 245-253.

Öz

Bu çalışmada farklı sürelerde (5, 15, 30 ve 60 dk.) ultrases uygulamasının *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*'nin probiyotik ve antioksidan özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ultrases uygulaması sonucunda *S. boulardii*'nin agregasyon yüzdesinde artış tespit edilmiştir ve 24 saatlik inkübasyon sonunda minimum agregasyon yüzdesi %96 olarak belirlenmiştir. Suşların hidrofobisite yüzdesleri %7,94 ile %11,55 arasında değişmiş olup 60 dk.'lık ultrases uygulaması sonucunda *S. boulardii*'nin hidrofobisite yüzdesinde düşüş görülmüştür. Ultrases uygulaması sonucunda *S. boulardii*'nin düşük pH ve safra tuzu direncinde önemli derecede azalma tespit edilmiştir ($P \leq 0,05$). 30 ve 60 dk.'lık ultrases uygulaması *S. boulardii*'nin mide koşullarına direncini arttırmıştır. Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii*'nin genel canlılık düzeyi %85'in üzerinde tespit edilmiştir. Test edilen antibiyotik ajanlara karşı farklı direnç düzeyleri belirlenmiştir. Ultrases uygulaması sonucu *S. boulardii*'nin antioksidan aktivitesi artmıştır ve antioksidan aktivite sonuçları %13,25 ile %39,37 arasında değişmiştir. Sonuç olarak elde edilen sonuçlar ultrases uygulamasının *S. boulardii*'nin probiyotik ve antioksidan özelliklerinin geliştirilmesi için kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Ultrases, *S. boulardii*, Probiyotik özellik, Antioksidan aktivite.

Effect of Ultrasound Application at Different Duration on Probiotic and Antioxidant Properties of *S. boulardii*

Abstract

In this study, the effect of ultrasound application at different durations (5, 15, 30 and 60 min.) on the probiotic and antioxidant properties of *S. boulardii* was investigated. As a result of the ultrasound application, auto-aggregation profile of the *S. boulardii* increased and after the 24 h incubation minimum aggregation profile was determined as 96%. Hydrophobicity percentages of the *S. boulardii* strains ranged from 7.94% to 11.55%, and there was a decrease in the percentage of hydrophobicity of *S. boulardii* as a result of 60 min ultrasound application. Ultrasound application resulted a significant decrease in the low pH and bile salt resistance of *S. boulardii* ($P \leq 0.05$). 30 and 60 minutes of ultrasound application increased the resistance of *S. boulardii* to gastric conditions and overall survival rate of ultrasound applied and non-applied *S. boulardii* strains were higher than 85%. Different resistance levels were determined against tested antibiotic agents. Ultrasound application resulted higher antioxidant activity for *S. boulardii* and results ranged between 13.25% and 39.37%. Finally, these results showed that ultrasound application could be used to improve the probiotic and antioxidant properties of *S. boulardii*.

Keywords: Ultrasound, *S. boulardii*, Probiotic properties, Antioxidant activity.

* Sorumlu Yazar: hamzagoktas@yandex.com

1. Giriş

Probiyotikler konakçının gastrointestinal sistemine yerleşerek konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkiler sunan canlı mikroorganizmalardır (Goktas, Dertli, & Sagdic, 2021). Genel anlamda probiyotiklerle ilgili ilk çalışmaların Nobel ödüllü Rus bilimci Elie Metchnikoff'un yoğurttaki bulunan laktik asit bakterileri üzerine yapmış olduğu çalışmalarla ilgili olduğu düşünülmektedir (Tomičić vd., 2016). Son yıllarda ticarileştirilerek probiyotik olarak tüketilen mikroorganizma gruplarının büyük çoğunluğunu Laktobasiller ve Bifidobakterler oluşturmaktadır (Tomičić vd., 2016). Bununla birlikte *Escherichia*, *Bacillus* ve *Enterococcus* gibi diğer bakteri cinsleriyle ilgili probiyotik çalışmalar yürütülse de özellikle gıda mikrobiyolojisi açısından patojenik türler olduğu için probiyotik güvenilirliği ile ilgili endişeler vardır (Tomičić vd., 2016). Bununla beraber mayalar gibi bazı bakteri olmayan mikroorganizmalar, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*S. boulardii*), probiyotik olarak çalışılmış ve ticarileştirilmiştir (Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth, & Schillinger, 2001).

S. boulardii I. Cihan Harbi yıllarında Fransız bilimci Henri Boulard tarafından bir kolera salgını esnasında bazı tropik meyvelerden izole edilerek keşfedilmiştir (Łukaszewicz, 2012). *S. boulardii* düşük mide asitliğinde canlı kalabilen, antibiyotik ajanlar tarafından inhibe edilmeyen, normal mikrobiyotayı olumsuz yönde etkilemeyen veya değiştirmeyen probiyotik bir mayadır (Tomičić vd., 2016). *S. boulardii*, gıda mikrobiyolojisinde fırıncılık ve şarap mayası olarak da bilinen ve ayrıca çeşitli gıda ürünlerinin fermentasyonunda rol alan *S. cerevisiae*'nin yakın akrabasıdır (Łukaszewicz, 2012). Bu iki maya arasındaki en önemli farklılıklar; *S. boulardii*'nin optimum gelişme sıcaklığının insan vücut sıcaklığı olması, asidik pH değerlerinde canlı kalabilmesi, galaktozu kullanamaması ve askospor oluşturmamasıdır (Łukaszewicz, 2012).

