

GLUTENSİZ BUĞDAY EKMEĞİ ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BÜŞRA ŞAHİN

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
AĞUSTOS - 2019**

GLUTENSİZ BUĞDAY EKMEĞİ ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BÜŞRA ŞAHİN

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Mahir TURHAN**

**MERSİN
AĞUSTOS - 2019**

ONAY

Büşra ŞAHİN tarafından Prof.Dr. Mahir TURHAN danışmanlığında hazırlanan “Glutensiz Buğday Ekmeği Üretimi” başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 1 Ağustos 2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Üye	Prof. Dr. Mahir TURHAN	
Üye	Prof. Dr. Mehmet Sertaç ÖZER	
Üye	Prof Dr. Hacı İbrahim EKİZ	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06.09.2019 tarih ve 2019-35/1357 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

1 Ağustos 2019 / 1 August 2019

İmza / Signature

Büşra ŞAHİN

ÖZET

GLUTENSİZ BUĞDAY EKMEĞİ ÜRETİMİ

Glutene duyarlı bireyler ömür boyu glutensiz diyet uygulamak zorundadırlar. Mevzuat gereği glutensiz gıdalar 20 ppm'in üstünde gluten içeremezler. Bu çalışmada buğday ununda gluten degradasyonu gerçekleştirerek "glutensiz buğday unu" ve "buğday-temelli glutensiz gıda" üretimlerinin mümkün olabileceğini göstermek amaçlanmıştır. Bu amaçla buğday unundan 400, 500, 600 ve 700 verimde hazırlanan sıvı hamurlara eşit miktarda olacak şekilde toplamda 500, 600, 700 ve 800 ppm *Aspergillus niger* ve *A. oryzae* proteazı eklenmiş ve 37 °C'de 36, 42 ve 48 saat fermente edilmiştir. Fermentasyon sonunda gluten derişiminin 20 ppm altına düştüğü koşullar belirlenmiştir. Glutensiz hale gelen en düşük verimli sıvı hamur 40 °C'de 48 saat kurutularak un haline getirilmiş ve ekmek üretiminde kullanılmıştır. Belirlenen koşullarda 400 verimli hamurda gluten seviyesi 20 ppm'in altına düşmemiştir. 500, 600 ve 700 verimli hamurlar sırasıyla en düşük 700, 600 ve 500 ppm enzim ilavesinde sırasıyla 48, 42 ve 42 saatte glutensiz hale gelmiştir. Hamur verimi arttıkça gluten derişiminin eşik değerin altına düşmesi için gerekli enzim derişimi ve fermentasyon süresi azalmıştır. Ayrıca enzim derişimi arttırmak fermentasyon süresini azaltmıştır. Hamur verimi pH ve asitlik üzerine etki etmiştir. Hamur verimi arttıkça titrasyon asitliği azalmıştır. Çalışmada elde edilen glutensiz buğday ununun protein değeri kuru maddede % 8.74, ticari glutensiz un karışımının % 1.6 olarak tespit edilmiştir. Duyusal değerlendirme sonucunda en beğenilen ekmek kontrol örneği olan normal buğday ekmeği (NBE) olmuştur. Ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmeğin (TGE) ve glutensiz buğday ekmeğinin (GBE) sadece genel görünümü, kabuk rengi ve tadı arasında istatistiksel olarak farklılık tespit edilmiştir. Genel görünüm ve kabuk rengi değerlendirmesinde GBE, TGE'den daha yüksek puan almıştır. Ekşi tadın yoğun olması sebebiyle GBE panelistler tarafından beğenilmemiş ve tat değerlendirmesinde en düşük puanı almıştır. İlerleyen çalışmalarda tat sorunu giderilmeli ve formülasyon çalışmaları ile yeni ürünler geliştirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Glutensiz, Ekşi hamur, Fungal proteaz, Buğday

Danışman: Prof. Dr. Mahir TURHAN, Mersin Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

PRODUCTION OF GLUTEN FREE WHEAT BREAD

Gluten-sensitive individuals have to follow a lifelong gluten-free diet. By regulation, gluten-free foods can not contain more than 20 ppm of gluten. In this study, it is aim to show that producing “gluten-free wheat flour” and “wheat-based gluten-free food” is possible by gluten degradation. For this aim, 500, 600, 700 and 800 ppm of *Aspergillus niger* and *A. oryzae* protease were added in equal amount to batters prepared from wheat flour in 400, 500, 600 and 700 yields and the batters fermented at 37 °C for 36, 42 ve 48 hours. At the end of fermentation, the conditions that gluten concentration decreased below 20 ppm were determined. The least yield batter that became gluten-free, was dried at 40 °C for 48 hours and used in bread production. The gluten level did not decrease below 20 ppm in the batter with 400 yield under the specified conditions. The batters with 500, 600 and 700 yields became gluten-free respectively at the lowest 700, 600 and 500 ppm enzyme addition respectively at 48, 42 and 42 hours. As the batter yield increased, the enzyme concentration and fermentation time required for the gluten concentration to decrease below the threshold value decreased. In addition, increasing the enzyme concentration decreased the fermentation time. Batter yield had an effect on pH and acidity. As the dough yield increased, the titratable acidity decreased. The protein value of gluten-free wheat flour obtained in the study and commercial gluten-free flour mixture.was determined respectively 8.74 % and 1.6 % in dry matter. As a result of sensory evaluation, the most popular bread was normal wheat bread (NBE) that is control sample. A statistically significant difference was found only between the overall appearance, shell color and taste of the breads that are made from commercial gluten-free flour (TGE) and gluten-free wheat flour (GBE). In the overall appearance and shell color assessment, GBE scored higher than the TGE. Due to the sour taste, GBE was not liked by the panelists and received the lowest score in the taste evaluation. In further studies, the taste problem should be solved and new products should be developed with formulation studies.

