



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lactobacillus sanfranciscensis ÜREME

KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE EKŞİ

HAMUR EKMEĞİ ÜRETİMİNDE STARTER

KÜLTÜR OLARAK KULLANIMI

Filiz DÖNER

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 08.12.2017

Bornova-İZMİR

2017

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***Lactobacillus sanfranciscensis* ÜREME
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE EKŞİ
HAMUR EKMEĞİ ÜRETİMİNDE STARTER KÜLTÜR
OLARAK KULLANIMI**

Filiz DÖNER

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR

İkinci Danışmanı : Doç. Dr. Mustafa TÜRKER

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 08.12.2017

Bornova-İZMİR

2017

Filiz DÖNER tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “*Lactobacillus sanfranciscensis* Üreme Koşullarının Optimizasyonu ve Ekşi Hamur Ekmeği Üretiminde Starter Kültür Olarak Kullanımı” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.12.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR

Raportör Üye: Prof. Dr. Şebnem HARSA

Üye : Yrd. Doç. Dr. Burcu KAPLAN TÜRKÖZ

.....
.....
.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Lactobacillus sanfranciscensis* Üreme Koşullarının Optimizasyonu ve Ekşi Hamur Ekmeği Üretiminde Starter Kültür Olarak Kullanımı” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08/12/ 2017



Filiz Döner

ÖZET***Lactobacillus sanfranciscensis* Üreme Koşullarının Optimizasyonu ve Ekşi Hamur Ekmeği Üretiminde Starter Kültür Olarak Kullanımı**

Döner, Filiz

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Yekta Göksungur
İkinci Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa TÜRKER
Aralık 2017, 72 sayfa

Son yıllarda, eski bir ekmek üretim metodu olan ekşi hamur ekmeğine yönelik talep artmıştır. *Lactobacillus sanfranciscensis*, ekşi hamurun mikrobiyotasında bulunan en önemli bakteridir. Bu çalışmada, *L. sanfranciscensis*'in gelişmesi üzerine etkili besi ortamı bileşenleri Plackett Burman (PB) deneysel tasarım yöntemi ile belirlenmiş ve maltoz, hidrolize soya ortamı ve maya ekstraktının *L. sanfranciscensis*'in gelişmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak maltoz konsantrasyonu % 1.86 w/v, maya ekstraktı konsantrasyonu % 2.39 w/v ve hidrolize soya ortamı % 0.68 w/v optimum seviyeler olarak belirlenmiştir. Optimum besi ortamı bileşiminde geliştirilen *L. sanfranciscensis* hücreleri kullanılarak ekşi hamur üretilmiş ve bu hamur ekşi hamur ekmeği üretiminde kullanılmıştır. Çalışmanın son bölümünde ise ekşi hamur ekmeklerine ait kalite özellikleri incelenmiştir. Buna göre *L. sanfranciscensis* kullanılarak üretilen ekmeklerin küçük hacimli ve pişme kaybı değerinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Lactobacillus sanfranciscensis*, optimizasyon, Plackett Burman, Cevap Yüzey Yöntemi, starter kültür, ekşi hamur ekmeği.



ABSTRACT**Optimization of Growth Conditions of *Lactobacillus sanfranciscensis*
and Its Use as Starter Culture for Sourdough Bread Production**

Döner, Filiz

Msc. in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Yekta Göksungur

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa TURKER

December 2017, 72 pages

In recent years, there has been an increasing demand for sour dough, an old method of bread production. *Lactobacillus sanfranciscensis* is the most important bacteria found in sour dough microflora. In this study, the effect of different fermentation medium components on the development of *L. sanfranciscensis* was determined by Plackett Burman (PB) experimental design. Maltose, Tryptic Soy Broth, and yeast extract were found to be effective in the growth of *L. sanfranciscensis*. Response Surface Method (RSM) was used to optimize the medium components required for the growth of *L. sanfranciscensis*. Optimum fermentation medium was found to contain 1.86 % (w/v) maltose, 2.39 % (w/v) yeast extract and 0.68 % (w/v) Tryptic Soy Broth. Sour dough was produced using *L. sanfranciscensis* developed under optimum nutrient conditions and this dough was used in the production of sour dough bread. In the last part of the study, quality characteristics of sour dough breads were examined. The bread produced with *L. sanfranciscensis* has a small volume and the cooking loss value was low.

Keywords: *Lactobacillus sanfranciscensis*, optimization, Plackett Burman, Response Surface Methodology, starter culture, sour dough bread.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ufkumu açan, bana inanan ve güvenen saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR’a sabrı ve özverisi için sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Bu çalışmanın temellerini atmamızı sağlayan ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Mustafa TÜRKER’e ve Pak Maya Gıda San. Tic. Ltd. Şti.’ye, Ekmek yapım sürecinde bilgilerini benimle paylaşan ve bana destek olan Sayın Öğr. Gör. Dr. Burak Altınal ve Sayın Kübra TULUK’a, tez çalışmalarımın her aşamasında beni sabır ve özveri ile dinleyen, yardım etmek için zaman ayıran Sayın Ar. Gör. Dr. Sırma YEĞİN’e, Sayın Ar. Gör. Dr. Onur ÖZDİKİCİLER’e, laboratuvarda tecrübelerini benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Burcu KAPLAN TÜRKÖZ’e, çalışmalarımın her aşamasında büyük özveriyle yer alan yardım ve desteklerini her zaman hissettiren değerli çalışma arkadaşlarıma ve laboratuvar sorumlusu Sayın Berna ERDOĞAN’a, tez yazım aşamasında yardımcı olan Deniz DÖNER’e,

16-MÜH-115 no’lu Bilimsel Araştırma Projemize (BAP) olan desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine’ne,

Attığım her adım ve aldığım her kararda koşulsuz hep yanımda olan aileme tüm kalbimle teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Ekşi Hamurun Tarihçesi.....	3
2.2 Ekşi Hamur Üretim Teknolojileri	5
2.2.1. Tip 1 ekşi hamur üretim yöntemi.....	6
2.2.2. Tip 2 ekşi hamur üretim yöntemi.....	6
2.2.3. Tip 3 ekşi hamur üretim yöntemi.....	7
2.3. San Francisco Ekmeği.....	7
2.4. Ekşi Hamurun Mikroflorası	8
2.5. <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	12
2.6. Plackett Burman Deney Tasarımı	15

2.7. Cevap Yüzey Yöntemi.....	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1 Materyal.....	18
3.1.1 Mikroorganizma	18
3.2. Metotlar.....	19
3.2.1. Plackett – Burman (PB) istatistiksel deney tasarım yöntemi ile önemli besi ortamı bileşenlerinin belirlenmesi.....	19
3.2.2. <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişiminde önemli besi ortamı bileşenlerinin etkilerinin incelenmesi	20
3.2.3. Ekşi hamur üretimi	21
3.2.4. Ekmek üretimi	22
3.3 Analiz Yöntemleri	23
3.3.1. Biyokütle miktarı	23
3.3.2. Optik yoğunluğun belirlenmesi	23
3.3.3. Laktik asit bakterisi sayımı.....	24
3.3.4. pH	24
3.3.5 Deneysel tasarım ve istatistiksel analiz	25
3.3.6. Ekşi hamura uygulanan analizler.....	26
3.3.7. Ekmek kalite analizleri	27
3.3.8. İstatistiksel analizler	28

4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	29
4.1 Plackett – Burman (PB) İstatiksel Deney Tasarım Yöntemi ile Önemli Fermentasyon Ortamı Bileşenlerinin Belirlenmesi	29
4.2 <i>L. sanfranciscensis</i> 'in Gelişiminde Önemli Besi Ortamı Bileşenlerinin Etkilerinin İncelenmesi.....	33
4.2.1. Maya ekstraktı konsantrasyonunun <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi	33
4.2.2. Farklı azot kaynaklarının <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi	34
4.2.3. Başlangıç ortam pH'sının <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi	35
4.2.4. Farklı karbon kaynaklarının <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi.....	37
4.2.5. Hidrolize soya ortamı miktarının <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi	39
4.3. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile Fermentasyon Ortamı Bileşenlerinin Optimizasyonu.....	40
4.4. Optimum Koşullarda <i>L. sanfranciscensis</i> 'in Üreme Kinetiği.....	46
4.5. Ekşi Hamurun Özellikleri	48
4.6. Ekşi Hamur Ekmeğinin Kalite Özellikleri.....	51
4.6.1 Hacim, spesifik hacim, pişme kaybı ve nem.....	51
4.6.2 Ekmeklere ait tekstürel özellikler	52
4.6.3 Ekmeklere ait renk ölçümleri.....	55
5.SONUÇ	5
KAYNAKLAR	10

ÖZGEÇMİŞ 72

EKLER



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> 'in mikroskop altındaki görüntüsü.....	13
4.1. Pareto tablosu.....	32
4.2. Optik yoğunluk (cevap) üzerine faktörlerin etkileri	32
4.3. Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi	34
4.4. Farklı azot kaynaklarının <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi.....	35
4.5. Başlangıç ortam pH'sının <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi.....	36
4.6. Fermentasyon süresince ortam pH'sının değişimi.....	37
4.7. Farklı karbon kaynaklarının <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi.....	38
4.8. Maltoz konsantrasyonunun <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi	39
4.9. Hidrolize soya ortamı konsantrasyonunun <i>L. sanfranciscensis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi.....	40
4.10. Sabit hidrolize soya ortamı konsantrasyonunda (%0.7 w/v), maltoz ve maya ekstraktının izohips eğrisi ve yüzey grafiği	43
4.11. Sabit maya ekstraktı konsantrasyonunda (%2.25 w/v), maltoz ve hidrolize soya ortamının izohips eğrisi ve yüzey grafiği	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

4.12. Sabit maltoz konsantrasyonunda (%2 w/v), maya ekstraktı ve hidrolize soya ortamının izohips eğrisi ve yüzey grafiği	45
4.13. Optimum koşullarda canlı hücre sayısının süreye göre değişimi	47
4.14. Besleme işlemi boyunca hamur pH'sında meydana gelen değişim	49
4.15. Ekmeklerin kesit görünümü	52



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Ekşi hamurun mikroflorasında bulunan mikroorganizmalar	11
2.2. <i>L. sanfranciscensis</i> 'in izolasyon kaynakları	12
3.1 Değişkenler için alt ve üst limitler	19
3.2. Fermentasyon ortamında kullanılan azot kaynakları	21
3.3. Cevap Yüzey Yönteminde incelenen parametreler ve seviyeleri	26
4.1. Plackett – Burman (PB) istatistiksel deney tasarım yöntemi ile elde edilen deney matrisi	29
4.2. Plackett Burman deney tasarımına ait regresyon analiz tablosu.....	30
4.3. Plackett Burman deney tasarımına ait etkiler ve katsayılar tablosu.....	30
4.4. Cevap Merkezci Kompozit Tasarım ile elde edilen deney tasarım matrisi	41
4.5. Merkezci Kompozit Tasarıma (CCD) ait varyans analiz (ANOVA) tablosu	44
4.6. Hamurlara ait pH, TTA ve laktik asit bakterisi analiz sonuçları	50
4.7. Ekşi hamur ekmeklerine ait nem, hacim, spesifik hacim, pişme kaybı değerleri	51
4.8. Ekmeklere ait tekstürel özellikler	53
4.9. Ekmek örneklerine ait renk analizi sonuçları.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μ	Spesifik üreme hızı
a^*	Renk analizi sonrası elde edilen sarılık değeri
Adj R^2	Düzeltilmiş regrasyon katsayısı
b^*	Renk analizi sonrası elde edilen kırmızılık değeri
gr	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
L^*	Renk analizi sonrası elde edilen parlaklık değeri
M	Mol
mL	Mililitre
nm	nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
R^2	Regresyon katsayısı
rpm	Revolutions per minute
v/v	Hacimce yüzde
w/v	Ağırlıkça yüzde

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CO ₂	Karbon dioksit
CYY	Cevap Yüzey Yöntemi
FOS	Fruktooligosakkarit
KOB	Koloni oluşturan birim
LAB	Laktik asit bakterisi
O.D _{600nm}	600 nm'deki optik yoğunluk değeri
PB	Plackett Burman
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
rDNA	Ribozomal DNA

1. GİRİŞ

Ekmek, dünyada en çok tüketilen gıda maddelerindendir. İçerdiği karbonhidrat, protein, diyet lifi ve çeşitli vitaminler ile önemli bir besin kaynağı olmasının yanı sıra; diğer gıdalara göre ucuz ve doyurucu olması sebebiyle tercih edilmektedir. Son yıllarda, tüketici talebinin koruyucu madde içeriği düşük, doğal ürünler yönünde olduğu belirlenmiştir. Ekmek çeşitlerinden bir tanesi olan ekşi hamur ekmeği, günümüzde fazla talep edilen ekmek ürünlerinden birisidir (Göçmen, 2001; Hendek-Ertop and Hayta, 2016).

Ekşi hamur ekmeği, geleneksel olarak üretimi yıllardır devam eden fermente bir gıda ürünüdür. Özellikle zengin aromatik özellikleri ve daha uzun raf ömrü sebebiyle tercih edilmektedir. Ekmeğin kalitesini etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Ekşi hamurun mikroflorası bunlardan bir tanesidir. Ekşi hamur; un (buğday, pirinç, çavdar gibi) ile sudan meydana gelen hamurda, laktik asit bakterileri (LAB) ve mayaların metabolik aktivitesi sonucu oluşan bir ürün olarak tanımlanmaktadır (De Vuyst and Neysens, 2005; Ercolini et al., 2013). Ekşi hamur ekmeği üretiminde, fermentasyon işlemi boyunca meydana gelen bileşenler, ekmeğin besin değerini arttırmaktadır. Ayrıca, iyi bir fermentasyon işlemi yüksek hacimli, aromatik açıdan zengin, homojen ve tercih edilebilirliği yüksek ekmek iç yapısı meydana gelmesine ve raf ömrünün uzatılmasına katkı sağladığından önem arz etmektedir (Gobbetti et al., 2016).

Ekşi hamurun fermentasyonu için çeşitli yöntemler tercih edilmektedir. Geleneksel yöntemde, hamurun kendi doğal mikroflorasıyla spontan fermentasyon gerçekleştirilmektedir. Ancak bu yöntemde, fermentasyon işleminin kontrolsüz gerçekleşmesi sebebiyle, standart ürün eldesinde problem yaşanmakta, ürünün dokusal ve yapısal özelliklerinde kusurlar meydana gelebilmektedir. Karşılaşılan bu problemler sebebiyle, araştırmacılar laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanımını incelemişlerdir. Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanımı istenilen kalite ve miktarda ürün elde edilmesine, fermentasyon işleminin kontrollü gerçekleşmesine, ekmeğin iç yapısının iyileşmesine ve zengin aromatik yapının gelişmesine katkı sağlamaktadır (Paramithiotis et al., 2005; Decock and Cappelle, 2005; Leroy and De Vuyst, 2004).

Ekşi hamur fermentasyonunda pek çok mikroorganizma beraber görev almaktadır ve hakim mikroflorada mayalar ve laktik asit bakterileri (LAB) baskın

olarak bulunmaktadır. Hamurun yapısında 50'den fazla laktik asit bakterisi suşu ve 20'den fazla maya suşu bulunmaktadır. LAB'lerinden en çok *Lactobacillus*, mayalardan ise en çok *Saccharomyces* ve *Candida* suşları bulunmaktadır (Rehman, 2006; De Vuyst et al., 2014). Laktik asit bakterilerinden homofermentatif olanlar şekeri fermente ederek laktik asit oluştururken; heterofermentatif LAB'leri laktik asit, CO₂, etil alkol, asetik asit, aromatik ve uçucu bileşikler de üretmektedir (Göçmen, 2001; Hammes et al., 2005).

L. sanfranciscensis, *Lactobacillus sanfransisco* olarak da bilinen ve genellikle çavdar veya buğday unu kullanılarak üretilen ekşi hamurlardan izole edilen gram pozitif, spor oluşturmeyen, çubuk şeklinde ve mikroaerofilik bir laktik asit bakterisidir (Weiss and Schillinger, 1984). Bu bakteri ekşi hamur yapısında bulunan en önemli LAB'lardan biridir. (Gobbetti and Corsetti, 1997). 2-4 µm boyunda ve 0.6-0.8 µm çapındadır; optimum gelişme sıcaklığı 30°C olmakla beraber 13°C-40°C ortam sıcaklığında da gelişebilmektedir (Neubauer et al., 1994; Kline and Sugihara, 1971).

Bu çalışma kapsamında *L. sanfranciscensis*'in gelişimi için önemli olan besi ortamı bileşenleri Plackett-Burman Deneysel Tasarım metodu ile belirlenmiş ve önemli olarak bulunan besi ortamı bileşenlerine (maltoz miktarı, hidrolize soya ortamı miktarı (Tryptic Soy Broth), maya ekstraktı miktarı) ait optimum seviyeler Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda *L. sanfranciscensis*'in gelişme kinetiği incelenmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde ise *L. sanfranciscensis* starter kültür olarak kullanılarak ekşi hamur ekmeği üretilmiş ve ekmeklere ait kalite özellikleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin, *L. sanfranciscensis*'in starter kültür olarak kullanılacağı diğer çalışmalara yol göstermesi hedeflenmektedir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Ekşi Hamurun Tarihçesi ve Önemi

Ekmek, günlük enerji ihtiyacının önemli bir kısmını sağlaması ve temel besin maddesi olması sebebiyle gıda tüketiminin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Özellikle endüstriyel ekmek üretimi sırasında duyuşal özelliklerin kaybolması, mikrobiyolojik bozulmalar, bayatlama gibi problemler sonucu tüketici tercihleri ekşi hamur ekmeğine yönelmiştir. Ekşi hamur, un (buğday, pirinç, çavdar gibi) ile sudan meydana gelen hamurda, laktik asit bakterileri (LAB) ve mayaların metabolik aktivitesi sonucu oluşan bir ürün olarak tanımlanmaktadır (De Vuyst and Neysens, 2005; Ercolini et al., 2013, Menteş et al., 2004).

Yıllık 3 milyon tondan fazla üretilen ekşi hamurun 5000 yılı aşkın bir tarihi vardır. Ekşi hamur ekmeğinin üretimi ve tüketimine dair ilk belgeler milattan önce 2000’li yıllara dayanmaktadır. Mısırlılar, un ve su karışımının bir süre bekledikten sonra fermente olduğunu, hamur hacminin arttığını ve piştikten sonra ekmeklerin daha yumuşak bir yapıya sahip olduğunu keşfetmişlerdir. Antik Yunan’da ise ekmek sadece zengin ailelerin evlerinde tüketilen önemli bir gıda maddesi olarak değer görmüş, dini törenlerde de ekmeğe yer verildiği ifade edilmiştir. Ekşi hamurun kullanımı ise milattan önce 800’lü yıllarda Mısırlılardan öğrenilmiştir. Başka bir rivayate göre M.Ö. 168 yılında Roma’da ekşi hamur kullanılarak ekmek yapma yaygınlaşmış ve Roma İmparatorluğu tarafından Avrupa’nın diğer bölgelerine yayılmıştır. (Chavan, and Chavan, 2011; Gobetti and Ganzle, 2012; Hansen and Schieberle, 2005).

20. yüzyılın başlarında ekmek mayasının keşfedilmesi ve yaygın olarak kullanılmaya başlaması ile ekşi hamur kullanımı azalmıştır. Ekmek mayası ile ekmek üretiminin daha hızlı gerçekleşmesi, daha kontrollü şartlarda üretim yapma imkanı sağlaması sebebiyle endüstriyel ekmek üretiminin artmasına yol açmıştır. Bununla beraber 20.yy. başına kadar ekmek mayasından ucuz olması sebebiyle hamuru kabartmak amacıyla ekşi hamur kullanmaya devam edilmiştir. 1910 yılında ise ilk ticari ekşi hamur starterleri geliştirilmiştir (Carnevali et al., 2007; Yağmur, 2013).

Ekşi hamura özellikle çavdar ekmeği üretilirken ihtiyaç duyulmuştur. Çavdar ekmeğinde pişirme işlemi sırasında amilaz enzimi inhibe olmaktadır ve bu durumun önlenmesi amacıyla hamur asitlendiricileri kullanılmıştır. Ancak hamur asitlendiricilerinin ekmekte istenilen aromayı sağlayamaması sebebiyle 1970'lerin başında titrasyon asitliği yüksek fermente edilmiş ve kurutulmuş ekşi hamurlar üretilmiştir (Carnevali et al., 2007; Yağmur, 2013).

Geleneksel ürünlere olan talebin artması sebebiyle ekşi hamur ekmeğine olan talep de artış göstermiştir. Ekşi hamurdan elde edilen ekmek, aromatik açıdan zengin olması, yaş maya ekmeğine göre uzun ömürlü olması sebebiyle tercih edilmektedir. Ayrıca ekşi hamur fermentasyonun ekmek yapısını geliştirici etkisi olduğu ifade edilmiştir. Günümüzde, ekşi hamur, sadece kaliteli ekmek eldesi için değil, aynı zamanda çeşitli hastalıklara sahip insanların tüketimine uygun ekmek üretimi için alternatif bir seçenek oluşturmaktadır. Ayrıca daha sağlıklı ekmek tüketmek isteyen bireylerin tercih ettiği bir ekmek çeşidi olmuştur. Ekşi hamurda LAB ve mayalar tarafından gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda meydana gelen potansiyel mekanizmaların, ekmeğin besin kalitesinin arttığı ifade edilmiştir (Poutanen et al., 2009). Bu sayede, fenolik, sterol ve vitaminlerin kullanılabilirliği artmış, minerallerin biyoyararlanımı geliştirilmiş, diyet liflerin çözünübilirliği iyileştirilmiş, nişastanın sindirilebilirliği azaltılmıştır. Özellikle çeşitli modifikasyonlarla, ekşi hamurun üründe bulunan biyoaktif bileşenlerin miktarını arttırdığı, çeşitli ekmek türlerinde, tam tahılların fermentasyon sırasında meydana getirdiği problemleri azaltarak yüksek lif içeriğine sahip ekmek eldesine katkıda bulunduğu, nişastanın kullanılabilirliği üzerine etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Ekşi hamur üzerine yapılan güncel çalışmalarda, çölyak hastaları tarafından tüketilebilecek glutensiz ekşi hamur ekmeklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların da yer aldığı görülmektedir (Gobetti et al., 2007; Moore et al., 2007; Moroni et al. 2009; Poutanen et al., 2009; Di Cagno et al., 2010; Galle et al., 2012; Novotni et al., 2012).