Ultrases gıda işleme, sonokimya ve tıbbi teşhis gibi alanlarda uygulanan yeşil bir teknolojidir (Speranza vd., 2020) ve insan kulağının yanıt verebileceği frekansın üzerindeki ses olarak tanımlanmaktadır (Ojha, Mason, O'Donnell, Kerry, & Tiwari, 2017). Gıda uygulamalarındaki ilk çalışmalar ultrases teknolojisinin hücrelerin öldürülmesi üzerindeki etkisini ortaya koymak üzere olsa da (Liu, Li, Zhou, Li, & Xu, 2017) son yıllarda yapılan çalışmalar, düşük yoğunluklu ultrases (10 W/cm²'den daha az) teknolojisini hücreyi etkilemeden bazı biyoteknolojik süreçlerin verimliliğini artırdığını ortaya koymuştur (Chisti, 2003; Gogate & Kabadi, 2009; Pagnossa, Rocchetti, Ribeiro, Piccoli, & Lucini, 2020). 18-30 kHz frekans aralığında uygulanan ultrases işleminin *S. cerevisiae*'nin gelişme fazını olumlu etkileyerek fermentasyon süresinde bir azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (Lanchun vd., 2003). Düşük yoğunluklu ultrases işleminin *S. cerevisiae* suşlarının probiyotik özelliklerinden oto-agregasyon yeteneklerini artırdığı belirtilmiştir (Speranza vd., 2020). (Hashemi & Gholamhosseinpour, 2020) ultrases işleminin *Lactobacillus* suşlarının gelişimini teşvik ettiğini ve fermentasyon sırasında biyoaktif özellikleri geliştirdiğini bildirmiştir. (Yeo & Liong, 2013) ultrases işleminin *L. casei* suşunun biyoaktif ve probiyotik potansiyelini artırabileceğini ve probiyotik gıdaların üretiminde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Ancak, (Ewe, Wan-Abdullah, Alias, & Liong, 2012) ultrases işleminin *L. fermentum* suşunun düşük pH ve safraya karşı tolerans yeteneği ve seçilen patojenlere karşı inhibitör aktive gibi çeşitli probiyotik özelliklerini azalttığını, buna karşın biyoaktif özellikleri geliştirdiğini ve fonksiyonel gıda geliştirmede ultrases işleminin kullanılabileceğini belirtmişlerdir. (Racioppo vd., 2017) ultrases işleminin *L. reuteri*'nin hidrofobisite ve Caco-2 hücrelerine yapışma özellikleri üzerinde olumlu bir etkinin olduğunu ancak pH 4'te gelişme özelliği üzerinde ise olumsuz bir etki gösterdiğini bildirmiştir.

Yapılan literatür taraması ultrases işleminin başta bakteriler olmak üzere çeşitli mikroorganizma gruplarının probiyotik özellikler üzerindeki etkisini incelediğini göstermiştir. Literatür, mayalar ile ilgili yapılan çalışmaların daha sınırlı olduğu ve özellikle probiyotik özellikleri kanıtlanmış olan *S. boulardii* ile ultrases teknolojisi arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilecek bir çalışmanın olmadığını göstermiştir. Bu çalışma ile ultrases işleminin *S. boulardii*'nin probiyotik ve antioksidan özellikleri üzerindeki etkisini araştırmayı ve bu sayede literatürdeki belirlen eksikliği giderilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla ultrases teknolojisini *S. boulardii*'nin; düşük pH ve safra tuzu toleransının, antibiyotik hassasiyet direncinin, hücre yüzey hidrofobitesinin, oto-agregasyon kapasitesinin, *in vitro* koşullara direncinin ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. Materyal ve Metot

2.1. *S. boulardii* ve Ultrases İşleminin Uygulanması

Bu çalışmada daha önceki çalışmamızdan izole edilen *S. boulardii* suşu (S2) kullanılmıştır (Goktas, Dertli, vd., 2021). *S. boulardii* kültürlerini geliştirmek için YPD Broth ortamı (yeast extract 10 g/L, pepton 20 g/L ve dekstroz 20 g/L, Difco, ABD) kullanılmıştır. Gecelik kültürler, ultrases işlemi uygulamak için % 1 oranında taze YPD besiyeri ortamına aşılanmıştır. *S. boulardii* inoküle edilmiş YPD besiyerlerine 24 kHz'de 5, 15, 30 ve 60 dakika olmak üzere dört farklı sürede ultrases işlemi uygulanmıştır. Ultrases işleminin etkisinin kıyaslanması için kontrol grubu olarak ultrases uygulanmayan *S. boulardii* kullanılmıştır (B: Kontrol, B5: 5 dakika ultrases uygulanan *S. boulardii*, B15: 15 dakika ultrases uygulanan *S. boulardii*, B30: 30 dakika ultrases uygulanan *S. boulardii*, B60: 60 dakika ultrases uygulanan *S. boulardii*). Ultrases uygulanan *S. boulardii* kültürleri, 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir ve pelletler, 4°C'de 15 dakika 7000 rpm'de santrifüjleme yoluyla toplanmıştır. Son olarak % 20 gliserol eklenerek stok kültürler oluşturulmuştur ve probiyotik ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için -80°C'de saklanmıştır.

2.2. Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi

2.2.1. Oto-Agregasyon Yüzdesinin Belirlenmesi

S. boulardii kültürlerinin oto agregasyon profili (Unban vd., 2021) tarafından belirtilen metodolojide küçük değişiklikler gerçekleştirilerek belirlenmiştir. Gecelik kültürler, 4 °C'de ve 7000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir, iki kez PBS ile yıkanmıştır ve

pelletlere 10 mL PBS ilave edilmiştir. Elde edilen süspansiyon homojen olacak şekilde vortekslenmiştir ve 1 mL süspansiyon pipet yardımıyla alınarak 600 nm'de (A_0) absorbans değeri spektrofotometre ile ölçülmüştür. Daha sonra karışımlar 37 °C'de 24 saat çalkalanmadan inkübe edilmiştir ve 2., 4. ve 24. (A_t) zaman dilimlerinde karışımın üst fazından 1 mL alınarak absorbans değerleri kaydedilmiştir. Aşağıdaki denklem kullanılarak *S. bouldardii* kültürlerinin oto-agregasyon yüzdesi belirlenmiştir:

$$\% = [(A_0 - A_t) / A_0] * 100$$

A_0 , 0. saatteki absorbans değerini ve A_t , 2., 4. ve 24 saatteki absorbans değerlerini göstermektedir.