Keywords: Gluten free, Sourdough, Fungal protease, Wheat

Advisor: Prof. Dr. Mahir TURHAN, Department of Food Engineering, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Sadece akademik hayatta olmayıp hayata dair her konuda yol gösterici olan, danışman olmanın ötesinde öğrencilerine yaşam koçu olan, birlikte çalışmaktan onur ve zevk duyduğum çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Mahir TURHAN'a yüksek lisans tezimin planlanması ve yürütülmesinde göstermiş olduğu destek için teşekkür ederim.

Büyük bir özveri ile karşılaştığım sorunlarda yardım eden, pozitif enerjisi ile her zaman moral veren değerli hocam Arş. Gör. Dr. Özge KURT GÖKHİSAR'a tez çalışmamda sağlamış olduğu bilgi ve destek için teşekkür ederim.

Çalışmalarımı yürütmem için gerekli imkan ve yardımları sunan Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne, başta bölüm başkanı Prof. Dr. İbrahim EKİZ olmak üzere tüm bölüm hocaları ve çalışanlarına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamı 2017-2-TP2-2377 numaralı proje ile destekleyen Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne sağlamış olduğu maddi destekten dolayı teşekkür ederim.

Bölümümüzün aile sıcaklığındaki odası yl-101'e, değerli arkadaşlarım Güler ATASOY'a, Rıdvan ARSLAN'a, Welat MİRAN'a, Elif ATAY'a, Bilge ULUTAŞ'a, Özge ÖZMEN'e, Mahir CİN'e, Musa KAYAR'a, Felat GÜLSERİN'e, Ayşegül BİLGİÇ'e, Bihter İŞYARAN'a, Anıl ALPER'e, Ayşegül GÜLEÇ'e, Demet MANAP'a göstermiş olduğu arkadaşlık ve yardımlardan dolayı için teşekkür ederim.

Dostluğunu, sevgisini, yardımını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili dostum Özlem ERDAL'a yüksek lisans sürecim boyunca sağlamış olduğu manevi desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Sevgisiyle, güveniyle ve desteğiyle her zaman yanımda olan Ali MUMCU'ya teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman maddi ve manevi destek olan canım annem ve babama, Emine ablama, Fetanet ablama ve Arzu Arife ablama her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Gluten	3
2.1.1. Gliadinler	3
2.1.2. Gluteninler	4
2.2. Glutenle İlgili Rahatsızlıklar	4
2.2.1. Çölyak	6
2.3. Glutensiz Beslenme	7
2.4. Glutensiz Gıda Pazarı	9
2.5. Gluten Degradasyonu	10
2.5.1. Enzim Uygulamaları	10
2.6. Ekşi Hamur Fermentasyonu	13
2.6.1. Ekşi Hamur Tarihçesi ve Üretim Yöntemleri	13
2.6.2. Ekşi Hamur Fermentasyonun Olumlu Etkileri	15
2.6.3. Ekşi Hamurda Asidifikasyon ve Proteolitik Aktiviteler	17
2.6.4. Ekşi Hamurda Gluten Degradasyonuna Yönelik Yapılan Çalışmalar	18
2.6.4.1. Ekşi Hamur ile Enzim Kombinasyonu	19
2.7. Gluten Analiz Yöntemleri	21
2.7.1. ELISA yöntemi	22
2.7.1.1. Sandwich ELISA	22
2.7.1.2. Competitive ELISA	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Ekşi Hamur Fermentasyonu için Hazırlanan Hamur Bileşenleri	25
3.1.2. Ekmek Üretiminde Kullanılan Malzemeler	25
3.1.3. Kimyasallar	25
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Deneme Planı	26
3.2.2. Ham Madde Analizleri	26
3.2.2.1. Nem Tayini	26
3.2.2.2. Kül Tayini	26
3.2.2.3. Protein Tayini	27
3.2.2.4. Yağ Tayini	27
3.2.3. Gluten Degradasyonu için Sıvı Hamurların Hazırlanması	28
3.2.4. Ekşi Hamur Fermentasyonu	28
3.2.4.1. Gluten Tayini	29
3.2.4.2. pH Ölçümü	29
3.2.4.3. Titrasyon Asitliği Tayini	29
3.2.5. Glutensiz Buğday Unu Elde Eldilmesi	30
3.2.6. Glutensiz Buğday Ununda Yapılan Analizler	30
3.2.6.1. Nem Tayini	30

	Sayfa
3.2.6.2. Kül Tayini	30
3.2.6.3. Protein Tayini	30
3.2.6.4. Yağ Tayini	31
3.2.6.5. pH Ölçümü	31
3.2.6.6. Titrasyon Asitliği Tayini	31
3.2.7. Ekmek Üretimi	31
3.2.7.1. Ekmek Duyusal Analizi	32
3.2.8. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	33
4.1. Ham Madde Analiz Sonuçları	33
4.2. Sıvı Hamur Analiz Sonuçları	33
4.2.1. Gluten Tayini Sonuçları	33
4.2.1.1. 400 Verimli Sıvı Hamurların Gluten Tayini Sonuçları	34
4.2.1.2. 500 Verimli Sıvı Hamurların Gluten Tayini Sonuçları	34
4.2.1.3. 600 Verimli Sıvı Hamurların Gluten Tayini Sonuçları	36
4.2.1.4. 700 Verimli Sıvı Hamurların Gluten Tayini Sonuçları	38
4.2.2. pH Ölçüm Sonuçları	40
4.2.3. Titrasyon Asitliği Tayini Sonuçları	42
4.3. Glutensiz Buğday Unu Analiz Sonuçları	43
4.4. Ekmek Duyusal Analiz Sonucu	45
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	51
EKLER	61
ÖZGEÇMİŞ	62