Ekmek yapımında kullanılan unun yapısında bulunan demir, potasyum, magnezyum, çinko gibi mineralleri içerdiği için besin değeri yüksektir. Unun yapısında bulunan bir diğer bileşik ise fitik asittir ve mineraller ile kompleks oluşturma özelliğine sahiptir. Fitik asit şelatör görevi görmekte, minerallerin absorpsiyonunu engellemekte ve biyoerişilebilirliğini düşürmektedir. Ganzle ve De Vuyst (2004) fermentasyonu sırasında gerçekleşen fitat yıkımı ile bu minerallerin ulaşılabilirliğinin arttığını ve yıkımın undaki enzimler ve mikrobiyal enzimler yoluyla gerçekleştiğini bildirmişleridir. Fitat degradasyonunu

gerçekleştiren enzim fitaz enzimidir. Fitaz enziminin aktivitesi sırasında inositol oluşmaktadır. İnositolun insan sağlığı üzerine olumlu etkileri vardır. Kandaki kolesterolü dūřürmekte ve yaę metaboliması üzerine pozitif etkisi bulunmaktadır. Bu sebepten yüksek miktarda fitaz enzimi içeren gıdalar, besin değerinin yüksek olması ve sağlık üzerine olumlu etkileri olması sebebiyle tercih edilmektedir (Ganzle and De Vuyst, 2004; De Luca, 2009; Yazar and Tavman, 2012).

2.2 Ekşi Hamur Üretim Teknolojileri

Ekşi hamur ekmeği üretimi antik çağlardan günümüze kadar uygulanan biyoteknolojik bir procestir ve üretim metodu ülkelere göre farklılık göstermektedir. Ekşi hamur, üretim teknolojisine göre tip 1, tip 2 ve tip 3 olmak üzere 3 farklı grupta sınıflandırılmıştır.

2.2.1. Tip 1

Geleneksel yöntemle üretilen ve hamurun her gün tazelenmesiyle mikroorganizmaların aktif tutulduğu ekşi hamur üretim metodudur. Bu yöntemde, ekmek mayası ilave edilmeden hamurun kabarması sağlanmaktadır. Tip 1 grubuna ait ekşi hamurlar hazırlanırken hamur, fermentasyon işlemi boyunca (3-48 saat) yaklaşık olarak 3 kere un ve su ile tazelenmektedir ve fermentasyon oda koşullarında gerçekleşmektedir (20°C-30°C) (Corsetti and Settanmi, 2007; Yazar and Tavman, 2012).

Tüm tazeleme aşamalarında fermentasyon süresi ve ortam sıcaklığı önemli parametreler olup hamurun yapısını etkilemektedir. Fermentasyon sonunda ekşi hamurun pH değeri 4'tür olarak belirlenmiştir. Buğday ve/veya çavdar unu ile yapılan ekşi hamurların mikroflorasında baskın olarak bulunan türler; *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Candida milleri*, *Candida holmii*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus* olarak belirlenmiştir (Corsetti and Settanmi, 2007; Yazar and Tavman, 2012).

Tip 1 ekşi hamur ekmeği de kendi içerisinde 3 gruba ayrılmaktadır. Saf kültürden elde edilen ekşi hamur tip 1a, karışık kültürlerden spontan fermentasyonla çoklu basamaklar sonunda üretilen ekşi hamur tip 1b, tropikal bölgelere yüksek sıcaklıkta fermente edilen ekşi hamurlar tip 1c olarak isimlendirilmektedir (Corsetti and Settanmi, 2007; Yazar and Tavman, 2012).

2.2.2. Tip 2

Tip 2 ekşi hamurda tek fermentasyon (15-20 saat) işlemi gerçekleştirilmektedir ve elde edilen hamur uzun süre depolanmaktadır. Tip 2'de hamur asitliği (pH<3.5) yüksektir ve bu sebeple hamur asitleyici olarak kullanılmaktadır. Bu hamur tipi genellikle sıvıdır ve endüstriyel olarak biyoreaktörler kullanılarak 30°C'nin üzerinde ve uzun sürede üretilmektedir (Corsetti and Settanmi, 2007; Yazar and Tavman, 2012).

Tip 2 ekşi hamur üretim prosesi ile fermentasyon süresinin kısaltılması kontrol edilebilir ve büyük çaplarda ekşi hamur üretimi yapmak mümkündür. Bu tip ekşi hamurun mikroflorasında *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii* ve *Lactobacillus pontis* gibi düşük ortam pH'larında yaşayabilen *Lactobacillus* türleri baskın olarak bulunmaktadır. Hamurun kabarması ise undan gelen mayalar ve sonradan ilave edilen ekmek mayası ile sağlanmaktadır (Corsetti and Settanmi, 2007; Yazar and Tavman, 2012).

2.2.3. Tip 3

Tip 2 ekşi hamurlarının hazırlandıktan sonra kurutulması ile Tip 3 ekşi hamur elde edilmektedir. Genellikle endüstriyel üretimlerde tip 3 ekşi hamur tercih edilmektedir ve hamurun kurutulması amacıyla püskürtmeli kurutucular veya tamburlu kurutucular tercih edilerek, hamur toz haline getirilmektedir. Tip 3 ekşi hamurun mikroflorasında genellikle kurutma işlemine dayanıklı olan *Lactobacillus brevis*, fakültatif heterofermentatif *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus plantarum* türleri bulunmaktadır (Corsetti and Settanmi, 2007; Yazar and Tavman, 2012).

2.3. San Francisco Ekmeği

San Francisco ekmeği meşhur San Francisco ekşi hamuru kullanılarak yapılan bir ekmek çeşididir ve ekşi hamurunun mikroflorasında baskın olarak *L. sanfranciscensis* bulunmaktadır. 130 yıldan fazladır üretilen bu ekmek geleneksel yöntemle (Tip 1) üretilmekte olup hamur un ve su ile sürekli beslenmektedir. Ayrıca uzun fermentasyon süresi ve düşük sıcaklık gibi uygulamalar ile hamurun asetik asit konsantrasyonu arttırılmaktadır (Yazar and Tavman, 2012).

L. sanfranciscensis içeren ekşi hamurdan yapılan ekmeklerin, ekşi hamur ekmekleri arasında, en fazla aromatik tada sahip ekmek çeşidinden biri olduğu belirtilmiştir (Gobbetti and Corsetti, 1997). Rothe and Ruttloff (1983) ve Martinez-Anaya (1996) tarafından yapılan çalışmalarda, aroma bileşenlerinin, pişirme işlemi sırasında enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları, yağ

asitlerinin oksidasyonu ve mikrobiyal metabolizma sonucu oluşan bileşenlerden meydana geldiğini ifade etmişlerdir. Hamurda bulunan uçucu bileşenlerin konsantrasyonun ekşi hamur mikroflorasından etkilendiği, *L. sanfranciscensis* suşlarıyla hazırlanan hamurların, diğer LAB ile hazırlanan hamurlarla benzer karakteristik uçucu bileşenlere sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Ana bileşenler olarak alkoller (etil alkol, 2-metil-1- pentanol, 1-heptanol ve 1 oktanol), aldehytler (3 metil-1-bütanal, heptanal, trans-2-heptanal, oktanal, ve nonanal) asetik asit, ve düşük miktarda etil asetat oluşmaktadır (Gobbetti and Corsetti, 1997).

2.4. Ekşi Hamurun Mikroflorası

Ekşi hamur fermentasyonunda pek çok mikroorganizma beraber görev almaktadır ve hakim mikroflorada mayalar ve laktik asit bakterileri (LAB) baskın olarak bulunmaktadır. Hamurun yapısında 50'den fazla laktik asit bakterisi suşu ve 20'den fazla maya suşu bulunmaktadır. Mayalar hamurun kabarmasından sorumluyken, heterofermentatif LAB'leri hem hamurun kabarmasını sağlamakta hem de hamurun asitlenmesini sağlamaktadır. LAB'lerinden en çok *Lactobacillus* (Çizelge 2.1), mayalardan ise en çok *Saccharomyces* ve *Candida* suşları bulunmaktadır (Rehman, 2006; Arendt et al., 2007; De Vuyst et al., 2014). Laktik asit bakterilerinden homofermentatif olanlar şekeri fermente ederek laktik asit oluştururken; heterofermentatif LAB'leri laktik asit, CO₂, etil alkol, asetik asit, aromatik ve uçucu bileşikler de üretmektedir (Göçmen, 2001; Hammes et al., 2005; Yağmur, 2013).

Ekşi hamura ait mikroflorada LAB'ların baskın olduğu ve LAB'ların mayalara oranı 100:1 olduğu bilinmektedir. Ekşi hamurdaki hakim florada maya ve LAB baskın olmasından yola çıkılarak fermentasyonu kontrol etmek amacıyla saf LAB'lerinden oluşan starter kültür kullanımına yönelik çalışmaların sayısında son yıllarda artış olduğu görülmektedir (Corsetti and Settanni, 2007).

Ekşi hamurun mikroflorasının karakterizasyonun gerçekleştirilebilmesi için çok sayıda koloni seçilmesi, saflaştırılması, fenotipik ve genotipik tanımlamalarının yapılması gerekmektedir. Özellikle LAB'ları benzer özellik gösterdiği için tanımla yapılabilmesi için klasik yöntemler yetersiz kalmaktadır bu sebeple moleküler teknikler tercih edilmektedir. 16s ribozomal DNA (rDNA) sekanslaması, RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) analizler ve diğer PZR temelli teknikler yardımıyla taksonomik araştırmalar yapılmaktadır (De Vuyst et al., 2002 ; Yağmur, 2013).

Gobbetti (1998), *L. sanfranciscensis* ve *L. plantarum* 'un İtalyan ekşi hamurlarında baskın olduğunu belirtmiştir. Durum buğdayından yapılan ekşi hamurlarda ise *Lactobacillus plantarium* yerini *Lactobacillus alimentarius*'a bırakmıştır ve bu bakteri undaki tüm çözünür karbonhidratları (maltoz, fruktoz, glukoz, sakkaroz) kullanabilme yeteneğine sahiptir (Gobbetti, 1998).

Saccharomyces exiguus baskın starterlerden olup heterofermentatif LAB'leri tarafından üretilen glukozu kullanmaktadır ve LAB'ların gelişimde ve asetik asit üretiminde kullanması için elektron kaynağı ve fruktozu üretmektedir.

Ekşi hamurun florası üzerine hamurun kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri, fermentasyon sıcaklığı, hamur verimi, kullanılan starter miktarı ve kompozisyonu, besleme aşamalarının sayısı ve fermentasyon süresi gibi faktörlerin etkisi bulunmaktadır. Bu faktörler ekşi hamurun florasında bulunan mikroorganizma sayısı, türünü ve mikroorganizmalar arası etkileşimi etkilemektedir. Ekşi hamurun florasındaki mayalar ve *Lactobacillus*'lar arasında antagonistik ve sinertistik ilişkiler bulunmaktadır. *L. sanfranciscensis* ile maltoz negatif mayalar (*Saccharomyces exiguus*, *Candida humilis*) arasındaki ilişki aşağıda bahsedildiği gibidir (Gobbetti and Corsetti, 1997).

L. sanfranciscensis enerji kaynağı olarak maltozu tercih etmektedir ve maltozu metabolize ederek glukoz üretmektedir. Üretilen glukoz, fermentasyon ortamdaki diğer LAB, mayalar ve maltozun tükendiği durumda *L. sanfranciscensis* tarafından metabolik aktivitelerde kullanılmaktadır. Maltoz negatif özelliğe sahip mayalar tarafından üretilen amino asitler *L. sanfranciscensis*'in gelişimini stimüle etmektedir (Neubauer et al.,1994; Stolz et al., 1993; Gobbetti and Corsetti, 1997).

Lactobacillus 'lar tarafından üretilen metabolik ürünlerin ortamda birikmesiyle maltoz negatif mayaların gelişmesi inhibe edildiği için ortamdaki maltoz negatif sayısı *Lactobacillus* 'lardan azdır. Ayrıca *Lactobacillus* 'lar ortam pH'sını düşürerek kendi gelişmelerini de inhibe etmektedirler. Bazı suşlar hariç pH 3.8'in altında gelişmemektedir. Ayrıca, ortamda glukoz ve fruktozun tükenmesi ile mayaların gelişimini sınırlandırmaktadır (Neubauer et al.,1994; Stolz et al., 1993; Gobbetti and Corsetti, 1997).

Türkiye'deki ekşi hamur mikroflorasının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada Ankara, Bursa ve Trabzon'dan toplanan 20 adet ekşi hamur örneğinden

150 adet LAB izole edilmiştir. Baskın türlerin *L. amylophilus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *L. brevis*, *L. plantarium* ve *L. acidophilus* olduğu belirlenmiştir (Menteş ve ark., 2004). Bu türler farklı araştırmalarda farklı miktarlarda bulunmuştur. En az bulunan türlerin ise *L. amylovorus* ve *L. agilis* olduğunu bildirmişlerdir (Menteş ve ark., 2004).

Gül ve ark. (2005), Isparta’da 14 farklı fırından topladıkları ekşi hamur örneklerini incelemiş ve LAB’lerinden *L. divergens*, *L. brevis*, *L. amylophilus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *L. plantarium*, *P. pentosaceus* ve *P. acidilactici* suşlarını, maya olarak *S. cerevisiae*, *S. delbrueckii*, *T. holmii* ve *T. unisporus* türlerini izole etmişlerdir.



Çizelge 2.1. Ekşi hamurun mikroflorasında bulunan mikroorganizmalar (Arendt et al., 2007).

Tip 1a	Tip 1b	Tip 1c	Tip 2	Tip 3
Zorunlu heterofermentatif				
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus buchneri</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus fructivorans</i> <i>Lactobacillus pontis</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> <i>Weissella cibaria</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus frumenti</i> <i>Lactobacillus pontis</i> <i>Lactobacillus panis</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> <i>Weissella confusa</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
Fakultatif heterofermentatif				
	<i>Lactobacillus alimentarius</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus paralimentarius</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>			<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
Zorunlu homofermentatif				
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus farciminis</i> <i>Lactobacillus mindensis</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus amylovorus</i> <i>Lactobacillus farciminis</i>	

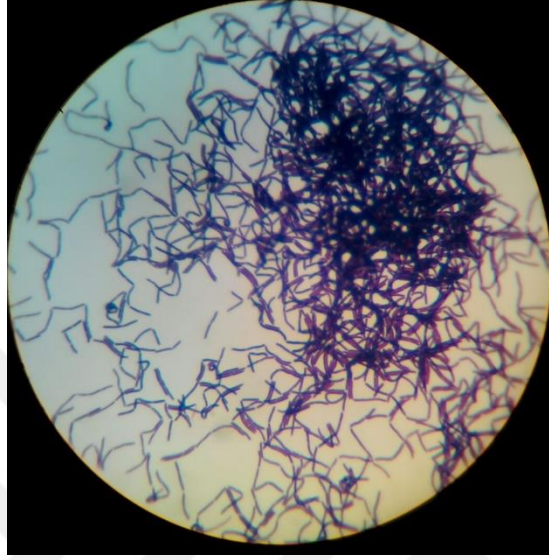
2.5. *Lactobacillus sanfranciscensis*

L. sanfranciscensis, çavdar veya buğday unu kullanılarak üretilen ekşi hamurdan izole edilen bir laktik asit bakterisidir. Martinez et al. (1990), tarafından ekşi hamur için en önemli mikroorganizmalardan olduğu belirtilmiştir. İlk olarak Kline and Sugihara (1971) tarafından San Francisco ekşi hamurundan izole edilmiştir. Çizelge 2.2’de *L. sanfranciscensis*’in izolasyonuna yönelik çalışmalar gösterilmiştir (Gobbetti and Corsetti, 1997).

Çizelge 2.2. *L. sanfranciscensis*’in izolasyon kaynakları (Gobbetti and Corsetti, 1997).

Ülke	İzolasyon kaynağı
Almanya	Çavdar unu ekşi hamuru, buğday unu ekşi hamuru
İsveç	Ticari olarak üretilen ekşi hamur
İtalya	Çavdar unu ekşi hamuru, buğday unu ekşi hamuru
İsviçre	Buğday unu ekşi hamuru
Fas	Buğday unu ekşi hamuru
Danimarka	Çavdar unu ekşi hamuru

L. sanfranciscensis gram pozitif, spor oluşturmeyan, çubuk şeklinde bir bakteridir ve çapı 0.6-0.8 μm , boyu 2-4 μm 'dir (Şekil 2.1). Hareket etme özelliği yoktur ve mikroaerofiliktir. Optimum gelişme sıcaklığı 30°C olup, 13-40°C'de sıcaklık aralığında gelişebilmektedir (Weiss and Schillinger, 1984) .



Şekil 2.1. *Lactobacillus sanfranciscensis*'in mikroskop altındaki görüntüsü.

L. sanfranciscensis'in karbonhidrat metabolizmasını incelemek için yapılan çalışmalarda belirtildiği üzere ekşi hamurda bulunan maltoz, maltoz fosforilaz enzimi ile hidrolize edilerek ve glukoz-1-fosfat üretilmektedir. Glukoz-1-fosfat daha sonra glukozla dönüşmektedir. Açığa çıkan glukoz daha sonra metabolize edilmek ve hücre içi glukoz birikmesini önlemek amacıyla hücre dışına gönderilmektedir. Fermentasyon ortamında maltozun fazla olması durumunda karbonhidrat olarak maltoz tercih edilmektedir ancak maltozun az olduğu durumlarda ortamda serbest halde bulunan glukoz da kullanılmaktadır. Ekşi hamurun yapısında bulunan mayalar maltozu kullanamamaktadır ancak *L. sanfranciscensis* tarafından maltozdan elde edilen glukoz mayalar tarafından kullanılmaktadır. Glukozu kullanan mayalar ortamda serbest amino asitlerin artmasına yol açmaktadır ve amino asit miktarının artması *L. sanfranciscensis*'in üreme hızını arttırmaktadır (Neubauer et al.,1994; Stolz et al., 1993).

L. sanfranciscensis karbon kaynağı olarak maltozu glukozla tercih etmektedir ve gelişmek için fermentasyon ortamında maya ekstraktına ve doymamış yağ asitlerine gereksinim olduğu belirtilmiştir (Sriranganathan et al., 1973). Ayrıca sakkaroz, riboz, glukonat, galaktoz, rafinoz ve fruktozu fermente edebilen suşlar olduğu literatürde belirtilmiştir. Heterofermentatif olan *L.*

sanfranciscensis, laktik asit, asetik asit, CO₂, ve etanol üretmektedir. Üretilen laktik asit miktarı 3.48-3.70 g/kg ve asetik asit miktarı 0.38-0.44g/kg değerleri arasındadır (Sriranganathan et al., 1973; Corsetti and Settani, 2007).

Ekşi hamur ekmeğinin tüketiciler tarafından tercih edilmesinin en önemli sebeplerinden biri de ekmeğin sahip olduğu aromatik özelliklerinin gelişmiş olmasıdır. Özellikle asetik asit ve aromatik bileşikler ekmeğin aromatik özelliklerini etkilemektedir. *L. sanfranciscensis* tarafından üretilen aromatik bileşiklere etil asetat, 1-propanol, 2-metil-pentanol, 1-heptanol, 1-oktanol, 3-metil-1-bütanal, hetanal, trans-2-heptanal, oktanal ve nonanal örnek olarak verilebilmektedir (Corsetti and Settani, 2007).

Peptitlerin ve amino asitlerin de ekmeğin aromatik ve lezzet özellikleri üzerine önemli etkisi bulunmaktadır. Ekşi hamur fermentasyonu sırasında hamurda amino asitlerin biriktiği tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılar bu birikmenin özellikle LAB'leri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Collar and Martinez, 1993; Gobbetti and Corsetti, 1997). *L. sanfranciscensis*, D-alenin ve D-glutamik asit gibi amino asitleri sentezlemekte ve serbest amino asit miktarını arttırmaktadır. Ayrıca bakterilerin çoğalması için stimulatör etkisi bulunan alifatik, dikarboksilik ve hidroksi amino asit gruplarının miktarının artmasına sebep olmaktadır. Gobbetti et al. (1996), ise serbest amino asitlerin sentezlenmesinde görev alan enzimleri tespit etmeye yönelik yaptıkları çalışmada bu enzimlerin *L. sanfranciscensis* CB1 tarafından üretilen serin proteinaz (58 kDa), dipeptidaz (67 kDa) ve aminopeptidaz (75 kDa) olduğunu belirlemiş ve bu enzimlerin saflaştırmasını, karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir (Gobbetti et al., 1996; Corsetti and Settani, 2007).