2.2.2. Hidrofobisite Profillerinin Belirlenmesi

S. bouldardii kültürlerinin hidrofobisite profili (Vinderola & Reinheimer, 2003) tarafından sunulan bir yöntemle belirlenmiştir. Gecelik kültürler, yukarıdaki santrifüj koşulunda santrifüjlenmiştir, iki kez 50 mM K_2HPO_4 ile yıkanmış ve aynı solüsyonla süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonunun absorbans değerleri 600 nm'de 1,0 olarak ayarlanmış ve daha sonra süspansiyonun absorbans değerleri 560 nm'de (A_1) kaydedilmiştir. 3 mL hücre süspansiyonu, 0,6 mL *n*-heksadekan ile karıştırılmıştır, 2 dakika vortekslenerek 20 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üst sulu faz dikkatli bir şekilde çıkartılmış ve 560 nm'de (A_2) absorbans değerleri kaydedilmiştir. *S. bouldardii* kültürlerinin hidrofobisite profilleri aşağıdaki matematiksel ifade ile hesaplanmıştır:

$$\text{Hidrofobisite (\%)} = [(A_1 - A_2) / A_1] * 100.$$

2.2.3. Düşük pH ve Safra Tuzu Toleransının Belirlenmesi

S. bouldardii kültürlerinin düşük pH'ya direncinin belirlenmesinde (Argyri vd., 2013) tarafından belirtilen metot üzerinde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Kısaca, gecelik *S. bouldardii* kültürleri, yukarıdaki santrifüjleme koşullarında santrifüjlenmiştir, iki kez PBS ile yıkanmıştır ve elde edilen pellet PBS içinde yeniden süspanse edilmiştir. Süspansiyonun optik yoğunluğu OD₆₀₀ nm'de 1,0'a ayarlanmıştır. 0,1 mL süspansiyon, 1M hidroklorik asit (HCl) kullanılarak pH 2'ye ayarlanan 10 mL PBS ortamına inoküle edilmiştir, vortekslenerek 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda seri dilüsyonlar oluşturularak uygun dilüsyonlar YPD agar ortamına ekilmiştir ve 30°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra canlı hücreler sayılarak sonuçlar log KOB/mL olarak ifade edilmiştir. Her bir *S. bouldardii* kültürü için kontrol grupları düşük pH ortamına maruz bırakılmamış optik yoğunluğu ayarlanmış kültürlerden ekim yapılarak oluşturulmuştur.

S. bouldardii kültürlerinin safra tuzlarına direncinin belirlenmesi (García-Hernández vd., 2016) tarafından belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiştir. Yukarıda belirtilen optik yoğunluğu ayarlanmış *S. bouldardii* kültürlerinden 0,1 mL alınarak % 0,3 safra tuzları içeren 10 mL PBS'ye inoküle edilmiştir, oluşturulan yeni süspansiyon vortekslenerek 3 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Kontrol grupları yukarıda belirtildiği gibi oluşturulmuş ve tüm kültürler YPD agar üzerine ekilmiştir, 30°C'de 48 saat inkübe edilerek canlı hücre sayısı log KOB/mL olarak ifade edilmiştir.

2.2.4. Antibiyotik Ajanlara Karşı Direncin Belirlenmesi

S. bouldardii kültürlerinin bazı antibiyotiklere karşı antibiyotik direnci (Goktas, Dikmen, Demirbas, Sagdic, & Dertli, 2021) tarafından belirtilen yöntemle belirlenmiştir. Aktif *S. bouldardii* kültürlerinin optik yoğunluk (OD) değerleri 600 nm'de 1,0'a ayarlanmış ve her bir kültürden 100 µL YPD agar üzerine yayılmıştır. Agar üzerine amfoterisin B (AMB, 20 mcg), klotrimazol (CLT, 10 mcg), flukanazol (FLU, 25 mcg), ketokonazol (KTC, 10 mcg), nistatin (NY, 100 U) (Bioanalyse, Türkiye) yerleştirilmiştir. *S. bouldardii* kültürlerini içeren besiyerleri 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan zon alanları ölçülmüş ve sonuçlar mm cinsinden ifade edilmiştir.

2.2.5. In vitro Koşullara Direncin Belirlenmesi

S. bouldardii kültürlerinin *in vitro* koşullara karşı direnci (Minekus vd., 2014) tarafından tanımlandığı şekilde belirlenmiştir. Aktif *S. bouldardii* kültürleri, yukarıdaki santrifüjleme koşullarında santrifüjlenerek iki kez PBS ile yıkanmış ve 10 mL'lik nihai süspansiyonun optik yoğunluğu 600 nm'de 1,0'a ayarlanmıştır. Bu süspansiyonun 0,1 mL'si kontrol grubunu temsil edecek şekilde YPD agar üzerine yayılarak 30°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Optik yoğunluğu ayarlanmış kültür içeren süspansiyon metoda uygun olacak şekilde mide ve bağırsak ortamlarına tabi tutularak her bir ortamdan inkübasyon sonunda seri dilüsyonlar hazırlanarak YPD agar ortamına ekim gerçekleştirilmiş ve yukarıdaki inkübasyon koşullarında inkübe edildikten sonra canlı *S. bouldardii* sayısı log KOB/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca, *S. bouldardii* kültürlerinin hayatta kalma oranları aşağıdaki denklemler yardımıyla hesaplanmıştır:

$$\text{Mide Koşullarında Canlılık (\%)} = [(Kontrol \log KOB/mL) - \text{Gastrik} \log KOB/mL] / Kontrol \log KOB/mL * 100$$

$$\text{Bağırsak Koşullarında Canlılık (\%)} = [(Gastrik \log KOB/mL) - \text{Pankreatik} \log KOB/mL] / Gastrik \log KOB/mL * 100$$

$$\text{Genel Sağkalım (\%)} = [(Kontrol \log KOB/mL) - \text{Pankreatik} \log KOB/mL] / Kontrol \log KOB/mL * 100$$