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Ekşi hamurların sınıflandırılması ve tiplerine göre mikroflorası	15
Tablo 3.1. Sıvı hamurlarda gluten degradasyonu için oluşturulmuş deneme planı	26
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan buğday ununun içeriği	33
Tablo 4.2. 500 verimli hamurda enzim derişimine ve fermentasyon süresine göre gluten derişimi	36
Tablo 4.3. 600 verimli hamurda enzim derişimine ve fermentasyon süresine göre gluten derişimi	37
Tablo 4.4. 700 verimli hamurda enzim derişimine ve fermentasyon süresine göre gluten derişimi	39
Tablo 4.5. Glutensiz buğday ununun kimyasal analiz sonuçları	44
Tablo 4.6. Ekmek örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Glutenle ilişkili rahatsızlıkların sınıflandırılması	5
Şekil 2.2. Normal ve çölyak hastalığı-antrofik bağırsak mukozasının enine kesiti	6
Şekil.2.3. Glutensiz diyetteki besinsel eksiklikler ve fazlalıklar	8
Şekil 2.4. Gluten modifikasyonu veya gluten degradasyonu için enzim kaynakları	11
Şekil 2.5. Ekşi hamur üretim yöntemleri	14
Şekil 2.6. Ekşi hamurun besinsel, tekstürel, raf ömrü ve aroma açısından katkıları	17
Şekil 2.7. Ekşi hamurda LAB'ın proteolize katkısı	18
Şekil 2.8. ELISA yöntemleri: Sandwich ELISA, Competitive ELISA	23
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan fermentasyon sistemi	28
Şekil 4.1. Farklı verimlerde hazırlanan hamurlarda fermentasyon boyunca pH değerinin zamana bağlı değişimi	41
Şekil 4.2. Farklı verimlerde hazırlanan hamurlarda fermentasyon boyunca asitliğin zamana bağlı değişimi	42
Şekil 4.3. Ekmek örneklerinin dış görünümü	47
Şekil 4.4. Ekmek örneklerinin iç görünümü	47

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
AN-PEP	<i>Aspergillus niger</i> prolil endopeptidazının
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent deneyi
EPS	Eksopolisakkaritler
GBE	Glutensiz buğday ekmeği
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LAB	Laktik asit bakterileri
LC-MS	Sıvı kromatografisi –kütle spektrofotometresi
MALDI-TOF	Matris destekli lazer desorpsiyonu/iyonizasyon
NaCl	Sodyum klorür
NBE	Normal buğday ekmeği
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEP	Prolil endopeptidaz
ppm	Part per million (mg/kg)
RTE	Ready to eat-tüketime hazır
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TGB	Tercihli glutensiz beslenenler
TGE	Ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek
ZGB	Zorunlu glutenli beslenenler

1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde büyük önemi olan buğday dünyada üretim açısından kültür bitkileri arasında ilk sırada gelmektedir. Buğday besin değeri, işleme ve depolama kolaylığı nedeniyle birçok ülkede temel besin olarak tüketilmektedir. Buğday, bitkisel kaynaklı besinlerin sağladığı kaloringin dünyada % 20'sini, Türkiye'de % 53'ünü karşılamaktadır [1]. Beslenmede önemli bir yeri olan buğday bazı bireylerde rahatsızlıklara neden olmaktadır. Buğdayın toksik etkisi yapısında bulunan glutenden kaynaklanmaktadır.

Gluten, Triticeae familyasında bulunan buğday, arpa, çavdar gibi tahıllarda bulunan bir depo proteindir [2]. Osborne gluten proteinlerini alkolde çözünen prolaminler ve alkolde çözünmeyen glutelinler olarak sınıflandırmıştır [3]. İlk çalışmalar buğdaydaki gluten proteinlerinin prolamin (gliadin) fraksiyonunun toksik olduğunu ortaya koymasına rağmen güncel çalışmalar glutelin (glutenin) fraksiyonunun da çölyaklı bireyler için toksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir [4]. Prolaminler buğdayda gliadinler, çavdarda sekalinleri, yulafta aveninler ve arpada hordeinler olarak bulunmaktadır [4].

Glutensiz beslenme, gluten içeren buğday, çavdar, arpa, yulaf gibi tahılların ve bu tahıl türevlerinin diyetten çıkarıldığı beslenme şeklidir. Çölyak, dermatitis hepetiformis, gluten ataksisi, çölyak olmayan gluten hassasiyeti gibi glutenle ilgili rahatsızlığı olan bireyler glutensiz diyet uygulamak zorundadırlar. Glutensiz diyetle meyve, sebze, süt ve süt ürünleri gibi doğal olarak glutensiz gıdalar olduğu gibi mısır, pirinç, karabuğday gibi glutensiz ham maddelerden üretilmiş glutensiz gıdalar da bulunmaktadır. Türk Gıda Kodeksi ve Codex Alimentarius'a göre glutensiz olarak etiketlenmiş gıdalarda gluten derişimi 20 ppm'in altında olmak zorundadır[5-6].