L. sanfranciscensis tarafından üretilen başka bir enzim ise levansükraz'dır. Levansükraz enzimi yardımıyla fermentasyon ortamında bulunan sakkaroz metabolize edilerek levan ve fruktooligosakkaritler (FOS) üretilmektedir. *L. sanfranciscensis* LTH2590 tarafından FOS'lardan 1-kestoz üretilmektedir ve 1-kestozun prebiotik özellik gösterdiği bilinmektedir. Fruktoz ünitelerinin uç uca bağlanmasıyla ise levan polimeri oluşmaktadır. Levan, yüksek molekül ağırlığına sahiptir ve ekmeğin tektürü üzerine olumlu etkisi bulunmaktadır (Gobbetti and Corsetti, 1997; Koraklı et al., 2003; Tieking and Ganzle, 2005).

L. sanfranciscensis'e ait bir diğer özellik ise antimikrobiyal etki göstermesi ve ekmeğin raf ömrünü uzatmasıdır. Ekşi hamurda bulunan LAB'lar, ürettikleri

laktik asit ve asetik asit gibi maddeler ile ekmek hamurunun pH'sını düşürerek, bazı mikroorganizmaların gelişmesini önlemekte ve bu sebeple antimikrobiyal etki göstermektedir. Bunun yanı sıra bazı LAB'ları tarafından üretilen bakteriyosinler ile mikroflorayı homofermentatif LAB'lerinin un florasında bulunan koliform tipi bakteriler üzerine inhibe edici etkisinin heterofermentatif LAB'lerine göre daha iyi olduğu bilinmektedir. Ancak heterofermentatif LAB olan *L. sanfranciscensis*'in *Bacillus subtilis* üzerine inhibe edici etkisi olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Bununla birlikte ekşi hamurdaki maya ve küflere karşı inhibe edici etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Jack et al. (1995), tarafından *L. sanfranciscensis* suşlarının inhibe edici etkisi incelenmiştir. Buna göre *L. sanfranciscensis* C57 suşunun bakteriyosin benzeri inhibe edici bir madde (BLIS C57) ürettiği ve üretilen bu maddelerin protein yapıda olduğu, ısıdan (100°C'de 20 dakika), lipaz ve alfa amilaz enzimlerinden etkilenmediği belirtilmiştir. Moroni et al. (2009), ise *L. sanfranciscensis* CB1 tarafından üretilen kaproik asit ve asetik asit, formik asit, propiyonik, bütirik asit gibi asitlerin *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Monilia*'nin ekmekte gelişmesini engellediğini tespit etmişlerdir. Corsetti and Settani (2007), çalışmalarında kaprik asitin antifungal aktivitesinin yüksek olduğunu ifade etmişlerdir (Jack et al., 1995; Corsetti and Settani, 2007; Moroni et al., 2009).

2.6. Plackett Burman Deney Tasarımı

Kimyasal ve biyoteknolojik prosesler çok sayıda parametre tarafından etkilenmektedir. Tüm parametrelerin etkilerinin incelenmesi mümkün olmadığından etkisi önemli olan parametrelerin seçilmesi önem taşımaktadır (Baş and Boyacı, 2007).

Plackett Burman (PB) tasarımı çok sayıda bağımsız değişkenin etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılan bir deneysel tasarım metodudur ve 1946 yılında Plackett ve Burman tarafından geliştirilmiştir. PB'de denemelerin sayısı 4'ün katı olmalıdır ve n+1 deney sayısı ile n sayıdaki bağımsız değişkenin etkisini tarayan iki faktöriyel tasarımıdır. Genellikle optimizasyon işleminin ilk aşamalarında deneme sayısının azaltılması amacıyla tercih edilen bir metottur. Tasarım sonucunda elde edilen veriler varyans analizi (ANOVA) ile incelenerek hangi değişkenlerin proses üzerinde etkili olduğu belirlenmektedir. PB, biyoteknolojik proseslerde genellikle mikroorganizmaların gelişmesi için önemli proses

koşullarının, besiyerindeki önemli bileşenlerin ve bunların birbirleriyle etkileşiminin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Plackett and Burman, 1946; Wang and Wan, 2009).

2.7. Cevap Yüzey Yöntemi

Optimizasyon, prosesin belirlenen hedefler (yanıtlar) doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin hedefe (yanıta) olan etkileri de göz önünde bulundurularak bir araya getirilip uygulanması işlemi olarak tanımlanmaktadır (Koç ve Ertekin, 2007)

Cevap yüzey yöntemi (CYY), ilk olarak kimyasal prosesler için optimum koşulları bulmak amacıyla Goerge Box ve Wilson tarafından geliştirilen ve kontrol edilebilir faktörler ile önemli cevap değerleri arasında ilişkiyi inceleyen bir yöntemdir. Myers and Montgomery (1995) tarafından ise *‘proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntem’* olarak tanımlanmıştır. CYY bilimin pek çok dalında kullanılmaktadır ve sadece biyoteknoloji alanında 3.5 milyondan fazla çalışmada kullanılmıştır (Myers and Montgomery, 1995; Koç ve Ertekin, 2007; Steinberg and Bursztyn, 2010).

Genel olarak cevap yüzey yöntemi 3 aşamadan (eleme denemeleri, bölge araştırması ve işlemin veya ürünün optimizasyonu) oluşmaktadır. Eleme denemelerinin amacı daha az sayıda ve daha verimli denemelerin yapılmasını sağlamaktır. Bölge araştırmasında ise amaç eleme denemeleri ile belirlenen bağımsız değişkenlerin sistemin cevabında oluşturdukları değerlerin optimum noktaya yakın sonuç verip vermediğini belirlemektir. Üçüncü aşama ise optimum noktaya ulaşıldığında başlamaktadır ve gerçek yanıt fonksiyonu optimum nokta etrafında önemli bir eğrilik göstermektedir. Eğriliğin modellenmesi için ise lineer olmayan denklemler kullanılmaktadır (Koç ve Ertekin, 2009).

Cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki fonksiyonun matematiksel ifadesi model denklemi oluşturularak gerçekleştirilmektedir. Sistem cevabı, bağımsız değişkenin lineer fonksiyonu olarak iyi uyum gösterdiği durumlarda birinci dereceden polinomial denklem model olarak kullanılabilir. Ancak birinci dereceden polinomial denklemler genellikle yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple ikinci dereceden polinomial (quadratic) modeller kullanılmaktadır (Eşitlik 2.1-2.2).

Birinci dereceden denklem,

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n \quad (2.1)$$

şeklinde ifade edilirken ikinci dereceden denklem

$$\eta = \beta_0 + \sum_{j=1}^n \beta_j x_j + \sum_{j=1}^n \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j}^n \beta_{ij} x_i x_j \quad (2.2)$$

şeklinde ifade edilmektedir. Burada β_0 , β_j , β_{jj} ve β_{ij} regresyon katsayılarını, x_i ve x_j bağımsız değişkenleri ifade etmektedir. Cevap yüzey yönteminde ikinci dereceden denklemler matris notasyonu ile ifade edildikten sonra parametreler sonsuz kareler metoduyla kolaylıkla hesaplanabilmektedir. Bu yöntemde hatanın rastgele olduğu, hatalarını ortalamasının sıfıra eşit ve birbirinden bağımsız olduğu varsayılmaktadır. İkinci dereceden denklemlerin uygulanabilirliğinin yüksek olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Myers and Montgomery, 1995; Dağbaşı, 2009).

Cevap yüzey yöntemlerinden biri olan Merkezci Kompozit Tasarım (Central Composite Design) ikinci dereceden (quadratic) polinomial modellerin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Merkezci kompozit tasarımda proses değişkenlerinin birbirleriyle ve cevap ile etkileşiminin değerlendirilmesinde varyans analizi (ANOVA) kullanılmaktadır. Varyans analizinde modelin yeterliliğinin tespit edilmesi amacıyla regresyon katsayısı (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısı ($AdjR^2$), model uyumsuzluğu (lack of fit) gibi test yöntemleri kullanılmaktadır. Model uyumsuzluğu '*modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hata*' olarak tanımlanmaktadır. İdeal modellerin model uyumsuzluğunun önemsiz olması gerekmektedir. Polinomial modelin kalitesi regresyon katsayısı ile değerlendirilmektedir ve bu regresyon katsayısının yüksek olması tercih edilmektedir. R^2 değerinin istatistiksel olarak önemli olup olmadığı ise *Fischer Testi* (*F testi*) ile kontrol edilmektedir. Model terimleri *P* değeri (*P value-probability*) ile %95 güven aralığında değerlendirilmektedir (Ghafari et al., 2009).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizma

Çalışmada kullanılacak olan *L. sanfranciscensis* DSM 20451 suşu Pak Gıda San. Tic. Ltd. Şti. (PAKMAYA)’nden Doç. Dr. Mustafa TÜRKER tarafından saf ve liyofilize halde temin edilmiştir. *L. sanfranciscensis* aşağıda tarif edilen stok kültür ortamında +4°C’de saklanmıştır. Kültürler kullanılmadan önce taze besi ortamına ekim yapılarak 30°C’de 1 gün geliştirilmiştir. Stok kültürü ve aşı kültürü ortamı Kline ve Sugihara (1971)’dan modifiye edilen ortam olup bileşiminde (%w/v); %2 maltoz (Merck, Almanya), %1.3 maya ekstraktı (Applichem, Almanya), %0.6 hidrolize soya ortamı (Tryptic Soy Broth, Merck, Almanya), %0.03 (v/v) Tween 80 (Merck, Almanya), bulunmaktadır. Ortam pH’sı 1 M HCl kullanılarak pH 5.6’ya ayarlanmıştır.

Aşı Kültürünün Hazırlanması

Her üretim öncesinde 30°C’de 1 gün süreyle geliştirilen stok kültürlerden, 50 ml aşı kültürü ortamına %5 (v/v) oranında ekim yapılmıştır. Aşı kültürü 30°C’de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda aşı kültüründen fermentasyon ortamına %5 (v/v) oranında ekim yapılmıştır. Denemelerde anaerobik ortam yaratmak ve oksijeni uzaklaştırmak için 50 mililitrelik erlenler kullanılmış olup, fermentasyon ortamları 50 mL’lik erlenler içerisinde 50 mL ortam olacak şekilde hazırlanmıştır. Fermentasyon ortamının içeriği (w/v): %2 maltoz, %1.3 maya ekstraktı, %0.6 hidrolize soya ortamından oluşmaktadır (pH:5.6) (Kline and Sugihara (1971)).

3.1.2 Ekşi Hamur ve Ekmek Üretiminde Kullanılan Malzemeler

Çalışmada ekşi hamurun hazırlanması ve ekmek yapımında kullanılan buğday unu (Söke Un, Aydın) Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Ekmekçilik Pilot Tesisi'nden temin edilmiştir. Ekmek yapımı için tuz (NaCl, Billur, İzmir) ve yaş maya (Pakmaya, İzmir) kullanılmıştır.

3.2. Metotlar

3.2.1. Plackett – Burman (PB) istatistiksel deney tasarım yöntemi ile önemli besi ortamı bileşenlerinin belirlenmesi

L. sanfranciscensis'in gelişmesine etki eden besi ortamı bileşenlerinin belirlenmesi için Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım Yöntemi (Minitab Statistical Software (Release 13.20)) kullanılmıştır. Maltoz, maya ekstraktı, hidrolize soya ortamı ve Tween 80 olmak üzere 4 (n) parametre seçilmiş, diğer parametreler dummy (sahte) olarak program tarafından belirlenmiştir ve toplam 8 (n+1) deneme yapılmıştır. Değişkenlerin alt ve üst limitlerinin belirlenmesi amacıyla Kline and tarafından önerilen fermentasyon ortamı kullanılarak ön denemeler yapılmıştır. Ön denemeler sonucunda değişkenler için belirlenen alt ve üst limitler Çizelge 3.1'de verilmiştir. Fermentasyon ortamları (pH 5.6) deneysel tasarımda belirtildiği gibi hazırlanmış ve 48. saat sonunda optik yoğunluk değerleri belirlenmiştir. Tüm denemeler 3 tekerrür olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Değişkenler için alt ve üst limitler.

Değişkenler	Alt Limit (-1)	Üst Limit (+1)
Maltoz (%w/v)	0.5	3.5
Maya Ekstraktı (%w/v)	0.7	2.7
Hidrolize Soya Ortamı (%w/v)	0.1	1.10
Tween 80 (%v/v)	0.01	0.05

3.2.2. *L. sanfranciscensis*'in gelişiminde önemli besi ortamı bileşenlerinin etkilerinin incelenmesi

Besi ortamı bileşenlerinin *L. sanfranciscensis*'in gelişmesi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla deneyler yapılmıştır. Bu amaçla farklı karbon kaynaklarının, farklı azot kaynaklarının, maya ekstraktı ve Hidrolize soya ortamı konsantrasyonunun, başlangıç ortam pH'sının bakterinin gelişimine etkisi incelenmiştir.

Maya ekstraktı konsantrasyonunun üremeye etkisini incelemek için %0.1, 0.7, 1.3, 1.7, 2.3, 2.7, 2.9, 3.1 (w/v) konsantrasyonlarında maya ekstraktı içeren fermentasyon ortamı hazırlanmış ve 48 saat fermentasyon sonunda optik yoğunluk belirlenmiştir.

Farklı Azot kaynağının etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda maya ekstraktı (Applichem, Almanya), pepton (BD, Fransa), tripton (Applichem, Almanya), mısır ıslatma suyu (Sigma Aldrich, Amerika) ve malt çimi (Türk Tuborg Bira ve Malt Sanayi Tic. A.Ş., İzmir) kullanılmıştır. Denenen azot kaynakları, önceden optimum olduğu belirlenen % 1.7 maya ekstraktı ile eşit azot temelinde kullanılmıştır. Bu amaçla azot oranları belirlenen maddelerin % 1.7 maya ekstraktı ile aynı oranda ortama azot verecek miktarları fermentasyon ortamına ilave edilmiştir. Çizelge 3.2'de denenen azot kaynakları, içerdikleri azot oranları (Göksungur, 1998) ve fermentasyon ortamına ilave edilen miktarları verilmiştir. Azot kaynakları fermentasyon ortamının rengini değiştirdiği için optik yoğunluk değeri ölçülememiştir. Bu sebeple 48 saatlik fermentasyon sonunda fermentasyon ortamından örnek alınarak canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

Karbon kaynağının etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda, maltoz (Merck, Almanya), laktoz (Merck, Almanya), fruktoz (Merck, Almanya), sakkaroz (Merck, Almanya), glukoz (Merck, Almanya) ve nişasta (Merck, Almanya) kullanılmıştır. 48 saat sonunda fermentasyon ortamlarından örnek alınarak optik yoğunluk değeri ölçülmüştür.

Hidrolize soya ortamı konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi amacıyla için 4 farklı konsantrasyonda (%0.3, 0.6, 0.9, 1.2 (w/v)) fermentasyon ortamına ilave edilmiştir ve 48 saat sonunda fermentasyon ortamlarından örnek alınarak optik yoğunluk değeri ölçülmüştür.

Çizelge 3.2. Fermentasyon ortamında kullanılan azot kaynakları.

Azot Kaynağı	Azot (%)	Ortama İlave Edilen Miktar (% w/v)
Pepton	14.00	1.19
Maya ekstraktı	9.80	1.70
Trypton	12.70	1.31
Malt çimi	5.29	3.14
Mısır ıslatma suyu	6.44	2.58

Başlangıç ortam pH'sının etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı başlangıç ortam pH'larına sahip (pH: 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) fermentasyon ortamları hazırlanmıştır ve fermentasyon ortamlarından 6., 24. ve 48. saatlerde örnek alınarak optik yoğunluk ve pH değerleri ölçülmüştür.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, *L. sanfranciscensis*'in gelişmesine etki eden besi ortamı bileşenlerinin, bakterinin gelişimi üzerine etkileri Cevap Yüzey Yöntemi ile incelenmiş ve maksimum optik yoğunluk değerini veren seviyeleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak matematiksel bir model elde edilmiş ve bu model ile optimum besi ortamı bileşimi belirlenmiştir.

3.2.3. Ekşi hamur üretimi

Ekşi hamur üretimi Lattanzi et al. (2014) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu yönteme göre; önce hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Optimum besi ortamında (% 1.86 Maltoz, % 0.68 hidrolize soya ortamı, maya ekstraktı % 2.39, pH 6.5) 24 saatlik fermentasyon sonunda gelişen hücreler santrifüjasyon yoluyla sıvı kısımdan ayrılmış ve steril NaCl çözeltisiyle (9 g/L) 2 kere yıkanmıştır. Hücre yoğunluğunu 1.3×10^9 KOB/mL olarak belirlenmiştir.

Ekşi hamurların yapımında buğday unu (240 gr), çeşme suyu (84 gr) ve hücre süspansiyonu (36 ml) kullanılmıştır (EHE3 için hücre süspansiyonu yerine su kullanılmıştır (Bknz. Ek1)). Un, çeşme suyu ve hücre süspansiyonu karıştırıcı (İnoksan ISM 10, Bursa, Türkiye) kullanılarak önce yavaş hızda 5 dakika sonra yüksek hızda 10 dakika karıştırılmıştır. Elde edilen hamur plastik kaplarda 30°C'de 5 saat inkübe edilmiştir (birinci fermentasyon aşaması). Birinci fermentasyondan sonra ekşi hamur 4°C'de 19 saat muhafaza edilmiştir. Elde edilen ekşi hamurun %45'i alınmış, buğday unu ve su ile (2:2:1) karıştırılarak (İnoksan ISM 10, Bursa, Türkiye) her gün 2 kere beslenmiştir. Hamur, un ve su ile beslendikten hemen sonra 5 saat boyunca, 30°C'de inkübe edilmiş, 2.beslemenin fermentasyonu tamamlandıktan sonra hamur 4°C'de 14 saat bekletilmiştir. Bu işlem 3 gün boyunca tekrar edilmiştir. Fermentasyon basamaklarından sonra hamurlardan örnekler alınmış ve aşağıda belirtilen yöntemle göre hamurun pH'sı ölçülmüştür.

3.2.4. Ekmek üretimi

Bu çalışma kapsamında 4 farklı ekmek çeşidi üretilmiştir Üretilen ekmeklere ait akım şemaları Ekler bölümünde yer almaktadır (Bknz. Ek2, Ek3, Ek4). Ekmekler Detmold (1978) standart ekmek pişirme yöntemi modifiye edilerek aşağıdaki açıklandığı gibi üretilmiştir (Anonymous, 1978).

Kontrol Ekmeği: Sadece yaş maya içermektedir. Ekşi Hamur Ekmeği-1(EHE1): Starter kültür (*L. sanfrancisensis*) kullanılmıştır. Ekşi Hamur Ekmeği-2(EHE2): Starter kültür (*L. sanfrancisensis*) ve yaş maya kullanılarak ekmek üretilmiştir. Ekşi Hamur Ekmeği-3(EHE3)-spontan fermentasyon ile starter kültür, maya ilave edilmeden üretilmiştir. Ekşi hamurlar yukarıda belirtilen metoda göre üretilmiştir ve ekmek hamuru yapım aşamasında un, su, tuz ve yaş maya ile karıştırılarak ekmek hamuru elde edilmiştir.

Kontrol ekmeği (K): 1400 gr buğday unu, 798 gr su (30°C sıcaklığında), 16.80 gr tuz ve 42 gr yaş maya (Bknz. Ek2); EHE1 ve EHE3: 822 gr buğday unu, 470 gr su (30°C sıcaklığında), 16.80 gr tuz ve 910 gr ekşi hamur (Bknz. Ek3); EHE2: 822 gr buğday unu, 470 gr su (30°C sıcaklığında) 16.80 gr tuz ve 42 gr yaş maya ve 910 gr ekşi hamur (Bknz. Ek 4) karıştırıcı (İnoksan ISM 10, Bursa, Türkiye) kullanılarak 5 dakika yavaş hızda, 10 dakika yüksek hızda

kariştırılmıştır. Ekmek hamurlarına 36-38°C’de 30 dakika 2 kere fermentasyon işlemi uygulanmıştır. Her 30 dakikalık fermentasyon aşaması sonrasında hamurlar, el ile 1 dakika yoğurularak havalandırma işlemi yapılmıştır. Son havalandırma aşamasından sonra hamurlar, 400 gram ağırlıktaki hamur parçalarına bölünmüş ve el ile yuvarlanarak pişirme kaplarına yerleştirilmış ve fermentasyon kabininde 36–38°C aralığında 60 dakika son fermentasyona tabi tutulmuştur. Son fermentasyon işleminden sonra hamurlar pişirme fırınında (İnoksan FBE010, Bursa, Türkiye) 180°C’de 30 dakika pişirilmiştir. Pişirme işlemi ardından fırından çıkarılan ekmekler oda koşullarında 2 saat bekletilerek soğumaya bırakılmıştır. Ekmekler soğuduktan sonra aşağıda belirtilen metotlarla kalite analizleri yapılmıştır.

3.3 Analiz Yöntemleri

3.3.1. Biyoktle miktarı

Fermentasyon ortamından alınan örneklere, 7500 rpm (5340g) değerinde 4°C’de 20 dakika süreyle santrifügasyon işlemi uygulanarak hücreler fermentasyon ortamından ayrılmıştır ve saf su ile iki defa yıkanmıştır. Yıkanan hücreler 80°C’de sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur (Bekers et al., 2002).

Spesifik reme hızının belirlemesi amacıyla logaritmik fazda olan bakterilerin 12., 18., 24., 30. ve 36. saatlerde biyoktle miktarı belirlenmiş ve biyoktle miktarının süreye göre değişimi Göksungur (2011)’de belirtilen metoda göre incelenerek spesifik üreme hızı hesaplanmıştır.