2.2.6. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

S. bouldardii hücreleri içermeyen süpernatantın antioksidan aktivitesi, bazı modifikasyonlarla (Unban vd., 2021) tarafından açıklanan yöntemle belirlenmiştir. Kısaca, aktif *S. bouldardii* kültürleri, yukarıdaki santrifüjleme prosedürüne göre santrifüjlenmiştir ve süpernatantlar bir şırınga ile dikkatlice toplanarak 0,45 µm filtrelerden süzülümüş ve 0,4 mL süpernatant yeni tüplere aktarılmıştır. 0,2 mM 0,8 mL DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) çözeltisi (%80 metanol ile hazırlandı) (1,1-difenil-2-

pikrilhidrazil) ile karıştırılarak 30 saniye vortekslenmiş ve oda sıcaklığında karanlıkta 20 dakika inkübe edilmiştir. Karışımların absorpsiyon değerleri 517 nm'de (A₂) kaydedilmiştir. Kontrol (A₁) olarak *S. boulardii* kültürlerinin aşılınmadığı YPD besiyeri kullanılmıştır. *S. boulardii* kültürlerinin antioksidan aktivitesi aşağıdaki matematiksel model ile belirlenmiştir:

$$\text{Antioksidan aktivite (\%)} = [(A_1 - A_2) / A_1] * 100$$

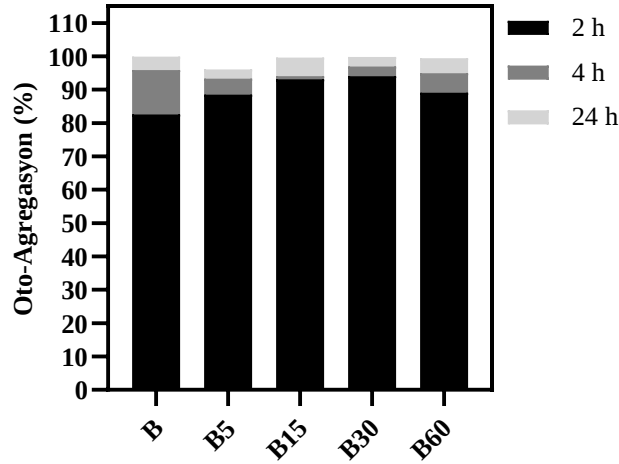
2.2.7. İstatistiksel Analiz

Tüm analizler iki tekrarlı olarak yapılmıştır ve sonuçlar ortalama standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel farklılıklar JMP yazılımının istatistik programı kullanılarak Student't testi ile % 95 önem düzeyinde belirlenmiştir.

3. Araştırma Bulguları ve Tartışma

3.1. Oto-Agregasyon Profili

Probiyotiklerin seçim kriterleri arasındaki oto-agregasyon ilgili probiyotiklerin konakçının bağırsak epitel hücrelerine tutunma özelliğini gösterdiği için önem arz etmektedir (Gil-Rodríguez, Carrascosa, & Requena, 2015). Ultrases uygulanan ve uygulanmayan (kontrol) *S. boulardii* suşları için oto-agregasyon profilleri Şekil 1'de sunulmuştur. 2 saatlik inkübasyon sonunda oto-agregasyon profilleri kontrol ve B30 örneği arasında sırasıyla %82,56 ve %94,09 arasında değişmiştir ve genel anlamda ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* yüksek oranda agregasyon özelliği sergilemiştir. Bununla birlikte ultrases işleminin *S. boulardii*'nin agregasyon özelliğini arttırdığı belirlenmiştir ve en yüksek agregasyon yüzdesi B30 örneği için belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin artmasıyla birlikte örneklerin agregasyon yüzdesi artmıştır ve tüm örnekler için agregasyon yüzdesi % 93'ün üzerine çıkmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonunda ise ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii*'lerin agregasyon yüzdesi % 96'nın üzerinde bir agregasyon profili sergilemiştir. (Speranza vd., 2020) ultrases işleminin *S. cerevisiae*'nin farklı suşlarının agregasyon özelliğini farklı düzeylerde etkilediğini ve bazı suşlar için bizim çalışmamızda da olduğu gibi agregasyon özelliğini arttırdığını bildirmiştir. Bununla birlikte (Giordano & Mauriello, 2023) ultrases işleminin *Lactocaseibacillus casei*'nin agregasyon özelliği üzerinde negatif bir etkisinin olduğunu ve dolayısıyla agregasyon yüzdesini azalttığını bildirmişlerdir. Elde edilen bulgular ve literatür verileri ultrases işleminin mikroorganizmaların agregasyon özelliğini farklı düzeylerde etkileyebileceğini göstermekte ve sonuçlar suş bazında değişiklik gösterebilmektedir.