Ürün geliştirmedeki kayda değer ilerlemeye rağmen glutensiz ham maddelerden üretilen glutensiz gıdaların tat, lezzet, renk, tekstür ve ağız hissi özellikleri glutenli denklrine göre daha zayıftır. Glutensiz beslenenler buğdayın besleyici değerinden ve lezzetinden mahrum kaldığı gibi buğday ürünlerinin aroma, tat ve tekstürüne özlem duymaktadırlar [7]. Bu nedenle buğday, arpa, çavdar gibi gluten içeren ham maddelerin besleyici, tekstürel ve duyuşal özelliklerini koruyarak çölyak hastalığının etkin olmayacağı şekilde işlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır [8].

En bilinen gluten hassasiyeti olan çölyak buğday tüketimi yaygın olan ülkelerde nüfusun % 1'ini etkilemektedir. Çölyaklılığın yanı sıra buğday ve glutenle ilgili diğer rahatsızlıklar dünya nüfusunun % 1-6'sını etkilemektedir [8]. Gluten hassasiyeti olan bireylerin çok büyük bir kısmına tanı konulmadığı için bu oranın Türkiye'de daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Gluten hassasiyeti olan bireyler glutensiz diyet uygulamak zorundadırlar.

Son yıllarda glutenin toksitesini ortadan kaldırmak amacıyla ekşi hamur fermentasyonunu ve enzim uygulamalarını kapsayan stratejiler geliştirilmiştir. Ekşi hamur fermentasyonu ile gluten degrade edilebilmesine rağmen buğday, çavdar, arpa ve yulaf gibi

tahıllardaki gluteni eşik değeri olan 20 ppm'in altına düşürmek için yeterli olmamış ve enzim uygulaması ile birlikte kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir [9-14].

Bu araştırmanın amacı buğday ununda gluten degradasyonu gerçekleştirmek ve “glutensiz buğday unu” ve “buğday-temelli glutensiz gıda” üretimlerinin mümkün olabileceğini göstermektir. Bu çalışmada glutensiz buğday unu ve buğday-temelli glutensiz gıda üretimi aracılığıyla pazarda yetersiz olan glutensiz ürün sayısının, çeşidinin ve beğenisinin artmasına ve pazara mevcut duruma göre daha ucuz glutensiz gıda arz edilmesini sağlayacak hizmetlerin gerçekleşmesine katkıda bulunmak hedeflenmiştir. Bu amaç ve hedef doğrultusunda, buğday ununda gluten degradasyonunu gerçekleştirmek için buğday unundan sıvı hamurlar hazırlanmış ve *Aspergillus niger* ve *A. oryzae* proteazı kullanılarak ekşi hamur fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon ve enzim uygulaması ile glutensiz hale getirilmiş sıvı hamurlar kurutulup öğütülerek glutensiz buğday unu elde edilmiştir. Glutensiz buğday unundan ekmek üretilerek buğday-temelli glutensiz gıda üretimlerinin mümkün olabileceğini gösterilmiştir. Türkiye’de ve dünyada buğdaydan elde edilmiş ticari glutensiz bir un ile karşılaşılması. Pazarda bulunan glutensiz un karışımları nişasta ağırlıklıdır ve bu nedenle besleyici değeri düşük unlardır. Bu unlardan üretilen glutensiz gıdalar tüketici ihtiyacını ve beklentisini karşılamamaktadır. Çalışma kapsamında üretilen glutensiz buğday ununun ticarileşmesi durumunda glutensiz gıda pazarına yeni bir ham madde ve üretim yöntemi sağlanacağı gibi, pazara besleyici değeri daha yüksek ve daha ucuz yeni bir ham madde ve ürün kazandırılmış olacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Gluten

Gluten, viskoelastik özelliklere sahip bir depo proteindir [15]. Codex Alimentarius'a göre "gluten; buğday, arpa, çavdar, yulaf ve bunların melezlerinde ve türevlerinde bulunan, suda ve 0.5 M NaCl'de çözünmeyen ve bazı insanların hassasiyeti olduğu bir protein fraksiyonu" olarak tanımlanmıştır [6].

Tahıllarda depo proteini olarak bulunan gluten, toplam buğday proteinin yaklaşık % 80-85'ini oluşturur [16]. Gluten proteinleri tahılların nişastalı endosperminde meydana gelir ve embriyo için azot ve amino asit kaynağı olarak görev yapar [8]. Hidrasyon ile gluten proteinleri, hidrasyon bağları, iyonik bağlar ve hidrofobik bağlar gibi kovalent olmayan etkileşim ile birleştirilmiş ve kovalent SS bağları ile stabilize edilmiş üç boyutlu viskoelastik bir ağ oluşturur [17]. Su varlığında mekanik işlem ile oluşan gluten ağı hamurun viskoelastik özelliklerinde ve gaz tutma kapasitesinde rol oynaması nedeniyle ekmek gibi fırıncılık ürünlerinde teknolojik açıdan büyük öneme sahiptir [18]. Glutenin bu viskoelastik özellikleri fırıncılık ürünlerinde özellikle ekmekte yüksek somun hacminin ve düzgün ekmek içi yapısının oluşmasını sağlamaktadır [19].

Buğdayda bulunan, su ve tuzlu suda çözünmeyen gluten proteinleri, alkol çözeltisinde (örneğin % 60 etanolde) çözülebilen monomerik gliadinler ve alkol çözeltisinde çözilemeyen polimerik gluteninler olmak üzere iki fraksiyondan oluşmaktadır [20, 21].