3.3.2. Optik yoğunluğun belirlenmesi

Hücrelerin optik yoğunluğunu kontrol etmek amacıyla fermentasyon sonrasında 1.5 mL örnek alınarak Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk (O.D._{600nm}) değeri llmştır. Optik yoğunluk ile biyoktle arasında aşağıdaki korelasyon

denkliğinin belirlenmesi amacıyla 600 nm'deki farklı O.D. değerlerine karşılık gelen biyokütle miktarları ölçülmüş ve biyokütle-optik yoğunluk grafiği çizilmiştir. Korelasyon grafiği kullanılarak aşağıdaki denklem elde edilmiş (Eşitlik 3.1) ve optik yoğunluk değerine karşılık gelen hücre konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılmıştır (Jaapar et al. 2011).

$$\text{Biyokütle (g/L)} = 1.3924 * \text{optik yoğunluk} + 0.1715 \quad (3.1)$$

3.3.3. Laktik asit bakterisi sayımı

Hücre sayısının belirlenmesi için fermentasyon sonunda üretim ortamlarından aseptik koşullarda örnek alınarak %0.1'lik peptonlu su kullanılarak seri dilüsyonlar elde edilmiştir. Seri dilüsyonlardan 1 mL alınarak çift tabakalı dökme plak yöntemine göre Sour Dough Bacterium (SDB) agara ekim yapılmıştır. Bu yöntemde besiyeri iki kat halinde dökülmüştür. Katılan besiyerinde 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir ve sonuç koloni oluşturan birim/mL (KOB/mL) olarak verilmiştir (Ünlütürk ve Turantaş, 2002).

3.3.4. pH

Örneklerde pH değerleri, pH metre (WTW Series pH 720) ile belirlenmiştir. Cihazın kalibrasyonu düzenli aralıklarla standart pH tampon çözeltileri ile yapılmıştır.

Bütün denemeler 2 tekrar, analizler ise 3 paralel halinde yapılmış ve standart sapma hesaplandığında sonuçların %95 güven aralığı içerisinde kaldığı belirlenmiştir.

3.3.5 Deneysel tasarım ve istatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizinde Design Expert 7.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, ABD) kullanılmıştır. *L. sanfranciscensis*'in gelişiminde etkili besi ortamı bileşenlerinin optimizasyonu için parametreler (bağımsız değişkenler) ve bu parametrelerin seviyeleri önceden yapılan denemeler sonucunda tespit edilmiştir. Seçilen 3 değişken (maltoz, maya ekstraktı, hidrolize soya ortamı) için Merkezci Komposit Tasarım (Central Composite Rotatable Design (CCRD), $\alpha=1.68$) kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler için -alfa ($-\alpha$) ve +alfa ($+\alpha$) değerleri tanımlanmış ve program tarafından parametrelerin seviyeleri belirlenmiştir. Parametrelerin seviyeleri ve alfa değerleri Çizelge 3.3'te verilmiştir. Gerçekleştirilecek deney sayısı (N) ise aşağıdaki Eşitlik 3.2'e göre belirlenmiştir. Bu formülde k : faktör sayısını, 2^k çok etkenli (kübik) deneye ait noktalardaki denemelerin sayısını, $2k$ eksen noktasındaki denemelerin sayısını, C_0 ise merkez noktasında gerçekleşen denemelerin sayısını ifade etmektedir. Buna göre, deneysel tasarımda 14 tanesi farklı, 6 tanesi merkez noktasında olmak üzere toplam deneme sayısı 20 adet olarak belirlenmiştir. Tüm denemeler 3 tekerrür olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

$$N=2^k+2k + C_0 \quad (3.2)$$

Fermentasyon ortamındaki besi bileşenlerinin *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisini ifade eden ikinci dereceden polinomial denklem aşağıda verilmiştir. Burada, $\beta_0, \beta_1, \beta_2 \dots \beta_{23}$ regresyon katsayılarını, X_1, X_2 ve X_3 ise bağımsız değişkenleri ifade etmektedir.

İkinci dereceden polinomial denklem (Eşitlik 3.3):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (3.3)$$

Çizelge 3.3. Cevap Yüzey Yönteminde incelenen parametreler ve seviyeleri.

Faktörler	Bağımsız Değişkenler	Değişken Seviyeleri			$-a$	$+a$
		-1	0	+1		
X ₁ (A)	Maltoz (%w/v)	1.4054	2	2.5946	1	3
X ₂ (B)	Maya Ekstraktı (%w/v)	1.50675	2.25	2.99325	1	3.5
X ₃ (C)	Hidrolize soya ortamı (%w/v)	0.402698	0.7	0.997302	0.2	1.2

Denemeler yapıldıktan sonra elde edilen modelin deneysel veriler ile uyumluluğunu belirlemek amacıyla varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Varyans analizinde modelin yeterliliği regresyon katsayısı (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısı ($AdjR^2$), model uyumsuzluğu (lack of fit) gibi test yöntemleri ile belirlenmiştir. Regresyondan kaynaklanan varyasyonun %95 güvenlik seviyesinde önemli olması koşulu ile karar verilmiştir.

3.3.6. Ekşi hamura ve ekmek hamuruna uygulanan analizler

Laktik asit bakterisi sayımı

25 gr hamur örneği aseptik olarak alınmış ve 225 ml %0.1'lik steril peptonlu su stomacher cihazı ile (Stomacher 400, Seward, UK) 2 dakika yüksek hızda homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş örnekten aseptik koşullarda seri dilüyonlar hazırlanmıştır. Seri dilüsyonlardan 1 mL alınarak çift tabakalı dökme plak yöntemine göre Sour Dough Bacterium (SDB) agara ekim yapılmıştır. Bu yöntemde besiyeri iki kat halinde dökülmüştür. Katılaşan besiyerinde 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir ve sonuç koloni oluşturan birim/gr (KOB/gr) olarak verilmiştir (Ünlütürk ve Turantaş, 2002).

Hamurun pH tayini

10 gr hamur örneği 90 mL saf su ile bir karıştırıcı (Ultra Torrax T-25, Almanya) yardımıyla homojenize edildikten sonra pH'sı doğrudan pH metre kullanılarak ölçülmüştür (Paramithiotis et al.,2006).

Toplam titrasyon asitliği (TTA)

10 gr hamur örneği 90 mL saf su ile bir karıştırıcı (Ultra Torrax T-25, Almanya) yardımıyla homojenize edildikten sonra 0.1 N NaOH ile fenolftalein indikatörlüğünde titre edilmiştir (pH 8.5'e ulaşana kadar). TTA, mL 0.1 N NaOH olarak ifade edilmiştir (Paramithiotis et al., 2006).

3.3.7. Ekmek kalite analizleri

Pişme kaybı

Pişme kaybı (%) değerleri, pişirme sırasında ekmek hamurundan uzaklaşan nem miktarı olarak hesaplanmıştır.

Hacim

Ekmek hacmi analizi AACC International Method 10-16.01 yöntemine göre lazerli hacim ölçüm cihazı (VolScan Profiler, VSP600, Stable Micro Systems, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Ekmeklerin spesifik hacim (cm^3/g) değerleri ekmek hacminin ağırlığına oranlanmasıyla belirlenmiştir.

Tekstür analizi

Ekmeklerin ekmek içi doku analizleri AACC International Method 74-09 (1999) yöntemine göre tekstür analiz cihazı (TA-XT Plus Texture Analyser Stable Micro Systems, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır.

Ekmegin nem miktarının belirlenmesi

Elde edilen ekmeklerin nem miktarı (%) analizi AACC International Method 44-15A (1999) yöntemine göre etüv (Köttermann Typ2702, Köttermann Systemlabor, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Renk analizi

Ekmek içi renk değerleri (L^* , a^* , b^*) renk ölçüm cihazı (Hunter Lab. Colourflex Management Company, ABD) ile ölçülmüştür.

3.3.8. İstatistiksel analizler

Ekmek kalitesini belirlemeye yönelik yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler; SPSS–Statistical Package for the Social Sciences, 15.0 istatistik programı kullanılarak varyans analizleri (ANOVA) ile “Duncan” Çoklu Karşılaştırma Yöntemi’ne göre yapılmıştır. % 95 güven aralığında ($p < 0.05$) çalışılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Plackett – Burman (PB) İstatiksel Deney Tasarım Yöntemi ile Önemli Besi Ortamı Bileşenlerinin Belirlenmesi

Plackett Burman yöntemi, fermentasyon proseslerinde önemli parametrelerin belirlenmesi amacıyla kullanılan bir deney tasarım yöntemidir (Robert et al., 2006). Bu çalışmada Plackett Burman yöntemi, 4 fermentasyon ortamı bileşeninin (maltoz, maya ekstraktı, hidrolize soya ortamı, Tween 80) optik yoğunluk üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu metoda göre elde edilen deney matrisi ve yanıt değerleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Program tarafından belirlenen deneme desenine göre 8 deneme gerçekleştirilmiştir. Deneylerde elde edilen optik yoğunluk değerleri 0.193 ile 1.084 arasındadır.

Çizelge 4.1. Plackett – Burman (PB) istatistiksel deney tasarım yöntemi ile elde edilen deney matrisi.

	FAKTÖRLER				CEVAP
Deneme	Maltoz (% w/v)	Maya Ekstraktı(% w/v)	Hidrolize Soya Ortamı(% w/v)	Tween 80 (% v/v)	Optik Yoğunluk (O.D. _{600nm})
1	-	-	-	-	0.193
2	+	-	+	+	0.723
3	+	+	-	-	0.808
4	-	+	-	+	0.535
5	+	+	+	-	1.084
6	-	+	+	+	0.958
7	+	-	-	+	0.424
8	-	-	+	-	0.545

Regresyon analizi sonucu elde edilen değerler Çizelge 4.2’de ve etkilere ait katsayılar Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Maltoz, maya ekstraktı ve hidrolize soya ortamı faktörlerine ait *P* değerleri 0.05’den küçük olduğu için *L. sanfranciscensis*’in gelişmesinde önemli parametreler olarak belirlenmiştir. Tween 80’in ise *P* değeri 0.935 >0.05 olduğu için *L. sanfranciscensis*’in gelişmesinde önemli bir parametre olmadığı belirlenmiştir. Yanıt değerini faktörler cinsinden ifade eden modele ait regresyon denklemi Eşitlik 4.1’de gösterilmiştir. Modele ait R^2 : 98.9, $AdjR^2$: 97.5 olarak elde edilmiştir. Denklemden Y: Optik Yoğunluk, A: Maltoz, B: Maya ekstraktı, C: Hidrolize soya ortamı, D: Tween 80 değerlerini ifade etmektedir.

$$Y = 0.0009 + 0.0673*A + 0.187*B + 0.338*C + 0.073*D \quad (4.1)$$

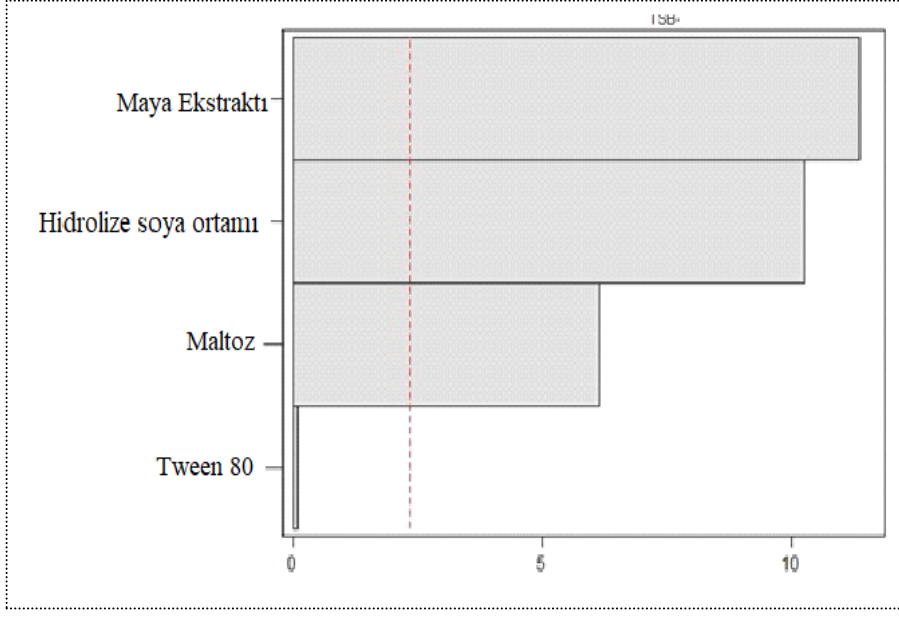
Çizelge 4.2. Plackett Burman deney tasarımına ait regresyon analiz tablosu.

Terimler	Katsayılar (Coef.)	Std. Hata Katsayıları	T Değeri	P Değeri
Sabitler	0.00	0.659	0.02	0.987
Maltoz	0.201	0.100	6.14	0.009
Maya Ekstraktı	0.374	0.187	11.39	0.001
Hidrolize Soya Ortamı	0.337	0.168	10.26	0.002
Tween80	0.002	0.001	0.09	0.935

Çizelge 4.3. Plackett Burman deney tasarımına ait etkiler ve katsayılar tablosu.

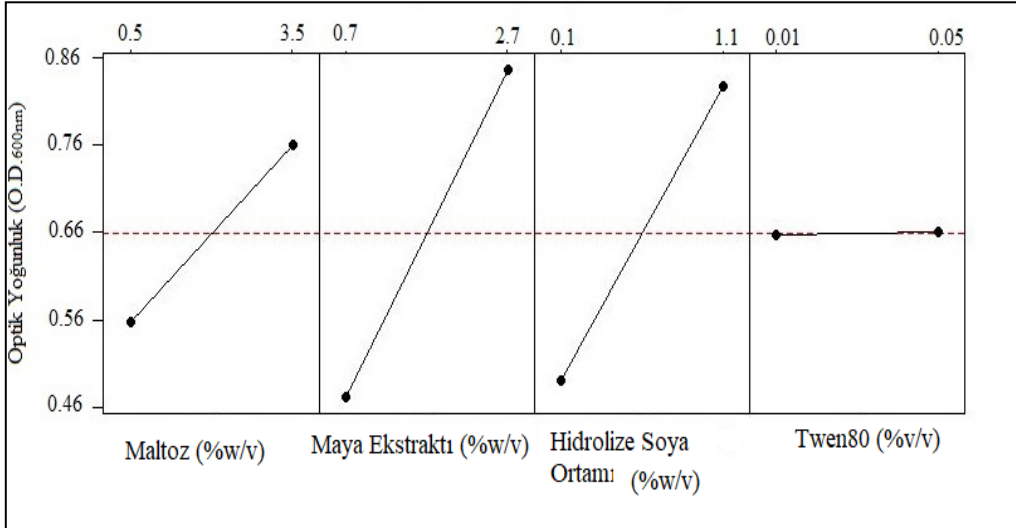
Terimler	Etki (Effect)	Katsayılar (Coef.)	T Değeri	P Değeri
Sabitler		0.659	40.04	0
Maltoz	0.201	0.100	6.14	0.009
Maya Ekstraktı	0.374	0.187	11.39	0.001
Hidrolize Soya Ortamı	0.337	0.168	10.26	0.002
Tween80	0.002	0.001	0.09	0.935

Faktörlerin yanıt üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılması amacıyla Pareto tablosu (Şekil 4.1) incelenmiştir. Pareto tablosu faktörlerin etkisini göstermektedir ve hangi faktörlerin önemli olduğunu belirlemek amacıyla Pareto tablosundaki referans çizgisi (alfa (α):0.01) kullanılmaktadır. Referans çizgisinin üstündeki faktörler önemli, altındaki faktörler ise önemsiz olarak kabul edilmektedir (Robert et al., 2006). Pareto tablosuna göre cevap üzerine en yüksek etkiyi sırasıyla maya ekstraktı, hidrolize soya ortamı, maltoz göstermektedir. Tween 80'in cevap üzerine etkisinin ise oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Pareto tablosu (Cevap optik yoğunluk, OD 600 nm, alfa: 0.01).

Faktörlerin cevap üzerine etkisi ise aşağıdaki grafiklerde gösterildiği gibidir (Şekil 4.2). Bu grafiklere göre maltoz konsantrasyonu, maya ekstraktı konsantrasyonu ve hidrolize soya ortamı konsantrasyonu arttıkça optik yoğunluk değerinin arttığı, ancak Tween 80 konsantrasyonunun optik yoğunluk değerini etkilemediği görülmektedir.



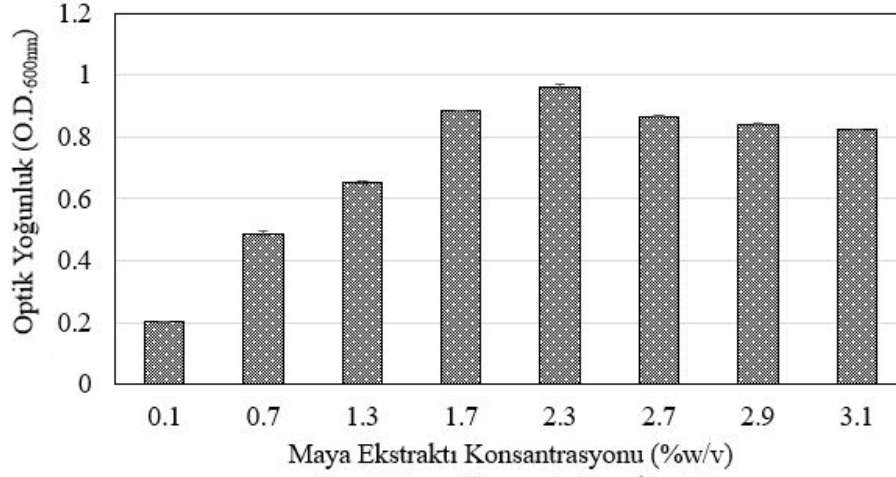
Şekil 4.2. Optik yoğunluk (cevap) üzerine faktörlerin etkileri.

4.2 *L. sanfranciscensis*'in Gelişiminde Önemli Besi Ortamı Bileşenlerinin Etkilerinin İncelenmesi

4.2.1. Maya ekstraktı konsantrasyonunun *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi

Laktik asit bakterileri gelişebilmeleri için nükleotitler, aminoasitler ve vitaminler gibi kompleks organik maddelere ihtiyaç duyarlar. Laktik asit üretiminde maya ekstraktı bakterilerin kompleks besin maddeleri ihtiyacını karşılamak için en çok kullanılan azot kaynağıdır (Göksungur, 1998).

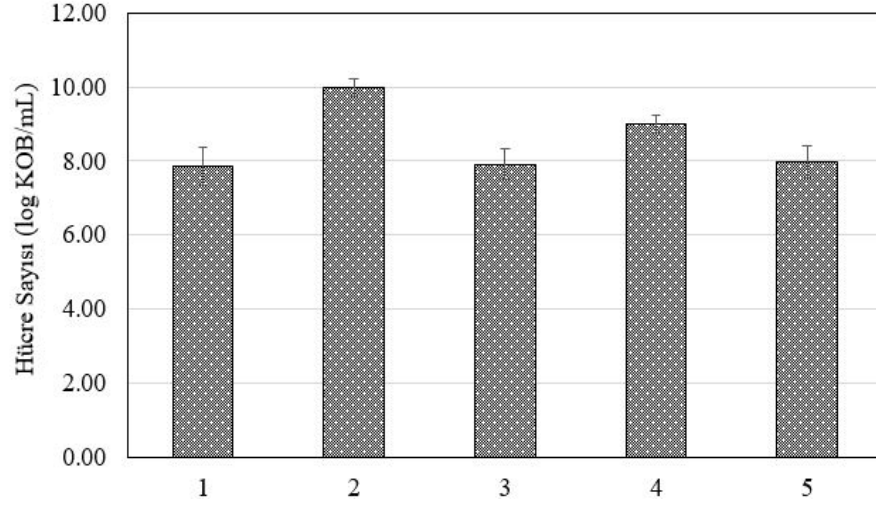
Azot kaynağı olarak seçilen maya ekstraktının optimum konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 8 farklı maya ekstraktı konsantrasyonu (%0.1, 0.7, 1.3, 1.7, 2.3, 2.7, 2.9, 3.1 (w/v)) fermentasyon ortamına ilave edilmiştir. Çalışma sonucunda % 2.3 (w/v) maya ekstraktı içeren ortamda en yüksek optik yoğunluk (O.D. _(600nm)) değerine (0.961 ± 0.007) ulaşılmıştır. Şekil 4.3'te de görüldüğü gibi en yüksek optik yoğunluk değeri % 2.3 maya ekstraktı kullanıldığında elde edilmesine rağmen, % 1.7 maya ekstraktı konsantrasyonu ile de benzer bir optik yoğunluk değeri (0.886 ± 0.0014) elde edilmiştir. Maya ekstraktı iyi bir azot kaynağı olmasına rağmen pahalı bir maddedir ve yüksek miktarlarda kullanılması maliyeti arttırmaktadır. Bu sebeple maya ekstraktı miktarının azaltılması önerilmektedir (Aeschlimann ve Von Stockar, 1990). Bu çalışma sonucunda optimum maya ekstraktı miktarı %2.3 (w/v) olarak belirlenmesine rağmen, iki optik yoğunluk değerleri arasındaki farkın önemli olmaması (%95 güven aralığında) sebebiyle çalışmanın devamında proses maliyetini düşürmek amacıyla %1.7 (w/v) konsantrasyonunda maya ekstraktı kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%2 Maltoz, %0.6 Hidrolize soya ortamı, pH 5.6).