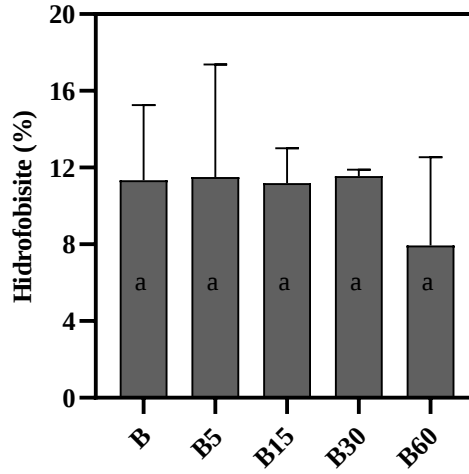


Şekil 1. Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii*'nin oto-agregasyon profili. (B: Ultrases uygulanmayan *S. boulardii*, B5: 5 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*, B15: 15 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*, B30: 30 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*, B60: 60 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*) Figure 1. Auto-aggregation profile of ultrasound applied and non-applied *S. boulardii* strains (B: ultrasound non-applied *S. boulardii* strain, B5: 5 min ultrasound applied *S. boulardii* strain, B15: 15 min ultrasound applied *S. boulardii* strain, B30: 30 min ultrasound applied *S. boulardii* strain, B60: 60 min ultrasound applied *S. boulardii* strain)

3.2. Hidrofobisite Profilleri

Hidrofobisite de probiyotiklerin seçim kriterleri arasında yer alan ve mikroorganizmaların bağırsak mukozasına tutunmasını gösteren önemli bir özelliktir (Gut, Vasiljevic, Yeager, & Donkor, 2019). Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* suşlarının hidrofobisite profilleri %7,94 ile %11,55 arasında değişmiştir (Şekil 2). Genel anlamda ultrases uygulamasının *S. boulardii*'nin hidrofobisite değerleri üzerinde olumlu veya olumsuz bir etkisi olmamış ve birbirine yakın değerler elde edilmiştir ($P > 0,05$). Ancak özellikle 60 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii* suşunun hidrofobisite değeri düşmüş ve %7,94 olarak belirlenmiştir. Literatürde ultrases uygulamasının mikroorganizmaların hidrofobisite değerleri üzerinde farklı etkiler ortaya çıkardığı belirtilmiştir. (Giordano & Mauriello, 2023) ultrases uygulamasının *L. casei*'nin hidrofobisite değerini arttırdığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde ultrases uygulamasının *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ve *Acidipropionibacterium jensenii* (Bevilacqua vd., 2019), *L. reuteri*'nin (Racioppo vd., 2017) hidrofobisite değerlerini arttırdığı bildirilmiştir. Buna karşılık, ultrases uygulamasının *L.*

plantarum'un hidrofobisite değerini düşürdüğü, ancak bazı *Bifidobacterium* suşlarının hidrofobisite değerleri üzerinde bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Racioppo vd., 2017). Bu çalışmada elde edilen veriler literatür verileri ile uyumaktadır, ancak ultrases uygulamasının suşa göre değişebileceğini göstermiştir. Mikroorganizmaların hidrofobisite değerlerinin farklılık göstermesi uygulanan fiziksel prosesler ve kullanılan kimyasal maddelerle ilgili olabilir (Racioppo vd., 2017).



Şekil 2. Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii*'nin hidrofobisite profili. (B: Ultrases uygulanmayan *S. boulardii*, B5: 5 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*, B15: 15 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*, B30: 30 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*, B60: 60 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*) (Figure 2. Auto-aggregation profile of ultrasound applied and non-applied *S. boulardii* strains (B: ultrasound non-applied *S. boulardii* strain, B5: 5 min ultrasound applied *S. boulardii* strain, B15: 15 min ultrasound applied *S. boulardii* strain, B30: 30 min ultrasound applied *S. boulardii* strain, B60: 60 min ultrasound applied *S. boulardii* strain))

3.3. Düşük pH ve Safra Tuzu Toleransı

Probiyotik mikroorganizmalardan mide asitliğinden etkilenmeden bağırsağa geçerek burada sağlık üzerine olumlu etkiler sunması beklenmektedir (Yeo & Liong, 2013). Bu bağlamda probiyotik aday mikroorganizmanın düşük pH değerlerinde canlılığını sürdürebilmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* suşlarının düşük pH ve safra tuzu toleransı belirlenmiştir (Tablo 1). Düşük pH ve safra koşullarına maruz bırakılmayıp kontrol grubunu oluşturan ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* suşlarının canlılığı 6,65-7,03 log KOB/mL arasında değişmektedir. Düşük pH ortamına maruz bırakılmasıyla birlikte ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* suşlarının canlılığı 5,92-6,01 log KOB/mL arasındaki değerlere düşmüştür. Ultrases uygulanmayan kontrol grubu *S. boulardii*'nin (B) canlılığı 6,81 log KOB/mL'den 6,01 log KOB/mL'ye düşmüştür. Ultrases uygulanan *S. boulardii* suşlarının canlılığındaki değişim ise şu şekilde gerçekleşmiştir: B5 için 6,65'ten 5,92'ye, B15 için 6,79'dan 5,97'ye, B30 için 7,03'ten 5,97'ye ve B60 için 7,00'dan 5,93'e (log KOB/mL) düşmüştür. Elde edilen veriler ultrases uygulamasının *S. boulardii*'nin düşük pH'ya direncini azalttığını ve belirtilen logaritmik canlılık değerlerinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştiğini göstermiştir ($P \leq 0,05$). Örneğin B suşu için yüzdelik değişim %12 düzeyinde iken, B60 suşu için yüzdelik değişim %16 düzeyinde gerçekleşmiştir ve diğer suşlar için yüzdelik değişimler bu aralıklarda gerçekleşmiştir.

Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* suşları için safra tuzu toleransı için canlılık değerleri 6,30 (B) log KOB/mL ile 6,34 (B15) log KOB/mL arasında değişmiştir. Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* suşları için safra tuzu direnci yüzdelik değişimleri ise %6 ile %10 arasında gerçekleşmiştir. Düşük pH'nın aksine, özellikle 5 ve 15 dakikalık ultrases uygulaması (B5 ve B15) *S. boulardii*'nin safra tuzu toleransını ultrases uygulanan *S. boulardii*'ye kıyasla yüzdelik olarak hafif artırmıştır. Buna karşılık daha uzun süre ultrases uygulaması (30 ve 60 dakika, B30 ve B60) *S. boulardii*'nin safra tuzu toleransını yüzdelik olarak düşürmüştür. Safra tuzu toleransı için elde edilen logaritmik canlılık değerleri ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* suşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,05$).

(Racioppo vd., 2017) ultrases uygulamasından düşük pH ve safra tuzu koşullarında *L. reuteri*'nin canlılığının etkilenmediğini, *L. plantarum*'un canlılığında azalmanın olduğunu ve *B. infantis*'in ise sadece safra tuzu içeren ortamda canlılığının etkilendiğini bildirmişlerdir. (Yeo & Liong, 2013) ise ultrases uygulanan *L. casei*'nin asidik ve safra tuzu toleransının ultrases uygulanmayan kontrole göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Ultrases uygulaması gibi fiziksel süreçler mikroorganizmaların canlılığını farklı düzeylerde etkileyebilmektedir (Racioppo vd., 2017)

3.4. Antibiyotik Ajanlara Karşı Direnç

Probiyotiklerin antibiyotik ajanlara karşı dirençli olması, konakçının mikrobiyota dengesinin korunması açısından önem arz etmektedir. Mayalar, bakteriyel antibiyotiklere karşı doğal direnç mekanizmasına sahiptir ve antibiyotiklerle ilişkili hastalıkların tedavisinde uygulanabilme potansiyeline sahiptirler. Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* için antibiyotik hassasiyet sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur ve her bir antibiyotik için farklı sonuçlar elde edilmiştir. Amfoterisin B için sonuçlar bir birine çok yakındır ve ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* suşları arasında herhangi bir anlamlı fark tespit edilememiştir ($P > 0,05$).

Flukonazol için sonuçlar 22,00-16,00 mm arasında değişmiştir ve ultrases uygulamasıyla ölçülen zon çapının arttığı belirlenmiştir. Özellikle B30 ve B60 için elde edilen zon çapları kontrole kıyasla anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Ultrases uygulamasına bağlı olarak zon çaplarında benzer bir artış klotrimazol için belirlense de, özellikle 60 dakika gibi daha uzun süreli bir ultrases uygulaması sonucu kontrole benzer sonuçlar elde edilmiştir. Klotrimazol için ölçülen zon çapları 15,50 mm ile 19,50 mm arasında değişmiş ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılıklar kontrole kıyasla B15 ve B30 için tespit edilmiştir ($P \leq 0,05$). *S. bouldarii*'ye farklı sürelerde ultrases uygulaması Ketokonazol ve Nistatin için farklı sonuçlar ortaya çıkartmıştır. Ultrases uygulaması sonucunda her iki antibiyotik için ölçülen zon çaplarında bir düşüş tespit edilmiştir. Ketokonazol için ölçülen zon çapları 24,00 mm ile 21,00 mm arasında değişmiştir ve ultrases uygulaması sonucunda daha küçük zon çapları ölçülmüştür. Nistatin içinse en büyük ve en küçük zon çapları 15,50 mm ve 19,50 mm olarak belirlenmiştir. Ketokonazol'de olduğu gibi ultrases uygulaması Nistatin için ölçülen zon çaplarında bir düşüşle sonuçlanmıştır. Yapılan bir çalışmada ultrases uygulamasının test edilen antibiyotiklere karşı farklı bakterilerin farklı antibiyotik hassasiyeti sergilediği belirtilmiştir (Bevilacqua vd., 2019). Bu çalışmada ultrases uygulaması farklı antibiyotiklere karşı farklı sonuçlar ortaya çıkartmıştır ve uygulanan antibiyotige göre ölçülen zon çapında artış veya azalışın farklı olabileceği görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, ultrases uygulaması sonucu mayaların stres koşullarında farklı davranış sergilemeleri veya agar ortamındaki gelişmeleriyle ilişkili olabilir.

3.5. In Vitro Koşullarda Canlılık

Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. bouldarii* suşları gastrik ve pankreatik koşullara maruz bırakılarak bu koşullardaki canlılık yüzdeleri belirlenmiştir ve sonuçlar Tablo 1'de sunulmuştur. Ultrases uygulamasıyla *S. bouldarii*'nin mide koşullarındaki canlılığında bir miktar azalma saptanmıştır. Ancak özellikle B30 örneği için mide koşullarındaki canlılık yüzdesi %99,11 olarak belirlenmiş ve bu değer mide koşullarındaki en yüksek canlılık yüzdesidir. Bununla birlikte B60 örneği için de mide koşullarında canlılık yüzdesi ultrases uygulanmayan kontrol örneğine göre yüksek düzeyde olarak tespit edilmiştir. Suşların mide koşullarında sergilemiş oldukları canlılık yüzdeleri bağırsak koşullarında değişkenlik göstermiştir ve en yüksek canlılık yüzdesi B5 örneği için %95,08 olarak tespit edilmiştir. Bağırsak koşullarında canlılık yüzdesinde sadece B30 örneği için kontrole kıyasla bir düşüş belirlenmiştir. Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. bouldarii* suşlarının genel canlılık yüzdeleri %85,47 ile %90,19 arasında değişmiştir ve en yüksek canlılık yüzdesi B60 örneği için tespit edilmiştir. Ultrases işlemi *S. bouldarii*'nin mide ve bağırsak ortamlarındaki canlılığını farklı düzeylerde etkilemiştir. Örneğin, 5 ve 15 dakikalık ultrases uygulaması mide ortamında daha düşük canlılık ile sonuçlanırken bağırsak ortamında daha yüksek canlılık ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte mide ortamında en yüksek canlılık yüzdesi B30 örneğinde tespit edilirken, bağırsak ortamındaki en düşük canlılık yüzdesi de B30 örneği için tespit edilmiştir. Bu farklılıklar mide ve bağırsak ortamlarının asitlik derecelerinin farklı olması, bu ortamlarda var olan sindirim enzimlerinin *S. bouldarii*'nin canlılığını farklı düzeylerde etkilemesi ile ilişkili olabilir.