2.1.1. Gliadinler

Sulu alkol çözeltisinde çözünen gliadinler, disülfid bağları içermezler (ω -gliadin) ya da sadece zincir içi disülfid bağlarına (α -gliadin ve γ -gliadin) sahiptirler [22, 23]. Gliadinler 30000 ile 80000 arasında moleküler ağırlığa sahip olup tek zincirlidirler ve hidrate olduklarında son derece yapışkandırılar [16]. Gliadinler prolin ve glutamin bakımından zengin olup düşük seviyelerde yüklü amino asit içerirler [16, 24]. Monomerik proteinlerden oluşan gliadinler, jel elektrofarezinde düşük pH'da hareketliliklerine göre α , β , γ ve ω olmak üzere dört gruba ayrılırlar [20]. Yapılan çalışmalar sonucunda gluten toksisitesinin gliadin fraksiyonundan kaynaklandığı tespit edilmiştir [25]. Gliadinin bütün alt fraksiyonları (α , β , γ ve ω) çölyak hastaları için toksik etkiye sahiptir [26].

2.1.2. Gluteninler

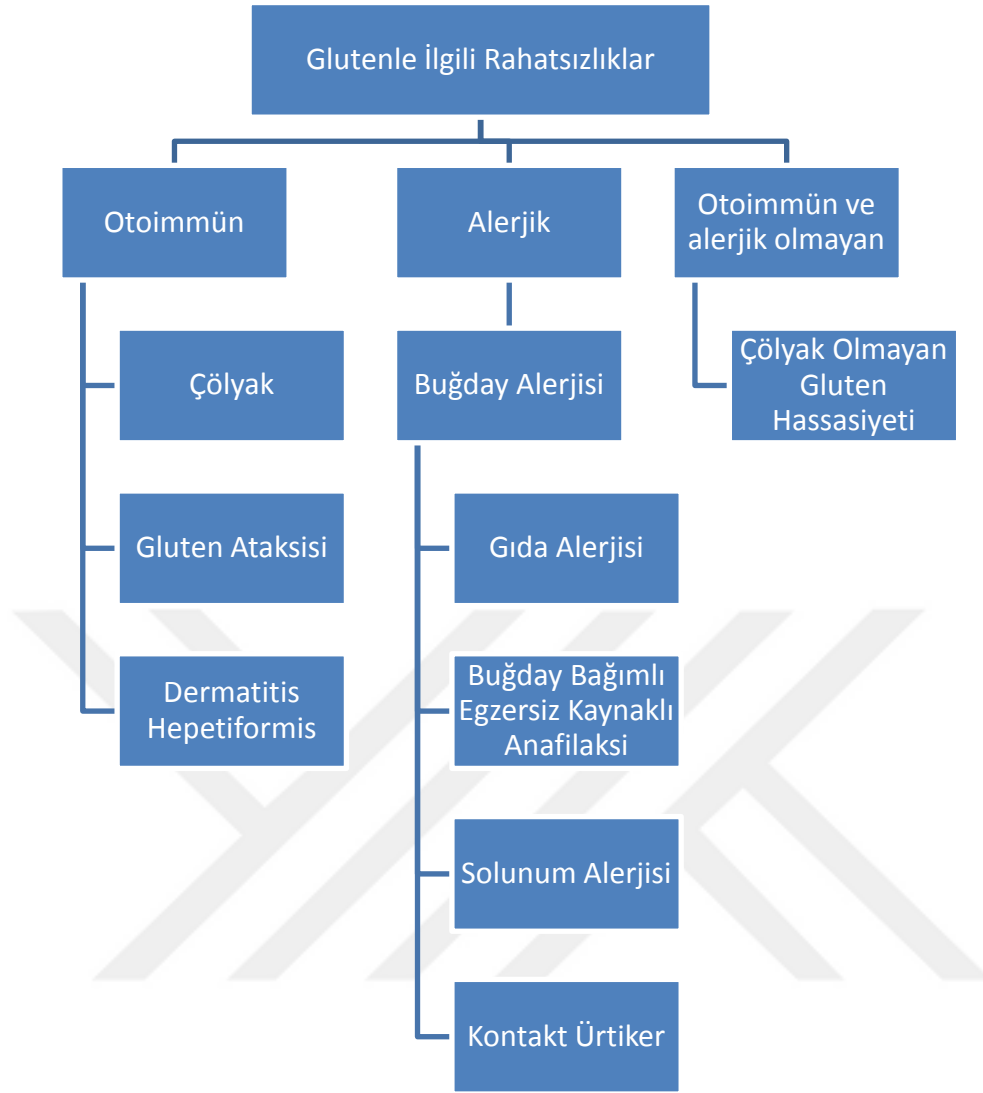
Çok zincirli ve yüksek polimerik protein olan gluteninler zincirler arası disülfid bağları ile birbirine bağlanmış glutenin alt birimlerinden oluşur [22]. Gluteninin molekül ağırlığı 80000 ile birkaç milyon arasında değişmektedir [27]. Düşük molekül ağırlıklı ve yüksek molekül ağırlıklı olmak üzere iki gruba ayrılır [17, 28, 29]. Gliadinler etil alkolde çözünürken gluteninler seyreltik asitte veya alkalide çözünürler [28]. Gliadinler daha çok viskozite ve uzayabilirliğe katkıda bulunurken gluteninler hamur elastikiyetinden ve dayanıklılığından sorumludurlar [23].

İlk çalışmalarda buğdaydaki gluten fraksiyonlarından alkolde çözünen gliadin fraksiyonunun en toksik faktör olduğu sonucuna varılmışken, çözünmeyen glutenin fraksiyonu tartışmalı olarak “toksik olmayan”, “zayıf toksik” ve “en az gliadinler kadar toksik” olarak tanımlanmıştır [15]. Daha güncel çalışmalar glutenin fraksiyonunun da çölyaklı bireyler için zararlı olduğunu göstermiştir [4].