4.2.2. Farklı azot kaynaklarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi

Çalışmada farklı azot kaynaklarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu, pepton, tripton malt çimi kullanılmıştır. Şekil 4.4'te farklı azot kaynaklarının kullanılması sonucunda elde edilen hücre sayısı verilmiştir. Değişik azot kaynaklarının kullanıldığı denemelerde, hazırlanan ortamların bulanıklığı farklı olduğu için optik yoğunluk ile hücre gelişimi ölçülememiş, bunun yerine çift tabakalı dökme plak yöntemi ile hücre sayısı belirlenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, en yüksek hücre sayısı ($9.97 \log \text{KOB/mL} \pm 0.246$), azot kaynağı olarak maya ekstraktı kullanıldığında elde edilmiştir. Malt çiminin azot kaynağı olarak kullanımında ise, ikinci en yüksek hücre sayısına ($8.99 \log \text{KOB/mL} \pm 0.242$) ulaşılmıştır. Azot kaynağı olarak, pepton, tripton, mısır ıslatma suyu kullanılması sonucunda, hücre sayısının maya ekstraktı ve malt çimine kullanımına göre düşük olduğu belirlenmiştir.

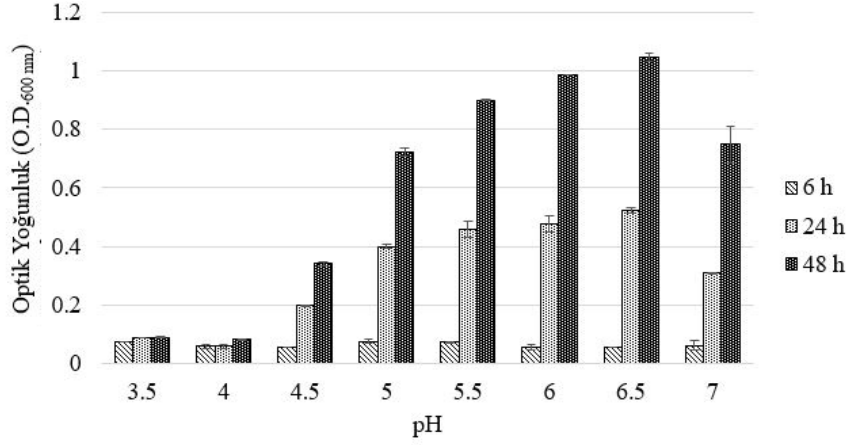


Şekil 4.4. Farklı azot kaynaklarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%2 Maltoz, %0.6 Hidrolize soya ortamı, pH 5.6, 1: Pepton, 2: Maya ekstraktı, 3: Trypton, 4: Malt çimi, 5: Mısır ıslatma suyu).

Maya ekstraktının yapısında peptitler ve üreme faktörleri (B grubu vitaminler ve oligonükleotidler) bulunmaktadır. Bu sebeple yapısında üreme faktörleri içermeyen pepton gibi azot kaynaklarına göre hücre gelişimini daha fazla stimüle etmektedir (Amrane and Prigent, 1997). Literatürde *L. sanfranciscensis*'in gelişimi için hazırlanan fermentasyon ortamlarında malt çiminin azot kaynağı olarak kullanımına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple bu çalışmanın, bira üretiminde yan ürün olarak açığa çıkan malt çiminin azot kaynağı olarak biyoproseslerde değerlendirilmesine yönelik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

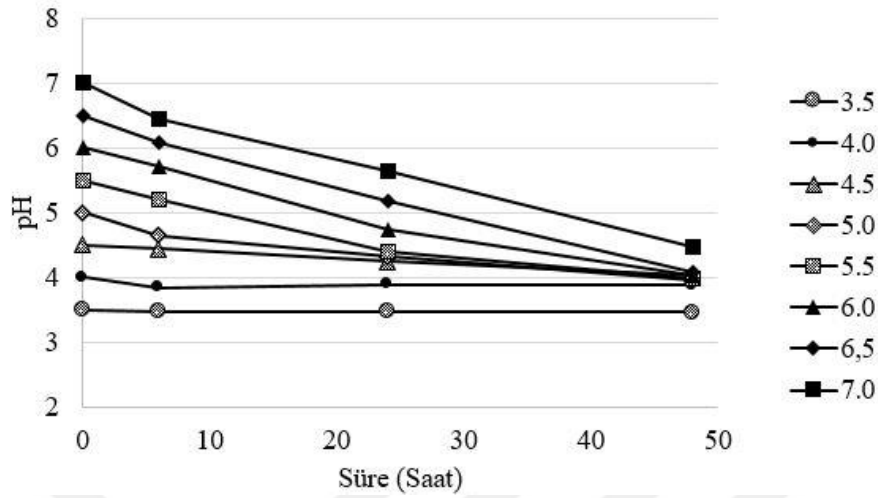
4.2.3. Başlangıç ortam pH'sının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi

Başlangıç ortam pH'sı mikrobiyal gelişimi etkileyen önemli parametrelerdendir (Messens et al., 2002). Başlangıç ortam pH'sının, *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek O.D. (600nm) değeri (1.045 ± 0.015) ortam pH'sının 6.5, en düşük O.D. (600nm) değeri (0.0825 ± 0.002) ise başlangıç ortam pH'sının 3.5 olduğu koşullarda elde edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Başlangıç ortam pH'sının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%2 Maltoz, %0.6 Hidrolize soya ortamı, maya ekstraktı %1.7).

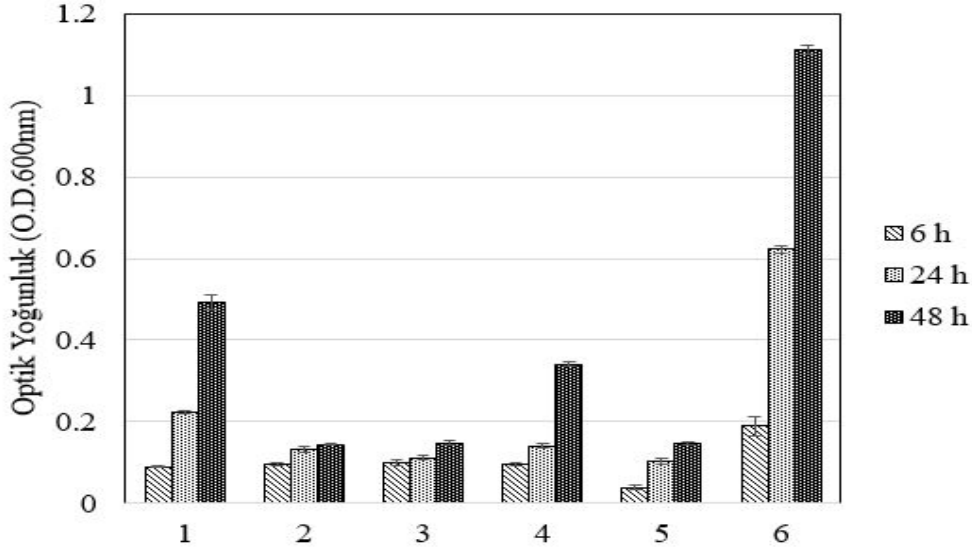
Farklı başlangıç pH değerlerine sahip fermentasyon ortamlarının 48 saat boyunca pH değerlerinde meydana gelen değişim Şekil 4.6'da verilmektedir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, başlangıç pH'sının 3.5 olduğu ortamda 48 saat boyunca pH değerlerinde değişim gözlenmemiştir ve 48 saat sonunda pH değeri 3.5 olarak ölçülmüştür. En büyük pH değişiminin ise başlangıç ortam pH'sı 7.0 olan ortamda elde edildiği ve pH değerinin 48 saatte 7.0'dan 4.47'ye düştüğü belirlenmiştir. Ekşi hamurun başlangıç pH'sının 5.0-6.2 değerleri arasında olduğu bilinmektedir (De Vuyst and Neysens, 2005). Neubauer et al. (1994) çavdar unu kullanılarak üretilen ekşi hamurun başlangıç pH'sının yaklaşık olarak 5.6 olduğunu, bu sebeple çavdar ekşi hamurdan izole edilen *Lactobacillus*'ların yaklaşık pH 5.6 değerinde geliştiğini bildirmişlerdir. Ekşi hamurun pH'sının fermentasyon sonunda *L. sanfranciscensis* tarafından üretilen asetik asit ve laktik asit sebebiyle 4.3'e düştüğü belirtilmiştir. Kline and Sugihara (1971) tarafından yapılan çalışmada da ekşi hamurdan izole edilen farklı *L. sanfranciscensis* suşları için optimum ortam pH'sının 5.6 olduğunu ifade edilmiştir (Kline and Sugihara 1971; Neubauer et al., 1994; De Vuyst and Neysens, 2005).



Şekil 4.6. Fermentasyon süresince ortam pH'sının değişimi (%2 Maltoz, %0.6 Hidrolize soya ortamı, maya ekstraktı %1.7).

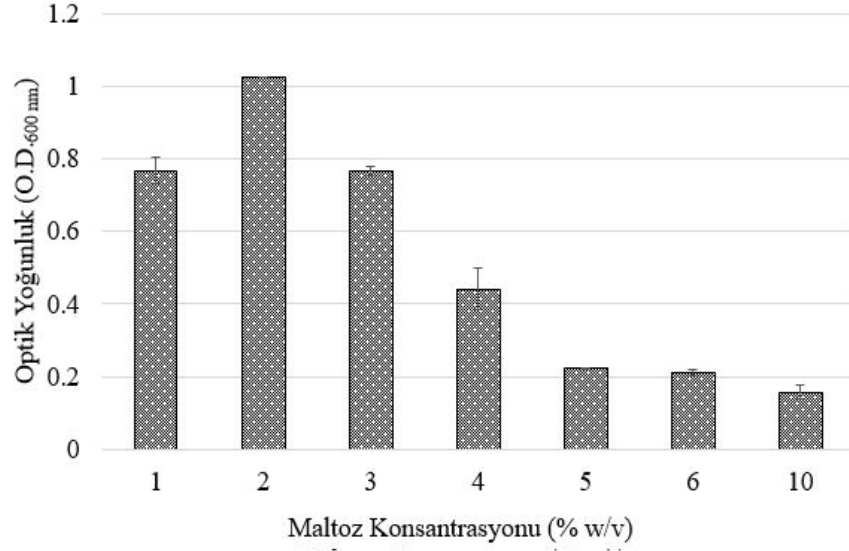
4.2.4. Farklı karbon kaynaklarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi

Fermentasyon ortamının farklı karbon kaynaklarıyla desteklenmesi amacıyla fermentasyon ortamına glukoz, fruktoz, laktoz, sakkaroz, nişasta ve maltoz eklenmiştir. En yüksek O.D._(600nm) değeri (1.112 ± 0.011) maltoz içeren ortamda elde edilmiştir. Maltoz haricinde glukoz ve sakkarozun da *L. sanfranciscensis* tarafından kullanılabilirdiği görülmüştür ancak maltoza kıyasla daha düşük O.D._(600nm) değerleri (0.495 ± 0.178 ve 0.441 ± 0.005) elde edilmiştir. Fruktoz, laktoz ve nişasta içeren ortamlarda ise O.D._(600nm) değerlerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Farklı karbon kaynaklarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%0.6 Hidrolize soya ortamı, maya ekstraktı %1.7, pH 6.5, 1: Glukoz, 2: Fruktöz, 3:Laktoz, 4: Sakkaroz, 5: Nişasta, 6: Maltoz).

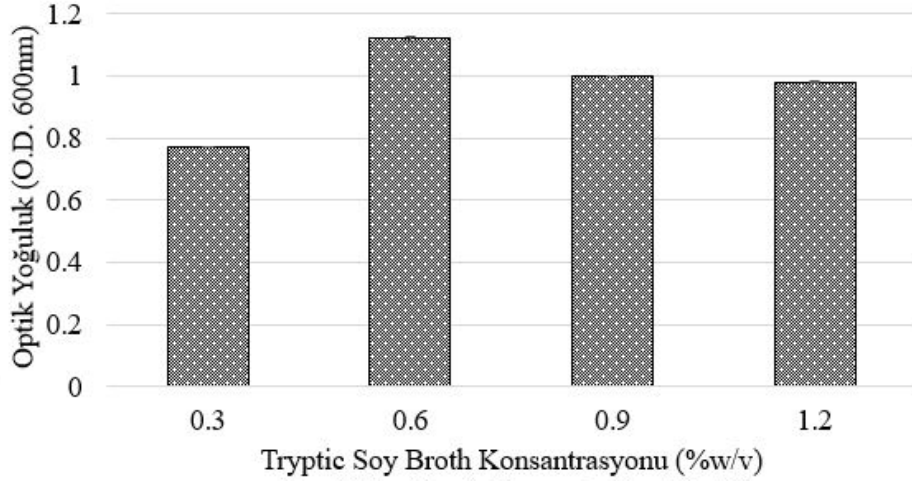
Farklı maltoz konsantrasyonları ile yapılan çalışmada ise en yüksek O.D._(600nm) değeri (1.025 ± 0.0014) %2 (w/v)maltoz içeren fermentasyon ortamında bulunmuştur. En düşük O.D._(600nm) değeri (0.157 ± 0.019) ise %10 maltoz içeren ortamda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8). Çalışmada elde edilen sonuçlar literatür ile tutarlılık göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda (Neubauer et al.,1994; Stolz et al., 1993), maltoz ve glukoz içeren ortamlarda *L. sanfranciscensis*'in metabolizmasındaki değişimler incelenmiştir. *Lactobacillus* tarafından üretilen maltoz fosforilaz enzimi ile ortamdaki maltoz kullanılarak glukoz ve glukoz-1-fosfat üretiminin ATP harcanmadan gerçekleştirildiğini ifade etmiş, üretilen bu bileşenlerin daha sonra metabolik faaliyetlerde kullanılması amacıyla hücre dışına gönderildiğini belirtilmiştir. Çalışmalar sonucunda, *L. sanfranciscensis*'in hücre dışı ortamda glukoz konsantrasyonunu artırdığı ve ürettiği glukozu, maltoz olmadığı durumlarda karbon kaynağı olarak kullandığını tespit etmişlerdir. Hücre dışı ortamda bulunan glukozun ekşi hamur gibi maltoz içeriği yüksek ortamlarda maltozu rekabetçi mikroorganizmalardan koruduğu ve bu sayede ekşi hamurun mikrobiyasını etkilediğini belirtilmiştir (Neubauer et al.,1994; Stolz et al., 1993).



Şekil 4.8. Maltoz konsantrasyonunun *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%0.6 Hidrolize soya ortamı, maya ekstraktı %1.7, pH 6.5).

4.2.5. Hidrolize soya ortamı miktarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi

Hidrolize soya ortamı konsantrasyonunun belirlenmesi için 4 farklı konsantrasyonda (%0.3, 0.6, 0.9, 1.2 (w/v)) hidrolize soya ortamı fermentasyon ortamına ilave edilmiştir (Şekil 4.9). En yüksek O.D._(600nm) değeri (0.114 ± 0.008) %0.6 (w/v) konsantrasyonunda elde edilmiş ve bu miktarın üzerindeki konsantrasyonlarda O.D._(600nm) değerinin düştüğü belirlenmiştir. Hidrolize soya ortamı özellikle zor gelişen mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Kline and Sugihara (1971) yaptığı çalışmada Trypticase'ın *L. sanfranciscensis*'in gelişimini stimüle ettiğini bildirmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada kullanılan hidrolize soya ortamı yapısında bulunan Trypticase sebebiyle *L. sanfranciscensis*'in gelişimini stimüle etmektedir.



Şekil 4.9. Hidrolize soya ortamı konsantrasyonunun *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%2 Maltoz, maya ekstraktı %1.7, pH 6.5).

4.3. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile Fermentasyon Ortamı Bileşenlerinin Optimizasyonu

L. sanfranciscensis'in gelişimi üzerine etkili olduğu belirlenen fermentasyon ortamı bileşenlerinden maltoz, maya ekstraktı ve hidrolize soya ortamı konsantrasyonlarının optimum seviyelerinin belirlenmesi ve birbirleriyle etkileşimlerinin incelenmesi için Cevap Yüzey Yöntemi kullanılmıştır. CYY'de kullanılan deney tasarım matrisi ve yanıt değerleri Çizelge 4.4 'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Cevap Merkezci Kompozit Tasarım ile elde edilen deney tasarım matrisi.

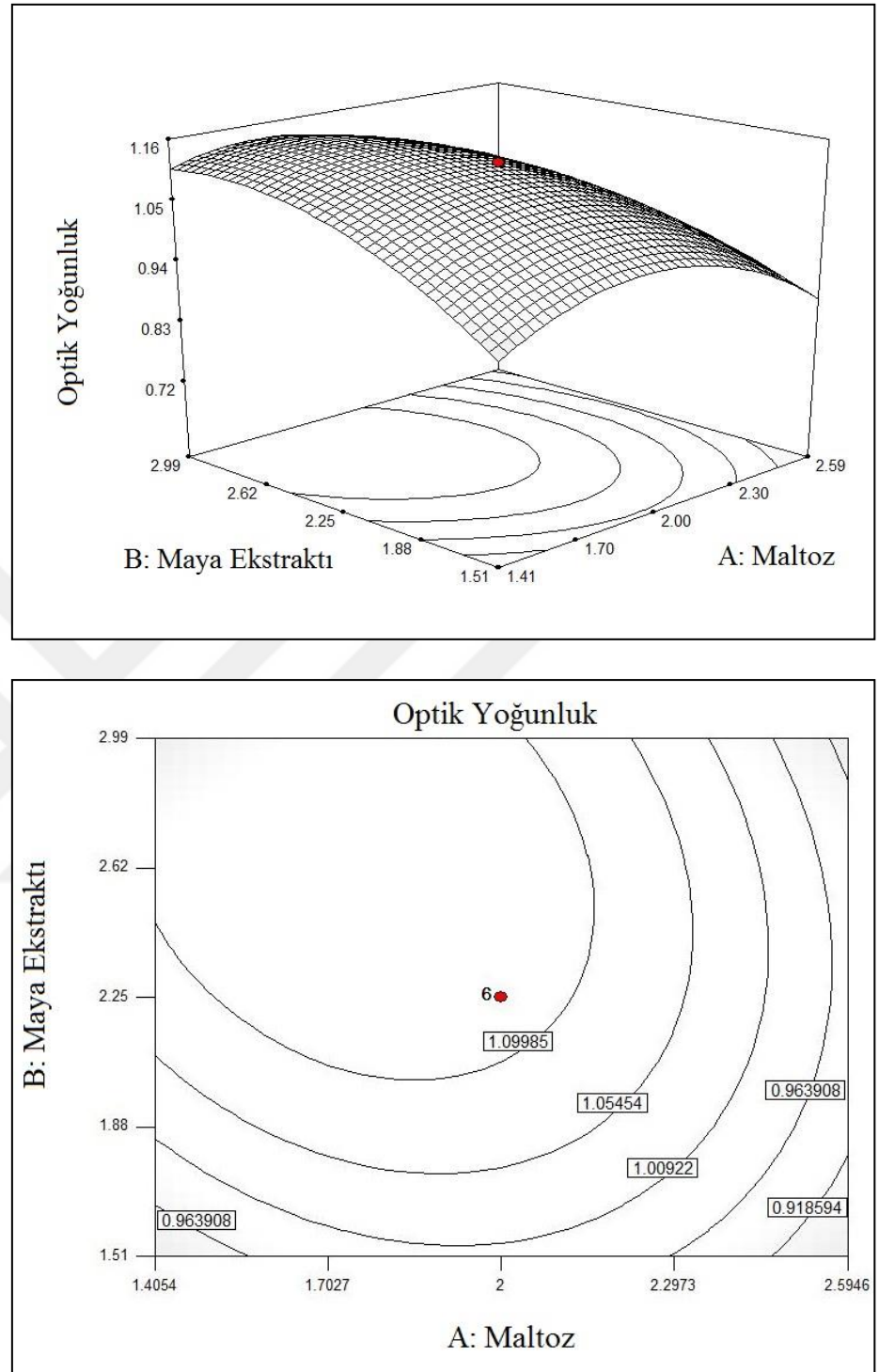
Deneme	FAKTÖRLER			CEVAP
	Maltoz (% w/v)	Maya Ekstraktı (% w/v)	Hidrolize Soya Ortamı (% w/v)	Optik Yoğunluk (O.D. _{600nm})
1	3.00	2.25	0.7	0.723
2	2.00	2.25	0.7	1.115
3	2.59	2.99	1.00	0.785
4	1.41	2.99	1.00	1.079
5	2.59	1.51	1.00	0.793
6	1.41	1.51	1.00	0.923
7	2.00	2.25	0.70	1.117
8	2.00	2.25	0.70	1.119
9	2.00	2.25	0.70	1.119
10	2.00	2.25	0.70	1.120
11	1.00	2.25	0.70	0.936
12	2.00	2.25	1.20	0.932
13	1.41	1.51	0.40	0.750
14	1.41	2.99	0.40	0.963
15	2.00	2.25	0.20	0.821
16	2.00	1.00	0.70	0.849
17	2.59	1.51	0.40	0.780
18	2.00	3.50	0.70	1.031
19	2.59	2.99	0.40	0.845
20	2.00	2.25	0.70	1.112

Bu denemeler sonucu elde edilen modelin uyumluluğu varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir (Çizelge 4.5). Deneysel veriler ve tahminlenen veriler arasındaki uyum gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0.9997 olarak elde edilmiştir. Çizelge 4.5 incelendiğinde modelin F değerinin 3289.48 olduğu için F testinin (%5 önem derecesinde) sonucunda modelin anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Modelin uyum eksikliği incelendiğinde ise uyum eksikliğinin değeri 0.2407 olarak belirlenmiştir ve %5 önem derecesinde önemsiz olduğu ($P>0.05$) görülmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında modelin deneysel sonuçlar ile uyum gösterdiği belirlenmiştir.