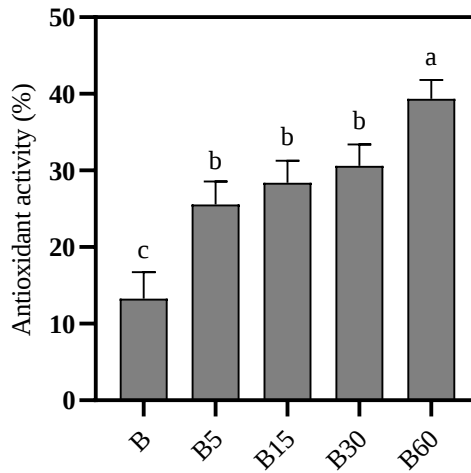
Tablo 1. Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. bouldardii*'nin düşük pH ve safra tuzu toleransı, *in vitro* koşullara direnç
 Table 1. Results of low pH and bile salt tolerance, resistance to *in vitro* conditions and antibiotic susceptibility of ultrasound app

<i>S. bouldardii</i> Suşları	Düşük pH ve Safra Tuzu Toleransı (log KOB/mL)			In vitro Koşullara Direnç (%)				Antibiyotik	
	Kontrol	pH	Safra	Mide	Bağırsak	Genel	AMB	FLU	
B	6,81±0,09 ^a	6,01±0,19 ^b	6,30±0,01 ^b	94,45	92,39	87,27	7,50±0,71 ^a	16,00±1,41 ^b	15,
B5	6,65±0,13 ^a	5,92±0,09 ^c	6,31±0,08 ^b	91,10	95,08	86,62	7,00±1,41 ^a	17,00±1,41 ^b	15,
B15	6,79±0,21 ^a	5,97±0,01 ^b	6,34±0,00 ^b	92,09	92,82	85,47	7,50±0,71 ^a	18,00±0,00 ^b	19,
B30	7,03±0,15 ^a	5,97±0,08 ^c	6,33±0,01 ^b	99,11	89,37	88,57	7,50±0,71 ^a	22,00±0,00 ^a	19,
B60	7,00±0,24 ^a	5,93±0,10 ^b	6,33±0,01 ^b	95,61	94,34	90,19	7,50±0,71 ^a	21,00±0,00 ^a	16,

B: Ultrases uygulanmayan *S. bouldardii*, B5: 5 dk. ultrases uygulanan *S. bouldardii*, B15: 15 dk. ultrases uygulanan *S. bouldardii*, B30: 30 dk. ultrases uygulanan *S. bouldardii*, B60: 60 dk. ultrases uygulanan *S. bouldardii*. (B: ultrasound non-applied *S. bouldardii* strain, B5: 5 min ultrasound applied *S. bouldardii* strain, B15: 15 min ultrasound applied *S. bouldardii* strain, B30: 30 min ultrasound applied *S. bouldardii* strain, B60: 60 min ultrasound applied *S. bouldardii* strain). AMB: Amphoteresin B, FLU: Flukonazol, Nistatin. Düşük pH ve Safra tuzu toleransı için aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel farklılığı göstermektedir ($P \leq 0,05$). Antibiyotik duyarlılığı için aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel farklılığı göstermektedir ($P \leq 0,05$).

3.6. Antioksidan Aktivite

Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii* suşlarının antioksidan özellikleri Şekil 3'te sunulmuştur. Antioksidan aktivite sonuçları % 13,25 ile % 39,37 arasında değişmiş olup bu değerler sırasıyla B ve B60 örnekleri için belirlenmiştir. *S. boulardii*'ye ultrases uygulanması daha yüksek antioksidan aktivite ile sonuçlanmıştır ve elde edilen değerler kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Ultrases uygulama süresinin artmasıyla antioksidan aktivite değerleri artmış olsa da anlamlı düzeyde istatistiksel farklılık sadece B60 için tespit edilmiştir ($P \leq 0,05$). (Goktas, Dikmen, vd., 2021) *S. boulardii*'nin yaklaşık %17 düzeyinde antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Mayaların antioksidan aktivitesi hücre duvarlarında yer alan β -glukan veya bazı enzimlerle ilişkilendirilmektedir (Goktas, Dikmen, vd., 2021). Mayaların antioksidan aktivitesindeki değişiklikler ultrases uygulama parametreleri (güç, frekans ve uygulama süresi) veya suşa bağlı parametrelere (hücre duvarı bileşimi, hücre duvarı kalınlığı veya boyuttaki farklılıklar) bağlı olabilmektedir. Ayrıca, ultrases uygulamasının bir sonucu olarak daha fazla biyoaktif bileşimin ortama salınabileceği bildirilmiştir (Gholamhosseinpour & Hashemi, 2019). Bu çalışmada elde edilen farklı düzeylerdeki antioksidan aktivite sonuçları yukarıdaki bahsedilen nedenlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3. Ultrases uygulanan ve uygulanmayan *S. boulardii*'nin antioksidan aktivitesi. (B: Ultrases uygulanmayan *S. boulardii*, B5: 5 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*, B15: 15 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*, B30: 30 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*, B60: 60 dk. ultrases uygulanan *S. boulardii*) (Figure 3. Auto-aggregation profile of ultrasound applied and non-applied *S. boulardii* strains (B: ultrasound non-applied *S. boulardii* strain, B5: 5 min ultrasound applied *S. boulardii* strain, B15: 15 min ultrasound applied *S. boulardii* strain, B30: 30 min ultrasound applied *S. boulardii* strain, B60: 60 min ultrasound applied *S. boulardii* strain))