2.2. Glutenle İlgili Rahatsızlıklar

Beslenmede önemli bir yere sahip olan ve gluten içeren tahıl ve tahıl ürünleri bazı bireylerde rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Glutenin toksik etkisi alt fraksiyonu olan prolamınlerden kaynaklanmaktadır. Prolaminler buğdayda gliadin, çavdarda sekalin, arpada hordein ve yulafta avenin olarak bulunurlar [30]. Prolaminler alkol çözeltisinde çözünen fraksiyon olarak adlandırılır. Osborne, tahıl proteinlerini alkol çözeltisinde çözünen “prolaminler” ve alkol çözeltisinde çözünmeyen “glutelinler” olarak sınıflandırmıştır [3]. Alternatif bir sınıflandırma sisteminden ise glutelinler dahil olmak üzere tüm gluten proteinleri için “prolamin” terimi kullanılmış ve bunlar S-zengin, S-fakir ve yüksek moleküler ağırlıklı prolamınler olarak ayrılmıştır [31, 32]. Fakat buğday hassasiyeti ve gluten analizi alanlarında Osborne'a göre prolamın (gliadin) ve glutelin (glutenin) terimlerinin kullanımı daha yaygındır [4].

Gluten alımına bağlı rahatsızlanan bir hastanın (çölyak) ilk tanımlamasını milattan sonra 2. yüzyılda yapan Kapadokyalı Areteus kronik ishal ve malabsorpsiyon vakası olarak bildirmiştir [33]. Gluteni ve diğer buğday bileşenlerini tanıyan hastalık ve sendromların dünya çapında sürekli yayılımı, araştırmacıları hasarın temelini oluşturan mekanizmaları incelemeye ve glutenle ilgili hastalıkları gruplandırmaya teşvik etmiştir [33]. Sapone ve arkadaşları (2012) glutenle ilgili rahatsızlıkları Şekil 2.1'deki gibi sınıflandırmıştır [34].



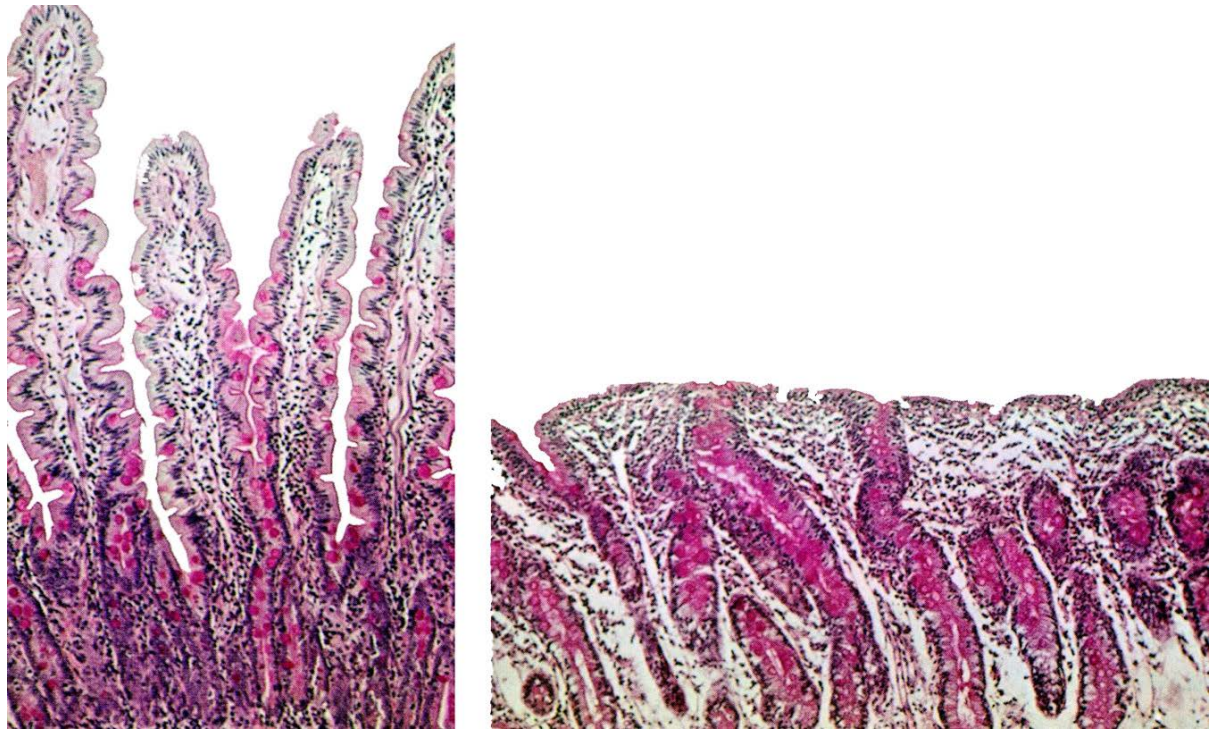
Şekil 2.1. Glutenle ilişkili rahatsızlıkların sınıflandırılması [34]

En bilinen gluten hassasiyeti olan çölyak, iltihaplı bir ince bağırsak hastalığıdır. Hastalığın gerçek sıklığı tam olarak bilinmemekte ve toplumdan topluma değişmekte olup Avrupa ve ABD gibi buğday tüketimi yaygın olan ülkelerde nüfusun % 1'ini etkilemektedir [35, 36]. Çölyaklılığın yanı sıra; dermatitis hepetiformis, gluten ataksisi, çölyak olmayan gluten hassasiyeti ve buğday alerjisini kapsayan buğday ve glutenle ilgili diğer rahatsızlıklar dünya nüfusunun % 1-6'sını etkilemektedir [8]. Gluten hassasiyeti olan bireylerin çok büyük bir kısmına tanı konulmadığı için bu oranın Türkiye'de daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Gluten hassasiyeti olan bireyler glutensiz diyet uygulamak zorundadırlar.