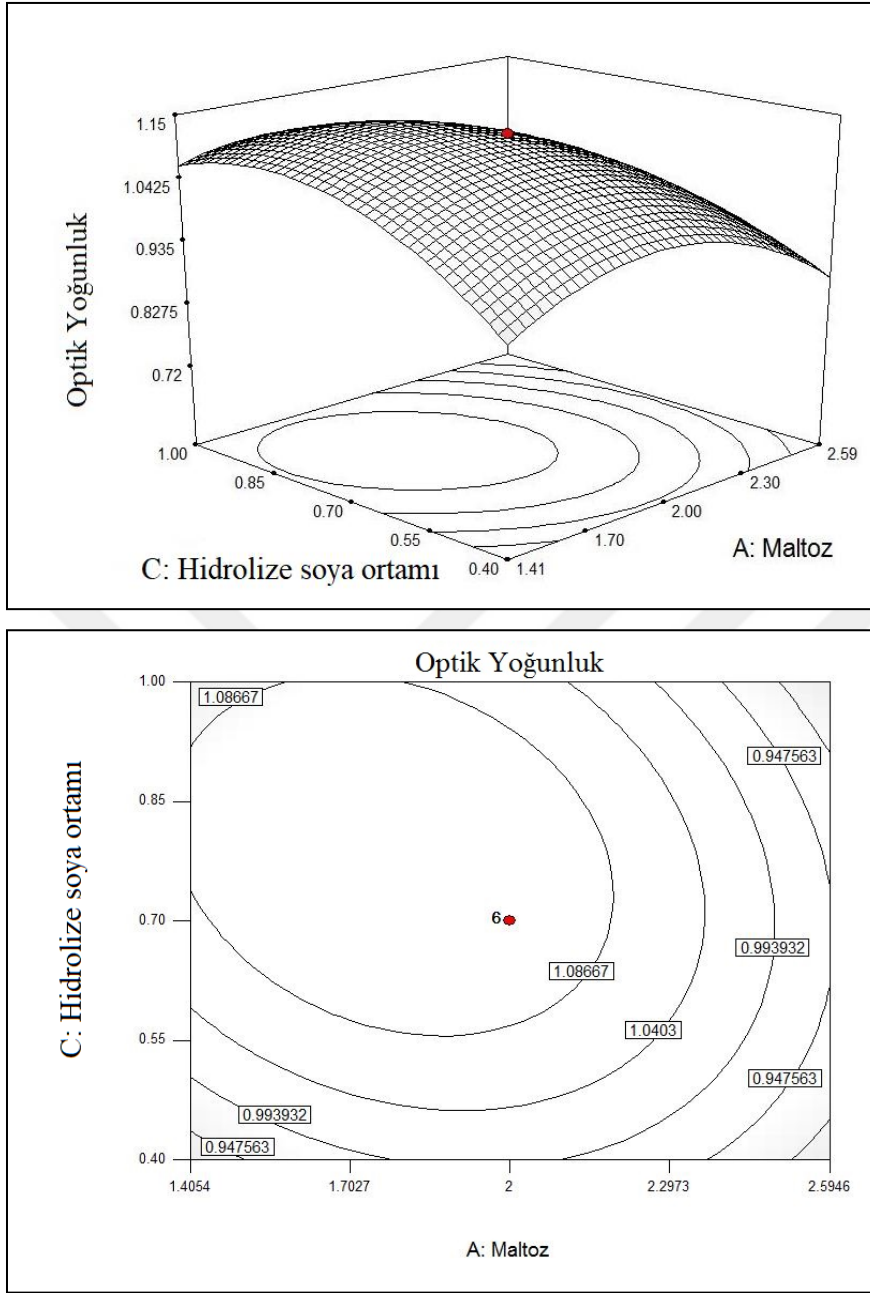
Çizelge 4.5. Merkezciil Kompozit Tasarıma (CCD) ait varyans analiz (ANOVA) tablosu (R^2 : 0.9997, Adj R^2 : 0.9994, Std.Sapma (Std.Dev.): 3.68E-03, Pred R^2 : 0.9980, %C.V.:0.39).

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri	<i>p</i> Değeri (Probe>F)	
Model	0.4	9	0.045	3289.48	< 0.0001	Önemli
A-A	0.055	1	0.055	4087.27	< 0.0001	
B-B	0.039	1	0.039	2892.67	< 0.0001	
C-C	0.013	1	0.013	991.83	< 0.0001	
AB	0.012	1	0.012	896.9	< 0.0001	
AC	0.014	1	0.014	1040.19	< 0.0001	
BC	2.11E-03	1	2.11E-03	155.71	< 0.0001	
A ²	0.15	1	0.150	11112.12	< 0.0001	
B ²	0.058	1	0.058	4244.36	< 0.0001	
C ²	0.11	1	0.11	7794.7	< 0.0001	
Artan	1.36E-04	10	1.36E-05			
Uyum Eksikliği	8.97E-05	5	1.79E-05	1.949292	0.2407	Önemsiz
Saf Hata	4.6E-05	5	9.2E-06			
Toplam	0.4	19				

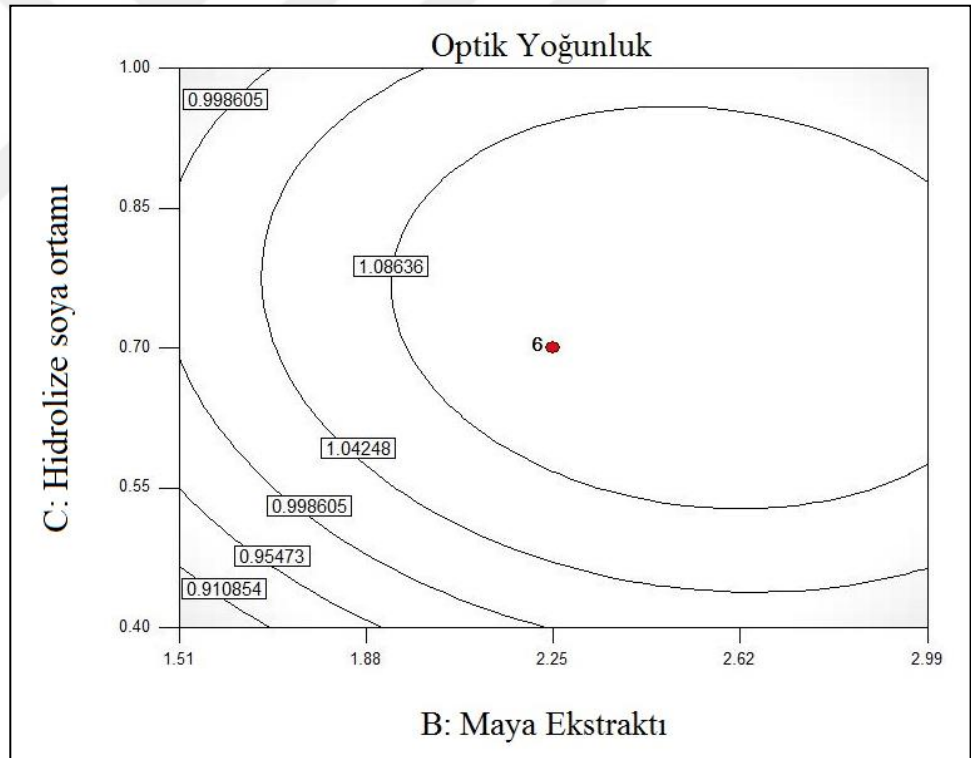
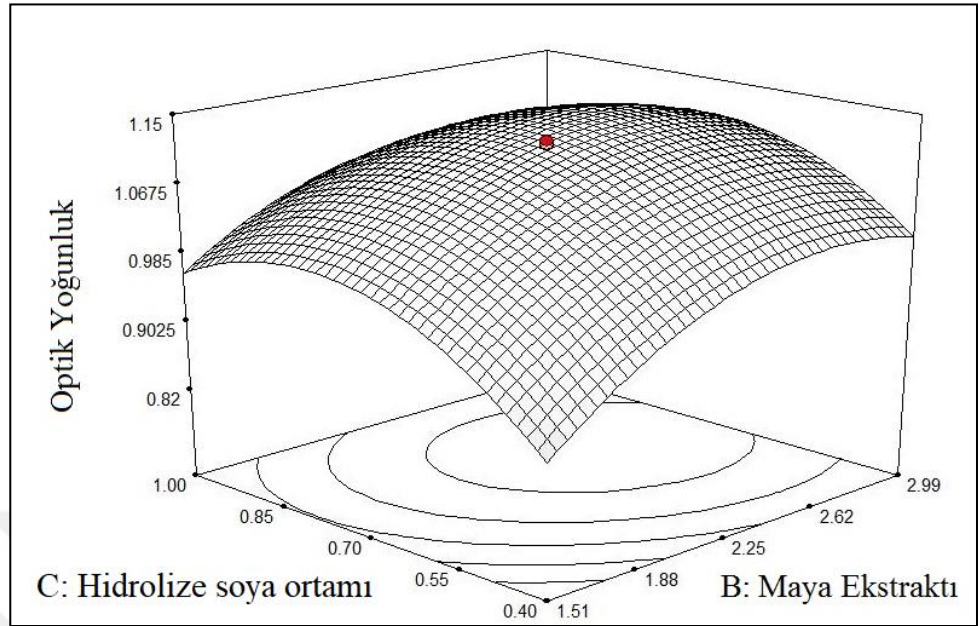
p değeri modeldeki terimlerin önemli olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmaktadır . ANOVA analizi sonucu bu modeldeki tüm terimler için $p < 0.05$ olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple tüm model terimlerin (A, B, C, AB, AC, BC, A², B², C²) önemli olduğu ve tüm faktörler ve faktörlerin arasındaki interaksiyonların optik yoğunluk üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Sinyal gürültü oranını gösteren Adeq Precision değeri (152.219) ise tercih edilen 4 ve daha büyük olma şartını sağladığı için yeterli bir sinyal olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.10. Sabit hidrolize soya ortamı konsantrasyonunda (%0.7 w/v), maltoz ve maya ekstraktının izohips eğrisi ve yüzey grafiği.



Şekil 4.11. Sabit maya ekstraktı konsantrasyonunda (%2.25 w/v), maltoz ve hidrolize soya ortamının izohips eğrisi ve yüzey grafiği.



Şekil 4.12. Sabit maltoz konsantrasyonunda (%2 w/v), maya ekstraktı ve Hidrolize soya ortamı'nun izohips eğrisi ve yüzey grafiği.

Deneyisel veriler üzerine çoklu regrasyon analizi uygulanarak ikinci dereceden model denklem elde edilmiştir (Eşitlik 4.2). Denklem gerçek faktörler (Terms of Actual Factors) cinsinden verilmiştir. Model denklemde Y: Optik yoğunluk, A: Maltoz, B: Maya ekstraktı, C: Hidrolize soya ortamını ifade etmektedir.

$$Y = -1.96162 + 1.41485*A + 0.81500*B + 2.10303*C - 0.08824*A*B - 0.23759*A*C - 0.073539*B*C - 0.28929*A^2 - 0.11442*B^2 - 0.96915*C^2 \quad (4.2)$$

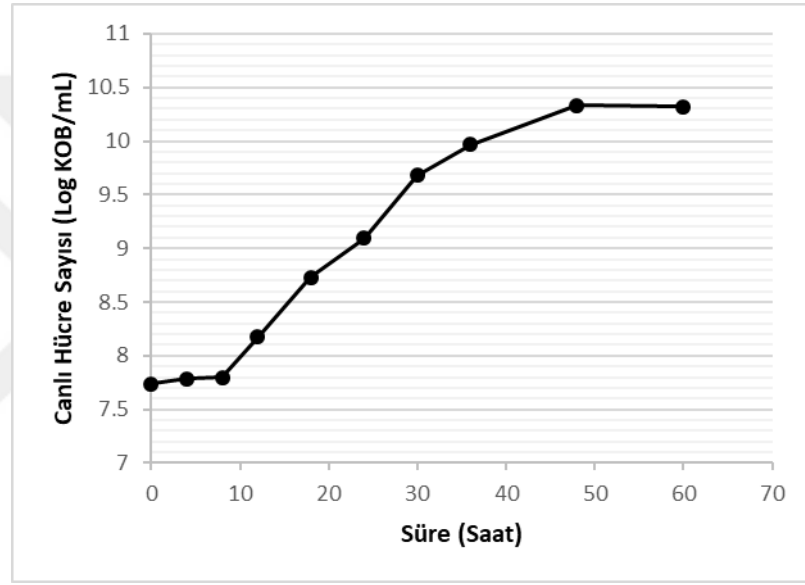
İzohips eğrileri ve yüzey grafikleri genellikle regresyon denkleminin grafiksel olarak ifade edilmesini sağlamaktadır. Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12’de faktörlerden bir tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin optik yoğunluk üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir. Şekil 4.10’da hidrolize soya ortamı konsantrasyonu sabit iken, merkez noktaya kadar optik yoğunluk değerinin arttığı, merkez noktadan sonra ise azaldığı belirlenmiştir. Şekil 4.11’de sabit maya ekstraktı konsantrasyonunda, merkez noktaya kadar optik yoğunluk değerinin arttığı, merkez noktadan sonra ise azaldığı belirlenmiştir. Şekil 4.12’de maltoz konsantrasyonu sabit iken merkez noktaya kadar optik yoğunluk değerinin arttığı, merkez noktadan sonra ise optik yoğunluk değerinin azaldığı belirlenmiştir.

Optik yoğunluğu modellemek için oluşturulan ikinci derece polinomial denklem çözülmüş ve proses için belirlenen optimum koşullar belirlenmiştir. Bu optimum koşullar, maltoz konsantrasyonu %1.86 w/v (X1), maya ekstraktı konsantrasyonu %2.39 w/v (X2) ve hidrolize soya ortamı %0.68 w/v (X3)'dir ve bu koşullarda model, optik yoğunluğun 1.13272 olarak elde edilebileceği tahminlemiştir. Bu koşullar *L. sanfranciscensis*'in gelişimi için optimum koşul olarak belirlenmiştir.

4.4. Optimum Koşullarda *L. sanfranciscensis*'in Üreme Kinetiği

L. sanfranciscensis'in gelişimine etki eden besi ortamı bileşenleri için optimum seviyeler belirlendikten sonra bu besi ortamı bileşenlerinin optimum seviyelerinde (Maltoz: %1.86 (w/v); maya ekstraktı miktarı %2.39 (w/v), hidrolize soya ortamı :%0.68 (w/v)) ve başlangıç ortam pH'sı: 6.5’da üreme kinetiği belirlenmiştir. Şekil 4.3’te belirtilen saat aralıklarında alınan örneklerde

O.D._(600nm), biyokütle miktarı ve hücre sayısı belirlenmiştir. Şekil 4.3'de verilen üreme kinetiği verileri incelendiğinde, lag faz'ın 8 saat sürdüğü ve 8. saatten itibaren O.D._(600nm) değerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bakteri hücreleri 8-48. saatler arasında logaritmik fazda gelişme göstermişler ve fermentasyonun 48. saatinden sonra durağan faza girmişlerdir. En yüksek O.D._(600nm) değeri (1.280 ± 0.027) 48. saatte elde edilmiştir. 48. saatteki biyokütle miktarı ise 1.928 ± 0.007 gr/L olarak belirlenmiştir. Fermentasyonun başlangıcında hücre sayısı 5.45×10^7 KOB/mL olarak belirlenmiş ve 48 saatte 2.21×10^{10} KOB/mL hücre sayısına ulaşılmıştır. *L. sanfranciscensis* için optimum koşullarda spesifik üreme hızı $\mu = 0.025 \text{ sa}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Optimum koşullarda canlı hücre sayısının süreye göre değişimi (%1.86 Maltoz, %0.68 hidrolize soya ortamı, maya ekstraktı %2.39, pH 6.5).

Optimizasyon öncesinde ise en yüksek O.D._(600nm) değerine ulaşıldığı 48. saatte, O.D._(600nm) değeri 1.120 ± 0.007 , biyokütle miktarı ise korelasyon grafiği kullanılarak 1.730 ± 0.002 gr/L olarak belirlenmiştir. 48 saatte 2.16×10^{10} KOB/mL canlı hücre sayısına ulaşılmıştır ve *L. sanfranciscensis* için optimizasyon öncesi spesifik üreme hızı $\mu = 0.0226 \text{ sa}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

CYY ile yapılan optimizasyon sonucunda elde edilen modelin tahminlemesi, deneysel veriler ile uyumlu sonuç vermiştir. CYY sayesinde faktörlerin birbirleri ile olan etkileşimleri göz önüne alınarak daha detaylı, matematiksel ve istatistiksel yöntemlere dayalı bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu detaylı optimizasyon çalışması sayesinde optik yoğunluk değerinde artış elde edilmiştir.

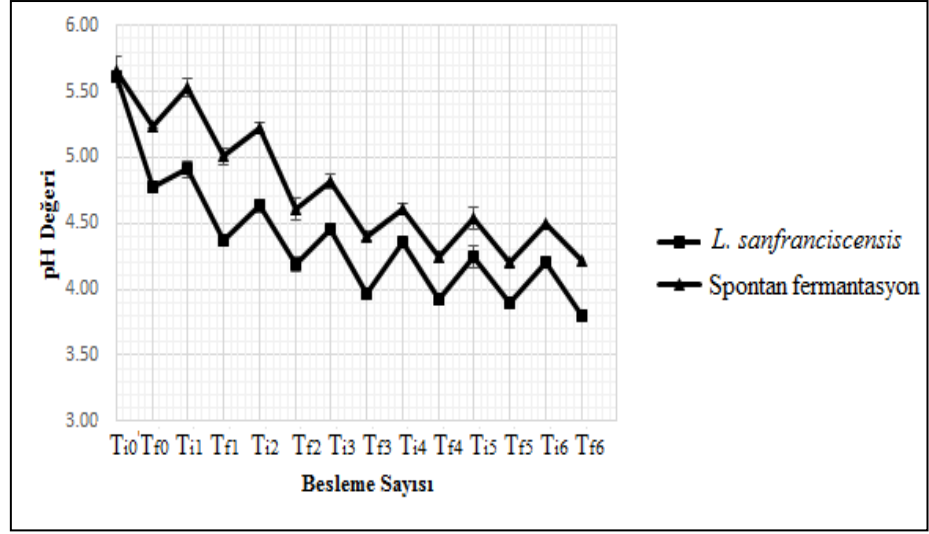
Literatürde *L. sanfranciscensis*'in üreme kinetiğini inceleyen çalışmalardan biri Neubauer et al. (1994) tarafından yapılan çalışmadır. Bu çalışmada kullanılan suşa ve ortamda bulunan karbon kaynağına göre lag faz süresinin farklılık gösterdiği belirtilmiştir. *L. sanfranciscensis*'in glukoz içeren ortama adaptasyonu uzun sürmekte ve bu sebeple lag faz 20 saat ile 150 saat arasında değişkenlik göstermektedir. Ancak maltoz içeren ortamda lag faz daha kısa sürmektedir. Bunun sebebi ise maltoz ve glukoz için farklı transport sistemleri kullanmasına bağlı olarak lag faz süresinin farklılık göstermesidir (Neubauer et al., 1994).

4.5. Ekşi Hamurun Özellikleri

Ekşi hamur üretimi 3.2.3'de belirtilen metoda göre gerçekleştirilmiştir ve üretime ait akım şemaları ekte gösterilmiştir. Ekşi hamurun üretimi sırasında tüm besleme basamaklarında (T_i) ve besleme ardından gerçekleşen fermentasyon süresi sonunda (T_f) pH değerleri ölçülmüştür. Starter kültür kullanılarak üretilen ekşi hamur ve spontan fermentasyonla üretilen ekşi hamura ait pH değişim grafiği Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5'ten de görüldüğü üzere ekşi hamurların başlangıç pH değerleri 5.60 – 5.65 arasındadır ve zamanla beraber pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Çizelge 4.5'de görüldüğü üzere starter kültür içeren ekşi hamurun pH değerinin hızla azaldığı ve tüm üretim süreci boyunca pH değerlerinin spontan fermentasyon ile üretilen ekşi hamura kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Besleme işlemi sırasında ekşi hamura ilave edilen un ve su ile ekşi hamurun pH'sı yükselmiştir ve bu durum grafiklerde pik görüntüsünün oluşmasına sebep olmuştur.

Starter kültür kullanımının ekşi hamurun pH'sını hızlı bir şekilde düşürdüğü ise literatürde çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Göçmen, 2001; Yağmur, 2013). Hamur pH'sının hızlı düşmesi ile hamur mikrofilorasında laktik asit bakterileri hakim hale gelmektedir ve diğer bakterilerin gelişmesi engellenmektedir.



Şekil 4. 14. Besleme işlemi boyunca hamur pH'sında meydana gelen değişim.

Ekşi hamur üretimi tamamlandıktan sonra ekşi hamurlar ekmek yapımında kullanılmak üzere başlık 3.2.4'de belirtilen miktarda un ve su ile karıştırılarak ekmek hamuru elde edilmiştir. Elde edilen ekmek hamurlarından pişirme işleminden önce örnek alınarak pH, toplam titrasyon asitliği ve laktik asit bakterisi sayımı gerçekleştirilmiştir. Ekmek hamurlarına ait pH, titrasyon asitliği ve laktik asit bakterisi sayısı değerleri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Hamur örneklerinin pH değerleri düştükçe TTA değerlerinde artış olduğu tespit edilmiştir. TTA, oluşan asit miktarının bir göstergesidir ve organik asit miktarı arttıkça pH düşmektedir. Ekşi hamurda bulunan laktik asit ve asetik asit TTA miktarının artmasına ve pH değerinin düşmesine sebep olmaktadır.

Starter kültür kullanımı pH değerlerinin düşük, TTA değerlerinin yüksek olmasına sebep olmuştur. *L. sanfranciscensis* kullanılarak üretilen EHE1'in en düşük pH değerine (4.15 ± 0.23) sahip olduğu, kontrol ekmeğine ait hamurun ise en yüksek pH değerine (5.74 ± 0.43) sahip olduğu belirlenmiştir.