4. Sonuç

Ultrases son yıllarda özellikle gıda endüstrisinde gittikçe artan bir uygulama potansiyeline sahiptir. *S. boulardii* probiyotik özellikleri kanıtlanan tek maya türü olup ticarileştirilerek kapsül veya şase formunda satılmaktadır. Bu çalışmada farklı sürelerde ultrases uygulamasının *S. boulardii*'nin probiyotik ve antioksidan özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular uygun süre ve frekansta ultrases uygulamasının probiyotik özelliklerini geliştirmek için kullanılabileceğini, ayrıca ultrases işleminin bir sonucu olarak *S. boulardii*'nin antioksidan özelliğinin arttırılabileceğini göstermiştir. İleri çalışmalarda ultrases ve *S. boulardii*'nin fermentasyon ortamında birlikte kullanılması durumunda fermentasyon ortamına etkisinin araştırılmasına ışık tutacaktır.

5. Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A tarafından 1919B012113124 Başvuru Numarası ile finanse edilmiştir. Beyza Kaya'ya teknik desteğinden ötürü teşekkür ederiz.

Kaynakça

- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology*, 33(2), 282-291.
- Bevilacqua, A., Racioppo, A., Sinigaglia, M., Speranza, B., Campaniello, D., & Corbo, M. R. (2019). A low-power ultrasound attenuation improves the stability of biofilm and hydrophobicity of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSM 20271 and *Acidipropionibacterium jensenii* DSM 20535. *Food microbiology*, 78, 104-109.
- Chisti, Y. (2003). Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *TRENDS in Biotechnology*, 21(2), 89-93.

- Ewe, J.-A., Wan-Abdullah, W.-N., Alias, A. K., & Liong, M.-T. (2012). Effects of ultrasound on growth, bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parent and subsequent passages of *Lactobacillus fermentum* BT 8633 in biotin-supplemented soymilk. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(4), 890-900.
- García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J. L., Nicoli, J. R., Moreira-Silva, J., . . . Albelo, N. (2016). Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in veterinary science*, 108, 125-132.
- Gholamhosseinpour, A., & Hashemi, S. M. B. (2019). Ultrasound pretreatment of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus plantarum* AF1: Carbohydrate metabolism and antioxidant activity. *Journal of food process engineering*, 42(1), e12930.
- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1156-1162.
- Giordano, I., & Mauriello, G. (2023). Ultrasound Attenuation Improves Some Surface Properties of the Probiotic Strain *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393. *Microorganisms*, 11(1), 142.
- Gogate, P. R., & Kabadi, A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 60-72.
- Goktas, H., Dertli, E., & Sagdic, O. (2021). Comparison of functional characteristics of distinct *Saccharomyces boulardii* strains isolated from commercial food supplements. *LWT*, 136, 110340.
- Goktas, H., Dikmen, H., Demirbas, F., Sagdic, O., & Dertli, E. (2021). Characterisation of probiotic properties of yeast strains isolated from kefir samples. *International Journal of Dairy Technology*, 74(4), 715-722.
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58, 56-66.
- Hashemi, S. M. B., & Gholamhosseinpour, A. (2020). Effect of ultrasonication treatment and fermentation by probiotic *Lactobacillus plantarum* strains on goat milk bioactivities. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(6), 2642-2649.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 365s-373s.
- Lanchun, S., Bochu, W., Zhiming, L., Chuanren, D., Chuanyun, D., & Sakanishi, A. (2003). The research into the influence of low-intensity ultrasonic on the growth of *S. cerevisiae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30(1-2), 43-49.
- Liu, J., Li, L., Zhou, L., Li, B., & Xu, Z. (2017). Effect of ultrasound treatment conditions on *Saccharomyces cerevisiae* by response surface methodology. *Microbial pathogenesis*, 111, 497-502.
- Łukaszewicz, M. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*—Probiotic Yeast. In *Probiotics*: IntechOpen.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., . . . Dupont, D. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
- Ojha, K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 410-417.
- Pagnossa, J. P., Rocchetti, G., Ribeiro, A. C., Piccoli, R. H., & Lucini, L. (2020). Ultrasound: Beneficial biotechnological aspects on microorganisms-mediated processes. *Current Opinion in Food Science*, 31, 24-30.
- Racioppo, A., Corbo, M. R., Piccoli, C., Sinigaglia, M., Speranza, B., & Bevilacqua, A. (2017). Ultrasound attenuation of lactobacilli and bifidobacteria: Effect on some technological and probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 78-83.
- Speranza, B., Campaniello, D., Altieri, C., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., & Corbo, M. R. (2020). Ultrasonic Modulation of the Technological and Functional Properties of Yeast Strains. *Microorganisms*, 8(9), 1399.
- Tomičić, Z. M., Čolović, R. R., Čabarkapa, I. S., Vukmirović, Đ. M., Đuragić, O. M., & Tomićić, R. M. (2016). Beneficial properties of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Food and Feed Research*, 43(2), 103-110.
- Unban, K., Chaichana, W., Baipong, S., Abdullahi, A. D., Kanpiengjai, A., Shetty, K., & Khanongnuch, C. (2021). Probiotic and antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented tea leaves (Miang) of north Thailand and promising application in synbiotic formulation. *Fermentation*, 7(3), 195.
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904.
- Yeo, S.-K., & Liong, M.-T. (2013). Effect of ultrasound on bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parent organisms and subsequent passages of *Lactobacillus*. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 289-295.