2.2.1. Çölyak

Çölyak, genetik olarak duyarlı bireylerde glutenin alınması ile tetiklenen immün aracılı bir enteropatidir [37]. Çölyak hastalarının en az % 95'inde HLA-DQ2 ve DQ8 genleri bulunmaktadır [38].

Çölyak hastalarında gliadin fraksiyonuna karşı immün yanıtlar öncelikle üst ince bağırsakta gerçekleşmektedir. Gliadin peptitleri, doğal immün sistem yoluyla epitelde ve adaptif bağışıklık sistemi aracılığıyla lamina propriada değişikliklere neden olmaktadır. Gliadin, intraepitelyal lenfositleri aktive eden interlökin-15 ekspresyonunun arttırması sonucu epitel hücrelerine zarar verir. Bu lenfositler sitotoksik hale gelir ve enterositleri öldürür. Enfeksiyonlar sırasında veya geçirgenlik değişikliklerinin bir sonucu olarak, gliadin lamina propriaya girer. Lamina propriada gliadin antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde HLA-DQ2 veya HLA-DQ8 ile etkileşime izin vererek doku transglutaminaz tarafından deamide olur. Gliadin, bir T hücresi reseptörü aracılığıyla gliadin-reaktif CD4+T hücrelerine sunulur ve doku hasarına neden olan sitokinler üretilir. Bu da villöz atrofisi, kript hücrelerinin kalınlaşması ve epitelde lenfosit infiltrasyonunun artması gibi bağırsak mukozası hasarına neden olur. Ayrıca B hücrelerinin aktivasyonuna ve genişlemesine yol açar. Şekil 2.2'de görüldüğü üzere mukozada, hafif kısmi villöz antrofiden villilerin tamamen kaybolmasına kadar değişebilen genel bir düzleşme vardır [39].



Şekil 2.2. Normal (sol) ve çölyak hastalığı-hasarlı antrofik (sağ) bağırsak mukozasının enine kesiti [15]

Çölyak ile ilişkili sayısız semptom vardır. Bu semptomlar bağırsak bozuklukları ve temel besin maddelerinin emilim bozuklarından kaynaklanan ekstraintestinal özellikler olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Bebeklerde klasik semptomlar diyare, abdominal şişkinlik, kusma, gelişememe, bodur büyüme ve apatidir. Daha büyük çocuklarda ve ergenlerde, çölyak hastalığında genellikle ishal, iştah kaybı, sürekli yorgunluk, anemi ve kısa boy şikayetleri görülmektedir. Yavaş büyüme hızının en sık nedeni çölyak hastalığıdır ve büyüme hormonu eksikliğinden çok daha yaygındır. Demir eksikliği anemisi, çölyagin en sık görülen ekstraintestinal bulgularından biridir. Yetişkinler; anemi, azalmış kemik mineral yoğunluğu, kemik ağrısı ve kırıkları, osteoporoz, diş minesindeki kusurlar, cilt lezyonları ve gece körlüğü gibi mineral ve vitamin eksikliklerinin artan etkilerini göstermektedir [15].

Çölyagin tek tedavisi ömür boyu glutensiz diyet uygulamaktır. Çok az miktarda bile alınan gluten bağırsak mukozasında zarara neden olmaktadır. Glutensiz diyetin uygulanmasıyla tahribata uğrayan bağırsak yüzeyi tekrar normal şeklini alır ve şikayetler tamamen kaybolur. Diyetin bozulması bağırsak tahribatının tekrarlanmasına neden olur [40].

2.3. Glutensiz Beslenme

Glutensiz beslenmede; buğday, arpa, çavdar, yulaf gibi gluten içeren tahıl ve tahıl ürünleri diyetinde yer almamaktadır. Et, balık, yumurta, süt, meyve, sebze, baklagil doğal olarak gluten içermeyen gıda gruplarıdır. Gluten içermeyen gıdalar için geliştirilen tanıma göre; buğday, arpa, çavdar, yulaf ve bunların melezlerini içermeyen bir veya daha fazla bileşenden oluşan glutensiz gıdalarda ve/veya buğday, arpa, çavdar, yulaf ve bunların melezlerini içeren ve özellikle işlenerek gluteni uzaklaştırılmış glutensiz gıdalarda gluten miktarı 20 ppm'in altındadır [5,6]. Glutene duyarlı olan bireyler için özel gıda kategorisi altında glutensiz gıdalar üretilmekte ve bu gıdalar için ham madde olarak gluten ile kontamine olmamış mısır, pirinç ve sorgum gibi tahılların; karabuğday, amarant ve kinoa gibi tahıl benzerlerinin; soya, nohut ve mercimek gibi baklagillerin ve nişastaların (mısır, patates vb) kullanımı mevcuttur [8, 18, 25, 30, 41]. Glutensiz tahıllar ve bunların yerine kullanılan ikame ürünler, gluten içeren denklemleri kadar demir, folat, lif, tiamin, riboflavin, niasin içermemesi glutensiz diyetin besin yeterliliğini etkilemektedir [42, 43]. Glutensiz ürünlerin ana bileşini olarak çoğunlukla kullanılan nişasta ve düşük proteinli unlar (örneğin mısır unu, pirinç unu), zayıf folat kaynağı olarak 100 g taze ağırlık başına 6 µg'dan daha fazla folat içermezken buğday unu 100 g başına 8.5 g protein ve 21 µg folat içermektedir [44]. Pazarda bulunan glutensiz unlar çoğunlukla nişasta ağırlıklı olduğundan kalorisi yüksek, protein, vitamin ve mineral bakımından zayıf olduğu için bu ürünlerin besleyici değeri düşük gıdalar (junk food-abur cubur) sınıfında olduğu söylenebilir. Bu unlardan yapılan glutensiz gıdalar da ham maddenin bu zayıf yönlerini taşırlar ve bu sınıfa dahildirler. Glutensiz bir diyetle beslenmeyle