Starter kültür kullanımını ile spontan fermentasyona göre hamurdaki laktik asit bakterisi sayısının arttığı görülmektedir. Kontrol ekmeğine ait hamurda ise 6.3 ± 0.23 logKOB/gr laktik asit bakterisi olması ise unun yapısında bulunan laktik asit bakterilerinin göstergesidir.

Çizelge 4.6. Hamurlara ait pH, TTA ve laktik asit bakterisi analiz sonuçları.

Örnek Adı	pH	TTA (mL 0.1 N NaOH)	Laktik asit bakteri sayısı log KOB/gr
K	5.74±0.43	5.6±0.42	6.3±0.23
EHE1	4.15±0.23	8.5±0.38	8.3±0.12
EHE2	4.23±0.36	7.9±0.65	7.7 ±0.02
EHE3	4.53±0.24	7.6±0.40	7.9±0.34

K: Kontrol ekmeğine ait hamur (sadece yaş maya içermektedir.), EHE1:Ekşi Hamur Ekmeği-1 'e ait ekmeğe hamurunu (starter kültür ile fermentasyon), EHE2:Ekşi Hamur Ekmeği2'ye ait ekmeğe hamurunu (Starter kültür ile fermentasyon ve yaş maya içermektedir, EHE3:Ekşi Hamur Ekmeği3'e ait ekmeğe hamurunu (spontan fermentasyon ile üretilmiştir ve starter kültür, maya ilave edilmemiştir.) ifade etmektedir.

Lattanzi et al. (2014), tarafından yapılan çalışmada *Lactobacillus plantarum* DB200, *Lactobacillus sanfranciscensis* A4, *Saccharomyces cerevisiae* SA.F4 beraber kullanılarak üretilen ekşi hamura ait pH ve TTA değerleri incelenmiştir ve Laktik asit bakterisi sayısı 8.7 log KOB/gr, TTA değeri ise 10.2 mL 0.1 N NaOH olarak elde edilmiştir. *Lactobacillus sanfranciscensis* A4, *Weissella cibaria* 8C6, *Saccharomyces cerevisiae* SA.F4 beraber kullanılması durumunda ise laktik asit bakterisi sayısı 8.5, TTA değeri ise 8.0 olarak belirlenmiştir. Ekşi hamurda bulunan laktik asit bakterisi sayısı diğer mikroorganizmaların varlığından etkilenmektedir. Laktik asit bakterisi sayısının artması ile TTA'nın artış gösterdiği görülmektedir (Lattanzi et al., 2014)

Yağmur (2013), tarafından yapılan çalışmada ise farklı starter kültür kombinasyonları (S1: *L. sanfranciscensis*, *P. pentosaceus*, *L. rosiae* *S. cerevisiae*; S2: *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *L. spicher*; *S. cerevisiae*; S3: *P. pentosaceus*, *L. zymae*, *L. namurensis*, *S. cerevisiae*; S4: *L. plantarum*, *Leu. mesenterodies*, *L. casei*, *S. cerevisiae*) kullanılarak sıvı ekşi hamur üretilmiştir. 30 saat sonunda pH değeri 3.32, TTA değeri ise 14.95 mL 0.1 N NaOH olarak tespit edilmiştir. Fermentasyonun son gününde ise 9.25 log KOB/gr LAB olduğunu bildirmiştir. Fermentasyon boyunca LAB sayısının değiştiğini ve maksimum hücre sayısına 2. günde ulaşıldığı tespit edilmiştir (Yağmur, 2013).

4.6. Ekşi Hamur Ekmeğinin Kalite Özellikleri

4.6.1 Hacim, spesifik hacim, pişme kaybı ve nem

Ekmekek hamurları hazırlandıktan sonra başlık 3.2.4’de belirtilen metoda göre pişirilmiştir ve pişirildikten sonra 2 saat boyuna oda koşullarında bekletilerek soğutulmuştur. Ekmeklere ait görseller ekler bölümde gösterilmiştir (Bknz. Ek 5). Üretilen ekmeklerde nem, hacim, spesifik hacim ve pişme kaybı değerleri belirlenmiştir. Bu analizlere ait sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve elde edilen analiz sonuçları Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Ekşi hamur ekmeklerine ait nem, hacim, spesifik hacim, pişme kaybı değerleri.

Örnek	Hacim(cm ³)	Spesifik Hacim(cm ³ /g)	Pişme Kaybı (%)	Nem (%)
K	1650.693±41.463 ^a	4.987±0.131 ^a	17.302±0.247 ^a	36.611±0.582 ^a
EHE1	641.676±94.815 ^c	1.759±0.273 ^c	8.739±0.710 ^c	35.453±1.015 ^b
EHE2	1455.472±41.586 ^b	4.303±0.150 ^b	15.450±0.750 ^b	36.221±1.342 ^{a,b}
EHE3	494.261±20.800 ^d	1.338±0.057 ^d	7.628±0.217 ^d	36.939±1.425 ^a

K: Kontrol ekmeği (sadece yaş maya içermektedir.), EHE1:Ekşi Hamur Ekmeği-1 (starter kültür ile fermentasyon), EHE2:Ekşi Hamur Ekmeği2 (Starter kültür ile fermentasyon ve yaş maya içermektedir, EHE3:Ekşi Hamur Ekmeği3 (spontan fermentasyon ile üretilmiştir ve starter kültür, maya ilave edilmemiştir.)

^{a,b,c,d} Aynı kolondaki farklı harflendirme, istatistiksel olarak farklılık olduğunu göstermektedir (p<0.05)

Ekmekek kalitesini belirlemede en önemli kalite özelliklerinden biri ekmekek hacmidir. Ekmekek üretimi sırasında fermentasyon aşamasında mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucunda CO₂ oluşmakta ve ekmeğinin hacim kazanmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada üretilen ekmeklerin hacim miktarı değerleri incelendiğinde en yüksek hacimli ekmeğinin kontrol ekmeği olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Starter kültür ile yaş mayanın beraber kullanımı sonucunda ekmekek hacminin kontrol ekmeğine kıyasla azaldığı (p<0.05) ve sadece starter kültür kullanıldığında ekmekek hacminin oldukça düşük bir değerde olduğu tespit edilmiştir. Starter kültür ve yaş maya kullanmadan, sadece spontan fermentasyon ile üretilen ekmeğinin hacim değerinin diğer örneklerle kıyasla en düşük seviyede olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Çalışmada, *L. sanfranciscensis*

kullanılarak üretilen ekmeğin hacminin spontan fermentasyon ile üretilen ekmeğin hacmine kıyasla daha yüksek bir değerde olduğu ($p<0.05$) ancak kontrol ekmeğinin hacim değerine yakın bir hacim değeri elde etmek için *L. sanfranciscensis*'in yaş maya ile birlikte kullanılması gerektiği tespit edilmiştir.

Şekil 4.15'de görüldüğü üzere ekşi hamur ile üretilen ekmeklerin gözeneklerinin küçük olduğu ve ekmek kabuğuna yakın noktada büyük bir boşluk olduğu, ekmek renginin ise daha koyu olduğu görülmektedir. Yaş maya kullanılarak üretilen ekmekler ise büyük gözenek yapısına sahip ve gözeneklerin homojen olarak dağıldığı, ekmek renginin ise ekşi hamurlara göre daha açık olduğu görülmektedir.



Şekil 4.15. Ekmeklerin kesit görünümü.

K: Kontrol ekmeği (sadece yaş maya içermektedir.), EHE1:Ekşi Hamur Ekmeği-1 (starter kültür ile fermentasyon), EHE2:Ekşi Hamur Ekmeği2 (Starter kültür ile fermentasyon ve yaş maya içermektedir, EHE3:Ekşi Hamur Ekmeği3 (spontan fermentasyon ile üretilmiştir ve starter kültür, maya ilave edilmemiştir.)

Ekmeğin spesifik hacmi ekmeğin kalite özelliklerinden biri olup ekmek hacminin ekmek ağırlığına oranlanmasıyla belirlenmektedir. Ekmek hacminin ekmek ağırlığıyla uyumlu olması tüketiciler tarafından tercih edilmektedir (Pyler, 1988; Elgün ve Ertugay, 2002).

Çalışmada; hazırlanan hamurlar 400 gr'lık eşit parçalara bölünerek şekil verilmiş, ekmek pişirme kaplarına yerleştirilmiş ve pişirilerek ekmek üretimi yapılmıştır. Bu sebeple elde edilen ekmeklerin gramajları da birbirine oldukça yakın değerlerdedir. Buna bağlı olarak, bu çalışma için ekmek hacmi ile ilgili elde edilen bulgular ve sonuçlar ekmek spesifik hacim değerleri için de geçerlidir.

Çizelge 4.7’de verilen ekmeklerin pişme kaybı değerleri incelendiğinde; EHE1 ve EHE3’ün pişme kaybı değerlerinin kontrol ve EHE2’ye kıyasla oldukça düşük değerlerde olduğu belirlenmiştir. Ekmeklerin nem oranı incelendiğinde; çalışmada üretilen tüm ekmeklerin nem oranı değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir.

4.6.2 Ekmeklere ait tekstürel özellikler

Ekşi hamur ekmeklerine ait ekmek içi tekstürel özellikler incelenmiştir ve bu özelliklere ait değerler Çizelge 4.7’de verilmiştir. Ekmek içi tekstürel özellikler belirlenirken kuvvet deformasyon süre grafiklerinden yararlanılmıştır ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Ekmeklerin ekmek içi sertlik değerleri incelendiğinde; en yüksek sertlik değerinin EHE3’de (33.314 ± 6.168) olduğu ($p < 0.05$), kontrol ekmeği ve EHE1 arasında istatistiksel olarak fark bulunmadığı ve en düşük sertlik değerine ise EHE2’nin (1.642 ± 0.244) sahip olduğu ($p < 0.05$) görülmektedir. Starter kültür ile yaş mayanın birlikte kullanılmasının ekmek içi sertlik değerini azalttığını gözlenmiştir.

Çizelge 4.8. Ekmeklere ait tekstürel özellikler.

Örnek	Sertlik(N)	Esneklik(g)	Yapışkanlık(g.s)	Sakızımsılık(g)	Çiğnenebilirlik(mj)	Elastiklik
K	21.96±3.191 ^b	0.904±0.036 ^b	0.806±0.027 ^b	1928.301±254.186 ^b	1740.685±220.303 ^b	0.496±0.046 ^b
EHE1	21.315±3.080 ^b	0.901±0.030 ^b	0.809±0.029 ^b	1874.839±242.053 ^b	1688.676±299.761 ^b	0.501±0.049 ^b
EHE2	1.642±0.244 ^c	1.948±0.524 ^a	0.872±0.027 ^a	152.089±23.071 ^c	295.638±92.195 ^c	0.571±0.038 ^a
EHE3	33.314±6.168 ^a	0.866±0.032 ^b	0.769±0.033 ^c	2816.312±470.058 ^a	2432.884±384.211 ^a	0.436±0.534 ^c

K: Kontrol ekmeği (sadece yaş maya içermektedir.), EHE1:Ekşi Hamur Ekmeği-1 (starter kültür ile fermentasyon), EHE2:Ekşi Hamur Ekmeği2 (Starter kültür ile fermentasyon ve yaş maya içermektedir, EHE3:Ekşi Hamur Ekmeği3 (spontan fermentasyon ile üretilmiştir ve starter kültür, maya ilave edilmemiştir.)

a,b,c,d Aynı kolondaki farklı harflendirmeler, istatistiksel olarak farklılık olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Çizelge 4.8. incelendiğinde; EHE2'nin diğer ekmeklere kıyasla en yüksek esneklik değerine (1.948 ± 0.524) sahip olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Kontrol örneği, EHE1 ve EHE3'e ait esneklik değerlerinin EHE2'ye göre daha düşük olduğu ve birbirleri aralarında fark bulunmadığı belirlenmiştir. Starter kültür ile yaş mayanın beraber kullanımının ekmeğin esneklik değerini arttırdığı gözlenmiştir.

Ekmek içi yapışkanlık değerleri değerlendirildiğinde; en yüksek değerin EHE2'ye (0.872 ± 0.027), en düşük değerin ise EHE3'e ait olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Sadece starter kültür kullanılarak üretilen ekmeğin ekmeğin içi yapışkanlık değeri ile kontrol örneğinin ekmeğin içi yapışkanlık değeri arasında önemli bir fark gözlenmemiştir, ancak starter kültür yaş maya ile beraber kullanıldığında ekmeğin içi yapışkanlık değerini arttırmıştır ($p < 0.05$). Spontan fermentasyon ile elde edilen ekşi hamurun ekmeğin yapımında kullanımı ise ekmeğin içi yapışkanlık değerinin azalmasına sebep olmuştur.

Ekmeklerin ekmeğin içi sakızimsılık ve çiğnenebilirlik değerleri incelendiğinde; en yüksek değerlere EHE3'ün (2816.312 ± 470.058 , 2432.884 ± 384.211) ve en düşük değerlere ise EHE2'nin (152.089 ± 23.071 , 295.638 ± 92.195) sahip olduğu belirlenmiştir. Starter kültür ile yaş mayanın beraber kullanımı ekmeğin içi sakızimsılık ve çiğnenebilirlik değerlerini azaltmıştır. Ekmeğin içi sakızimsılık ve çiğnenebilirlik değerleri bakımından EHE1 ile kontrol ekmeği arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir.

Ekmek içi elastiklik değerleri değerlendirildiğinde; en yüksek elastiklik değerinin yaş maya ile starter kültürün beraber kullanıldığı durumda (EHE2), en düşük elastiklik değerinin ise EHE3'de elde edildiği belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Ekmeklerin ekmeğin içi tekstürel özellikleri genel olarak değerlendirildiğinde; starter kültür ile yaş mayanın (EHE2) beraber kullanımı sonucu üretilen ekmeğin ekmeğin içi tekstürel özelliklerinin kontrol ekmeğine (K) kıyasla daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Spontan fermentasyon ile üretilen ekşi hamurun kullanıldığı ekmeğin (EHE3) ise tekstürel özelliklerinin kontrol ekmeğine göre daha az gelişmiş olduğu belirlenmiştir.

Yağmur (2013), tarafından yapılan çalışmada sıvı ekşi hamur üretiminde starter kültür karşımı kullanımı ile ekmeğin çiğnenebilirlik değerlerinin 4.45-5.09 Nmm arasında olduğu ve S2 (*L. sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *L. spicher*; *S.*

cerevisiae) starter kültür kullanımı ile çiğnenebilirlik değerinde azalma olduğu belirtilmiştir. Yapışkanlık değeri ise 0.72-0.80 N arasında bulunmuş ve buğday unu kullanımının yapışkanlık değerini azalttığı bildirilmiştir (Yağmur, 2013).

4.6.3 Ekmeklere ait renk ölçümleri

Renk ölçümü ile ekmeklerin ekmek içi L^* , a^* , b^* değerleri belirlenmiştir. L^* değeri açıklıktan koyuluğa, $+a$ kırmızılığı, $-a$ yeşilliğe, $+b$ sarılığı ve $-b$ ise maviliğe gidişi göstermektedir. Ekşi hamur ekmeklerine ait ekmek içi renk değerleri Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Ekmek içi L^* değerleri incelendiğinde; kontrol ekmeği ve EHE2’nin istatistiksel olarak birbirinden önemli derecede farklı olmadığı ancak EHE1 ve EHE3’e kıyasla daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca, EHE1 ve EHE3’ye ait ekmek içi L^* değerleri arasında istatistiksel bakımdan önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Bu değerlere göre ekşi hamur ekmeği üretimi için yaş maya kullanımının ekmeğin L^* değerini arttırdığı ve ekmeğin daha parlak renkte olmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Ancak sadece starter kültür kullanımının kontrol ekmeğine göre ekmeğin parlaklığını üzerine azaltıcı etkisi olduğu belirlenmiştir.

Ekmek içi a^* değerleri incelendiğinde; en yüksek a^* değerine EHE3’ün sahip olduğu, bunu EHE1’in takip ettiği, EHE2 ve kontrol örneğinin ise en düşük a^* değerine sahip oldukları görülmektedir ($p<0.05$). Ayrıca, EHE2 ve kontrol örneğinin a^* değerlerinin istatistiksel açıdan farklılık göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre ekşi hamur ekmeği üretiminde yaş maya kullanımının ekmek içi a^* değerini azalttığı ifade edilebilir.

Çizelge 4.9. Ekmek örneklerine ait renk analizi sonuçları.

Örnek	L*	a*	b*
K	78.743±3.159 ^a	1.863±0.018 ^c	17.018±0.063 ^c
EHE1	74.832±0.348 ^b	2.707±0.029 ^b	18.37±0.015 ^a
EHE2	79.54±0.250 ^a	1.908±0.039 ^c	15.557±0.071 ^d
EHE3	74.182±0.505 ^b	3.065±0.091 ^a	17.751±0.328 ^b

L*, a*, b* değerleri belirlenmiştir. L* değeri açıklıktan koyuluğa, +a kırmızılığı, -a yeşilliğe, +b sarılığı ve -b ise maviliğe gidişi göstermektedir.

^{a,b,c,d} Aynı kolondaki farklı harflendirmeler, istatistiksel olarak farklılık olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Ekmeklere ait ekmek içi b* değerleri incelendiğinde; kontrol, EHE1, EHE2 ve EHE3'e ait b* değerlerinde meydana gelen değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. En yüksek b* değerinin EHE1'e, en düşük b* değerinin ise EHE2'ye ait olduğu Çizelge 4.9'da görülmektedir (p<0.05). Sadece starter kültür kullanımının ekmek içi b* değerini arttırdığı, starter kültür ile yaş mayanın birlikte kullanılmasının ise ekmek içi b* değerinin azalmasına yol açtığı belirlenmiştir.

Ekşi hamur ekmeğine ait renk değerlerini içeren çalışması sayısı oldukça az olup sadece *L. sanfranciscensis* ile üretilen ekşi hamur ekmeğine ait renk değerine bu tez çalışması kapsamında literatürde rastlanmamıştır.

Yağmur (2013), tarafından yapılan çalışmada, farklı mikroorganizma suşu kullanımının ekmeğin rengi üzerine etkisi olmadığı belirtilmiştir. Ekmeklere ait b değerlerinin 17.34-18.49; L değerlerinin 67-71.36; a* değerlerinin ise -1.02 ile -0.17 arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca farklı unlar ile üretilen ekmeklerin renk değerlerinin farklı olduğu bildirilmiştir (Yağmur, 2013).

Corona et al. (2016), yapılan bir çalışmada *Weissella cibaria* ve *Leuconostoc citreum* suşları (*Weissella cibaria* PON10030, PON10032, *Leuconostoc citreum* PON 10079, PON10080) tek tek ve beraber ekşi hamur üretiminde starter kültür olarak kullanılmış ve renk değerleri incelenmiştir. Bu çalışma *W. cibaria* ile yapılan ekmeklerin L* değerinin kontrol ekmeğine göre farklılık gösterdiği ve daha düşük olduğu, a* değerlerinin ise kontrol ekmeği hariç tüm ekmekler istatistiksel olarak farklılık bulunmadığını belirtmişlerdir. b* değerleri ise tüm ekmekler için kontrol ekmeği ile farklılık bulunmadığı belirtilmiştir (Corona et al., 2016).



5.SONUÇ

Bu tez çalışmasında, farklı besi ortamı bileşenlerinin *L. sanfranciscensis*'in gelişmesi üzerine etkisi incelenmiştir. İncelenen besi ortamı bileşenlerinden *L. sanfranciscensis*'in gelişmesi üzerinde etkisi olduğu belirlenen bileşenler seçilmiş ve Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak *L. sanfranciscensis*'in gelişmesi için optimum olan bir fermentasyon ortamı tasarlanmıştır. Optimum koşullarda çoğaltılan *L. sanfranciscensis* hücreleri kullanılarak ekşi hamur ekmeği üretilmiş ve ekşi hamurun ve ekşi hamur ekmeğinin karakteristik özellikleri incelenmiştir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında; maltoz, maya ekstraktı ve hidrolize soya ortamı'nın *L. sanfranciscensis*'in gelişmesi üzerinde etkisi olduğu, ancak Tween 80'in etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Tween 80 gelişme üzerine etkisi bulunmasa da fermentasyon ortamında bazı maddelerin daha iyi çözülme sağladığı için fermentasyon ortamlarının hazırlanmasında önem arz etmektedir.

L. sanfranciscensis'in gelişmesine substrat konsantrasyonunun etkisi incelendiği zaman, en yüksek O.D. değerinin % 2 maltoz kullanıldığı zaman elde edildiği belirlenmiştir. Denenen farklı azot kaynakları içerisinde en yüksek canlı hücre sayısı maya ekstraktı kullanıldığı durumda elde edilmiştir. Maya ekstraktı konsantrasyonunun üremeye etkisi incelendiği zaman, en yüksek O.D. değerinin % 2.3 maya ekstraktı konsantrasyonunda elde edilmiş ancak % 2.3 ile % 1.7 maya ekstraktı içeren fermentasyon ortamlarında O.D. değerleri açısından istatistiksel olarak fark olmadığı belirlenmiştir. Bu sebeple çalışmanın devamında fermentasyon ortamında % 1.7 maya ekstraktı kullanılmıştır. Farklı Tryptic Soy

Broth konsantrasyonları arasında ise en yüksek optik yoğunluk değerine ulaşmak için fermentasyon ortamına % 0.6 hidrolize soya ortamı eklenmesi gerektiği belirlenmiştir. *L. sanfranciscensis*'in gelişmesi için gerekli başlangıç ortam pH'sı ise pH 6.5 olarak tespit edilmiş ve 48 saatlik sonunda fermentasyon ortamının pH'sının 4.47'e düştüğü belirlenmiştir. Optimum fermentasyon ortamı bileşiminin belirlenmesi amacıyla maltoz konsantrasyonu, maya ekstraktı konsantrasyonu ve hidrolize soya ortamı konsantrasyonu Cevap Yüzey Yöntemi ile optimize edilmiştir. Bu üç değişkenin optik yoğunluk üzerine lineer, kuadratik ve interaksiyon etkileri incelenmiştir. Model tarafından belirlenen 20 noktada deneyler yapılmış ve deneysel sonuçlar yardımıyla ikinci dereceden model denkliği elde edilmiştir. Modele ait R^2 değeri 0.9997 olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda maltoz konsantrasyonu % 1.86 w/v, maya ekstraktı konsantrasyonu % 2.39 w/v ve hidrolize soya ortamı % 0.68 w/v olarak belirlenmiştir. Model tarafından tahminlenen en yüksek optik yoğunluk 1.132 olarak belirlenmiştir. Üretim sonucunda gerçek optik yoğunluk değeri elde edilmiştir. Optimizasyon öncesi optik yoğunluk değeri 1.120 ± 0.007 , biyokütle miktarı 1.730 ± 0.002 gr/L iken optimizasyon sonrası optik yoğunluk değeri 1.280 ± 0.027 'ye, biyokütle miktarı ise 1.928 ± 0.007 gr/L 'ye ulaşmıştır. Belirlenen optimum koşullarda *L. sanfranciscensis*'e ait gelişme kinetiği incelenmiş ve spesifik üreme hızı 0.025 sa^{-1} olarak belirlenmiştir.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında optimum koşullarda gelişen *L. sanfranciscensis* fermentasyon ortamından ayrılmış ve starter kültür olarak ekşi hamur ekmeği üretiminde kullanılmıştır. Starter kültür kullanılarak üretilen ekşi hamurun pH değerinin fermentasyon başında hızla düştüğü ve fermentasyon sonunda spontan fermentasyona göre hamur pH 'sının daha düşük olduğu tespit

edilmiştir. Ekmek hamuruna ait TTA değeri 8.5 ± 0.389 mL 0.1N NaOH, pH değeri 4.15 ± 0.233 ve laktik asit bakterisi sayısı 8.3 ± 0.121 log KOB/gr olarak belirlenmiştir. Laktik asit bakterisi sayısı kontrol ekmeğine göre yalnızca 2 log KOB/gr artmış olmasına rağmen ekmeğin renk ve tekstürel özelliklerinin değiştiği belirlenmiştir.

Ekşi hamur ekmeklerinin kalite özellikleri değerlendirildiğinde; starter kültür kullanımının ekmeğin en önemli kalite özelliklerinden bir tanesi olan hacim değerini azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca ekşi hamur ile üretilen ekmeklerin gözenek yapısının daha sıkı olduğu ve ekmek içlerinin daha yapışkan olduğu gözlenmiştir.

L. sanfranciscensis kullanılarak üretilen ekşi hamur ekmeğine ait ekmek içi tekstürel özellikler değerlendirildiğinde; sertlik değeri açısından kontrol ekmeği ile önemli bir fark olmadığı, ancak yaş maya ile beraber kullanıldığı durumda ekmek içi sertlik değerinin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, *L. sanfranciscensis*, yaş maya ile beraber kullanıldığında ekmek içi esneklik, yapışkanlık ve elastiklik değerlerinin kontrol ekmeğine kıyasla arttığı, ekmek içi sakızımsılık ve çiğnenebilirlik değerlerinin ise kontrol ekmeğine kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. Spontan fermentasyon ile üretilen ekmeklerde ise ekmek içi sertlik, sakızımsılık ve çiğnenebilirlik değerlerinin diğer ekmeklere kıyasla daha yüksek, ekmek içi yapışkanlık ve elastiklik değerlerinin ise daha düşük olduğu belirlenmiştir.

L. sanfranciscensis kullanılarak üretilen ekşi hamur ekmeğine ait ekmek içi renk değerleri incelendiğinde; L^* , a^* , b^* değerleri sırasıyla 74.832 ± 0.348 , 2.707 ± 0.029 , 18.37 ± 0.015 olarak bulunmuştur. Starter kültür ile yaş mayanın

birlikte kullanılmasının ekmek içi L^* değerini kontrol örneğine kıyasla önemli derecede değiştirmediği gözlenmiştir. Ekşi hamur ekmeği üretiminde yaş maya kullanımının ekmek içi a^* değerini azalttığı belirlenmiştir. Sadece starter kültür kullanımının ekmek içi b^* değerini arttırdığı, starter kültür ile yaş mayanın birlikte kullanılmasının ise ekmek içi b^* değerini azalttığı tespit edilmiştir.

Literatürde *L. sanfranciscensis*'in gelişmesinde kullanılabilir besiyeri optimizasyonu üzerine yapılan çalışmaların genellikle çok eski ve yetersiz olduğu görülmektedir. *L. sanfranciscensis*'in gelişmesinde etkili besi ortamı bileşenlerinin seçiminde PB deney tasarım metodunun kullanıldığı ve gelişme koşullarının CYY ile optimize edilmesi yönelik bir çalışmanın literatürde olmadığı görülmektedir. Bunun yanı sıra starter kültür olarak kullanımının önemli olduğu belirtilmesine rağmen *L. sanfranciscensis*'in starter kültür olarak kullanıldığı çalışma sayısı oldukça azdır ve spontan fermentasyon ile üretilen ekşi hamurun mikroflorasındaki etkileşimi taklit etmek amacıyla genellikle diğer *Lactobacillus* 'lar ile beraber kullanılmıştır.

Bu alışma kapsamında raf ömrü testleri yapılmamıştır. *L. sanfranciscensis*'in starter kültür kullanımının ekşi hamur ekmeğinin raf ömrü üzerine etkisini inceleyen çalışmaların yapılması literatürün gelişmesine katkı sağlayacaktır.

Literatürdeki diğer çalışmalar değerlendirildiğinde *L. sanfranciscensis*'in gelişme koşullarının optimizasyonu için alternatif karbon ve azot kaynakları kullanılarak *L. sanfranciscensis*'in saf kültür olarak retilbilmesi için üretim maliyetini azaltacak bir çalışmanın literatürde yer almadığı görülmektedir. Bu

sebeple karbon kaynağı veya azot kaynağı olarak kullanılabilen sanayi yan ürünlerinin değerlendirilmesi gerektiği görülmektedir.

Ekşi hamur üretim sürecini hızlandırmak amacıyla hızlı üreyen laktik asit bakterileri belirlenmelidir. Bu laktik asit bakterilerini seçmek amacıyla yapılan izolasyon çalışmaları, izole edilen laktik asit bakterilerinin üreme kinetiği ile ilgili çalışmalar ile desteklenmelidir.

Bu tez çalışması sayesinde *L. sanfranciscensis*'in gelişmesinde etkili biyoproses koşulları ve besi ortamı bileşenleri detaylı olarak incelenmiş ve matematiksel yöntemler ile besi ortamı bileşenleri optimize edilerek, optimum bir besi ortamı formülasyonu geliştirilmiştir. *L. sanfranciscensis*'in starter kültür olarak kullanımı ile elde edilen ekşi hamur ekmeğinin kalite özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların, konu hakkındaki literatür boşluğunu doldurması ve ileride yapılacak diğer çalışmalar için yön gösterici özellikte olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aeschlimann, A., and Von Stockar, U., 1990, The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32:398–402p.

Amrane, A. and Prigent, Y., 1997, Growth and lactic acid production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey: Influence of peptidic nitrogen deficiency. *Journal of Biotechnology*, 55(1): 1–8p.

Anonymous, 1978, Standart Methoden für getreide Mehl und Brot. 6, Erweiterte Auflage, Im Verlag Moritz Schafer, Detmold.

Arendt, E.K., Ryan, L.A.M. and Dal Bello, F., 2007. Impact of Sourdough on the Texture of Bread. *Food Microbiology*, 24:165-174p.

Baş, D. and Boyacı, İ.H., 2007. Modelling and optimization I: Usability of response surface methadology. *Journal of Food Engineering*. 78: 836-845p.

Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, A., Pankova, L. and Danilevich, A., 2002. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 38:701-706p.

Carnevali, P., Ciati, R., Leporati, A. and Paese, M., 2007, Liquid Sourdough Fermentation: Industrial Application Perspectives. *Food Microbiology*, 24: 150-154.

Chavan, R. S., and Chavan, S. R., 2011, Sourdough Technology-A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(3), 169–182p.

Collar C. and Martinez C.S., 1993, Amino acids profiles of fermenting wheat sour doughs. *Journal of Food Science*, 58, 1324-1328p.

Corona, O., Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Nasca, A., Francesca, N., Martorana, A., Moschetti, G. and Luca Settanni, 2016, Industrial application

of selected lactic acid bacteria isolated from local semolinas for typical sourdough bread production. *Food Microbiology*, 59(2016):43-56p.

Corsetti A and Settanni L.,2007, *Lactobacilli* in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40:539–558p.

Dağbaşı, S., 2009, Beta galaktosidaz enzim üretiminin optimizasyonu ve saflaştırması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir, Türkiye, 192s.

Damiani, P., Gobbetti, M., Cossignani, L., Corsetti, A., Simonetti, M.S. and Rossi, J., 1996, The Sourdough Microflora. Characterization of Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria, Yeasts and Their Interactions on the Basis of the Volatile Compounds Produced. *Food Science and Technology*, 29(1-2): 63-70p.

De Luca, 2009, Salts or complexes of methyl donors with phytic acid or its derivatives and method for the synthesis thereof. United States Patent Application Publication, US 2009/0175914 A1, Jul 9, 2009p.

De Vuyst, L., Schrijvers V., Paramithiotis, Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. and Messens, W., 2002. The Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Greek Traditional Wheat Sourdoughs Is Reflected in Both Composition and Metabolite Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:6059-6069.

De Vuyst, L and Neysens, P, 2005, The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 16:43-56p.

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G. and Daniel, H.M., Weckx, S., 2014, Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiology*, 37:11-29p.

Decock, P.,and Cappelle, S., 2005, Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1–3): 113–120p.

Di Cagno, R., Barbato, M., Di Camillo, C., Rizzello, C. G., De Angelis, M., Giuliani, G. and Cucchiara, S., 2010, Gluten-free sourdough wheat baked goods

appear safe for young celiac patients: a pilot study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 51(6), 777-783p.

Elgün, A. ve Ertugay, Z., 2002, Tahıl İşleme Teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 718, Ziraat Fakültesi No: 297, Ders Kitapları Serisi No: 52, 407s.

Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Stora, A., Gobbetti and M., Di Cagno, R., 2013 Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (24):7827-7836p.

Galle, S., Schwab, C., Dal Bello, F., Coffey, A., Gänzle, M. G. and Arendt, E. K., 2012, Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 105-112p.

Gänzle, M. and De Vuyst, L., 2004, Sourdough fermentation from fundamentals to applications. *Cereal Foods World* 49:42p.

Ghafari, S., Aziz H.A., Isa, M.H., Akbar, and Zinatizadeh, 2009, Application of response surface methodology (RSM) to optimize coagulation–flocculation treatment of leachate using poly-aluminum chloride (PAC) and alum. *Journal of Hazardous Materials*, 163 (2009): 650-656p.

Gobbetti, M., 1998, The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology*, 9(7), 267-274.

Gobbetti, M., Smacchi, E., Fox, P., Stepaniak, L. and Corsetti, A., 1996, The sourdough microflora. Cellular localization and characterization of a proteinase, dipeptidase and aminopeptidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:3220-3226p.

Gobbetti, M. and Corsetti, A., 1997. *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiology*, 14:175-187p.

Gobbetti, M., and Gänzle, M. (Eds.), 2012, Handbook on sourdough biotechnology. Springer Science & Business Media.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A. and Cagno, R.D. 2005, Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 16:57–69p.

Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R. and De Angelis, M., 2016, Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *International Journal of Food Microbiology*, 239:3-18p.

Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Di Cagno, R. and De Angelis, M., 2007, Sourdough *Lactobacilli* and celiac disease. *Food microbiology*, 24(2), 187-196p.

Göçmen, D., 2001, Ekşi hamur ve laktik asit starter kullanımının ekmekte aroma oluşumu üzerine etkileri. *GIDA*, 26(1):13-16p.

Göksungur, Y., 1998, Melastan laktik asit üretiminde farklı üretim tekniklerinin kullanılabilirliği ve ortam şartlarının optimizasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, İzmir, Türkiye, 155s.

Göksungur, Y., 2011, Reaction and fermentation kinetics in food engineering. Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, Türkiye, 143s. ISBN: 978-9944-5660-1-8.

Gül, H., Özçelik, S., Sağdıç, O., & Certel, M., 2005, Sourdough bread production with *Lactobacilli* and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochemistry*, 40(2), 691-697p.

Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, J., Seitter, M.F.H. and Vogelmann, S.A., 2005, Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 4-11p.

Hansen, A. and Schieberle, P., 2005, Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 16:85–94p.

Hendek Ertop, M. and Hayta, M., 2016, Ekşi hamur fermentasyonunun ekmeği biyoaktif bileşenleri ve biyoyararlanım üzerindeki etkileri. *GIDA*, 41(2): 115-122s.

ICC Standard Nr. 110/1., 1976, Determination of the moisture content of cereals and cereal products (practical method). Year of approval:1960. Year of last revision:1976. ICC-International Association for Cereal Science and Technology, Vienna, Austria.

ICC-Standard Nr. 114/1., 1992, Method for using the Brabender Extensograph. Year of approval:1972. Year of last revision:1992. ICC-International Association for Cereal Science and Technology, Vienna, Austria.

ICC-Standard Nr. 155., 1994, Determination of wet gluten quantity and quality (gluten index ac. to Perten) of whole wheat meal and wheat flour (*Triticum aestivum*). Year of approval:1994. ICC-International Association for Cereal Science and Technology, Vienna, Austria.

Jaapar, S.Z.S., Ali, E., Kalil, S., Anuar, N., 2011, Effects of different initial pH, argon gas and nitrogen gas on cell growth and hydrogen production using *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 1(1): 8-15p.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B., 1995, Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiology Review*. 59:171-200p.

Kline, L. and Sugihara, T.F., 1971, Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Applied Environmental Microbiology*, 21 (1971):459-465.

Koç, B. ve Kaymak-Ertekin, F., 2009, Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları. *GIDA* 35(1):1-8s.

Korakli, M., Pavlovic, M., Ganzle, M.G. and Vogel, R.F., 2003, Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Applied Environmental Microbiology*, 69:2073–2079p.

Kulp, K., Lorenz, K., Wirtz, R.L., Stolz, P., Maloney, D.H., Foy, J.J., Martinez- Anaya-M.A., Kulp, K., Sugihara, T.F., Lorenz, K., Poitrenaud, B., Katina, K., Kerojoki, H. Valjakka, T.T, Bruemmer, J.M., Benedito, K., Carmen, Rosell, C.M., 2003, Handbook of sourdough fermentations. Marcel Dekker Inc, New York, USA. 303p.

Lattanzi, A., Minervini, F. and Gobbetti, M., 2014, Assessment of comparative methods for storing type-I wheat sourdough. *Food Science and Technology*, 59(2014): 48-955p.

Leroy, F. and De Vuyst, L., 2004, Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Science and Technology*, 15: 67–78p.

Martinez-Anaya, M.A., 1996. Enzymes and bread flavour. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 2469-2480p.

Martinez- Anaya, M.A., Pirach, B., Bayarri, P. and Benedito de Barber, C., 1990, Microfloraof the surdough of wheat flour bread Interactions between yeast and lactic acid bacteria in wheat doughs and their effects on bread quality. *Cereal Chemistry*, 67,85-91p.

Menteş, Ö., Akçelik, M., & Ercan, R., 2004, Türkiyede Üretilen Eksi Hamurlardan *Lactobacillus* Suşlarının İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Bu Suşların Temel Endüstriyel Özellikleri. *GIDA*, 29(5).

Messens, W., Neysens P., Vansieleghem, W., Vanderhoeven, J. and De Vuyst, L., 2002, Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* dce 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Applied Environmental Microbiology*, 63:1431-1435p.

Moore, M. M., Juga, B., Schober, T. J. and Arendt, E. K., 2007, Effect of lactic acid bacteria on properties of gluten-free sourdoughs, batters, and quality and ultrastructure of gluten-free bread. *Cereal Chemistry*, 84(4), 357-364p.

Moroni, A. V., Dal Bello and Arendt, E.K., 2009, Sourdough in gluten-free bread-making: an ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiology*, 26:676-684p.

Myers, R.H. and Montgomery D.C., 1995, Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, NY.

Neubauer, H., Glaasker, E., Hammes, W.P., Poolman, B., Konings, W.I.L.N., 1994, Mechanism of maltose uptake and glucose excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. *Journal of Bacteriology*, 1(5): 3007–3012p.

Novotni, D., Čukelj, N., Smerdel, B., Bituh, M., Dujmić, F. and Ćurić, D., 2012, Glycemic index and firming kinetics of partially baked frozen gluten-free bread with sourdough. *Journal of Cereal Science*, 55(2), 120-125p.

Paramithiotis, S., Chouliaras, Y., Tsakalidou, E. and Kalantzopoulos, G., 2005, Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochemistry*, 40:2813–2819p.

Plackett, R.L. and Burman, J.P., 1946, The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33, 305-325.p

Poutanen, K., Flander, L. and Katina, K., 2009, Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 26(7), 693-699p.

Pylar, E .J., 1988, Baking Science and Technology, Sosland Publishing Co. U.S.A., 1345s.

Rehman, S., Paterson, A. and Piggott, J.R., 2006, Flavour in sourdough breads: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 557-566p.

Rothe M. and Ruttloff, H., 1983, Aroma retention in modern bread production, *Die Nahrung*, 27, 505-512p.

Robert, C., Devillers, T., Wathelet, B., Van Herck, J.C. and Paquot, M., 2006, Use of a Plackett–Burman experimental design to examine the impact of extraction parameters on yields and compositions of pectins extracted from chicory roots (*Chicorium intybus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:7167-7174p.

Sriranganathan N., Seidler RJ, Sandine WE, and Elliker P.R., 1973, Cytological and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization

studies on *Lactobacillus* isolates from San Francisco sourdough. *Applied Microbiology*, 25(3): 461-470p.

Steinberg, D.M. and Bursztyn, D., 2010, Response surface methodology in biotechnology, *Quality Engineering*, 22(2): 78-87p.

Stolz, P., Böcker, G., Vogel, R.F. and Hammes, W.P., 1993, Utilisation of isolated from maltose and glucose by sourdough *Lactobacilli* isolated from sourdough. *FEMS Microbiology Letters*, 109: 237-242p.

Tieking, M. and Ganzle, M.G., 2005, Exopolysaccharides from cereal associated lactobacilli. *Trends in Food Science and Technology*, 16:79–84p.

Toit, M. D., Engelbrecht, L., Lern, E. and Krieger-Weber, S., 2011, *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures-an overview. *Food Bioprocess Technology*, 4:876-906p.

Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., 2002, Gıdaların mikrobiyolojik analizi, Meta Basım ve Matbaacılık İşleri, İzmir, Türkiye, 186s.

Wang, J. and Wan, W., 2009. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(1): 235-244p.

Weiss, N. and Schillinger, U., 1984, *Lactobacillus sanfrancisco* sp. Nov., nom. Rev. *System Applied Microbiology*, 5: 230-232p.

Yağmur, G., 2013, Ekşi hamur fermentasyonunda etkili olan laktik asit bakterilerinin ve mayaların belirlenmesi ve bunlardan elde edilen sıvı ekşi hamurun ekmek kalitesi üzerine etkisinin araştırılması. Doktora Tezi Çukurova Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilimdalı. Adana, Türkiye, 161s.

Yazar, G. and Tavman, Ş., 2012, Functional and Technological Aspects of Sourdough Fermentation with *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Food Engineering Reviews*, 4: 171-190p.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Filiz Döner

Doğum Tarihi : 13.08.1993

Doğum Yeri : İzmir

Öğrenim Durumu:

Lisans : Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2011-2015)

Yandal : Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü (2013-2016)

Yüksek Lisans :Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2015-Halen)

İş Deneyimi

Ağustos 2017- Halen : Laboratuvar Mühendisi

Vestel Beyaz Eşya Sanayi ve Ticaret A.Ş.

Yayınlar

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler.

Döner, F., Altınel, B., Göksungur, Y., (2017) *Lactobacillus sanfranciscensis*: Lactic Acid Bacteria in Sourdough Bread Production, Sustainable Postharvest and Food Technologies - INOPTTEP 2017, Vrsac, Serbia, April 23-28 2017 (Poster Presentation).

Kaplan-Türköz, B., Akpınar, D. D., Döner, F. (2016) Purification of Zymomonas mobilis levansucrase for structural studies ” Acta Crystallographica Section A, Volume 72, s216.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Döner, F., Göksungur, Y., (2017) “*Lactobacillus sanfranciscensis*’in Gelişmesinde Etkili Biyoproses Parametrelerinin Belirlenmesi ve Optimizasyonu” GIDA, 42(6): 666-675.

Erdal, Ö., Döner, F., Kaplan-Türköz, B., Göksungur, Y., (2016) “Mikrobiyel Yolla Üretilen Levansukrazlar ve Sentezlediği Biyopolimerler” GIDA, 41(4):283-290.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

Döner, F., Onur, E., Yüksel, H. P., Kayalar, H., Kışla, D., 2015. Kışniş ve Karabaş Otunun Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi, s. 137. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, 18-19 Aralık. (Poster Sunumu