ilgili eksiklikler olduğu gibi yağ, karbonhidrat, şeker ve kalori fazlalığı söz konusudur (Şekil 2.3) [45]. Glutensiz beslenenler buğdayın besleyici değerinden ve lezzetinden mahrum kalmakta ve buğday ürünlerinin aroma, tat ve tekstürüne özlem duymaktadırlar [7]. Glutensiz beslenenler tüketimlerini beğenilerine göre değil de arzın yetersizliğinden kaynaklanan mecburiyete göre gerçekleştirmektedir.



Şekil 2.3. Glutensiz diyetteki besinsel eksiklikler ve fazlalıklar [45]

Glutenle ilgili rahatsızlığı olan bireyler özellikle çölyaklı bireyler ömür boyu glutensiz diyet uygulamak zorundadırlar. Bu bireyler zorunlu glutensiz beslenenler (ZGB) olarak adlandırılabilir. Son zamanlarda dünya genelinde rahatsızlık dışında herhangi bir nedenden dolayı glutensiz beslenmeyi benimseyenlerin sayısı ciddi şekilde artmış ve artmaktadır. Türkiye’de de glutensiz beslenmeyi öneren ve özendiren yayınların dikkat çekici miktarda arttığı ve tüketiciler tarafından da karşılık bulduğu gözlemlenmektedir. Glutenle ilgili herhangi bir rahatsızlığı olmadığı halde, isteğe bağlı olarak glutensiz gıda tüketen bireyler tercihi glutensiz beslenenler (TGB) olarak adlandırılabilir. ABD nüfusunun % 25’inin, Avrupa nüfusunun % 8’inin TGB olduğu bildirilmektedir [46] ve bu oranların zamanla artması beklenmektedir [47]. Amerika’da glutensiz gıdaların satışı 2013-2015 döneminde % 136 oranında artmıştır [46]. Mintel grubun araştırmasına göre Amerikalı tüketicilerin % 47’si glutensiz diyetin geçici moda olduğu konusunda hemfikir olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu raporda tüketicilerin % 19’unun glutensiz gıdaları kilo kaybı için tükettiğini bildirilmiştir [46]. 2015 yılında Amerika’da yapılan bir araştırmada glutensiz gıda satın alan bireylerin % 35’i “hiçbir sebep olmaması”, % 26’sı “daha sağlıklı seçenek”, % 19’u “sindirim sağlığı”, % 13’ü “tadından hoşlanmak”, % 8’i “trend olması” sebebiyle glutensiz ürün tercih ettikleri rapor edilmiştir [48].

Glutenle ilgili herhangi bir rahatsızlığı olmayan tüketiciler yanlış bilgiye dayanarak glutensiz gıdaların daha sağlıklı olduğunu ya da kilo verme programlarında faydalı olduğunu düşünmektedirler [49]. Fakat glutenle ilgili rahatsızlıklar dışında glutensiz diyetin sağlık için

yararlı olduğunu destekleyen hiçbir veri bulunmamaktadır. Hatta ambalajlanmış glutensiz gıdaların glutenli deneklerine göre daha fazla yağ ve şeker içerdiği ve glutensiz diyet uygulayan bireylerde yağ ve kalori alımının arttığı belirtilmiştir [50]. Glutensiz diyet başlatılmasından sonra obezite, yeni başlangıçlı insülin direnci ve metabolik sendrom bulguları ortaya çıkmıştır [50]. Glutensiz ürünlere besin takviyesi olmadığında glutensiz bir diyet B vitaminleri, folat ve demir eksikliklerine yol açabilmektedir [50].

Ayrıca glutensiz beslenmedeki önemli sorunlardan biri de glutensiz gıda fiyatlarının glutenli deneklerine göre çok daha yüksek olmasıdır. Amerika, Kanada, İngiltere, Avustralya, Yunanistan, Şili’de yapılan araştırmalarda glutensiz gıda fiyatlarının glutenlilere göre çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir [51-57]. Türkiye’de satışa sunulan yerli glutensiz gıdaların çeşit ve kalite açısından yetersiz olması sebebiyle tüketici daha pahalı olmasına rağmen ithal ürünleri alma eğilimindedir. 2017 yılında yapılan bir araştırmaya göre Türkiye pazarındaki glutensiz ürünlerin çoğunluğu ithal olup fiyatları glutenli olanlardan % 304 oranında daha yüksektir [58]. Yabancı paranın değer artışından dolayı 2017 yılından bu yana bu oranın günümüzde daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Yani tüketici zorunlu olarak, bilerek ama istemeyerek çaresizliğinden dolayı kalite açısından zayıf, besin değeri düşük ve çok yüksek fiyatlı glutensiz gıda tüketmektedir. Bu nedenle yerli üretimin artması, ürün çeşidinin ve kalitesinin geliştirilmesi ithal ham madde ve mamül ürünler yerine yerli olanlara talebi arttıracaktır.

2.3. Glutensiz Gıda Pazarı

Buğday tüketimi yaygın olan ülkelerde çölyaklı oranı nüfusun % 1’i kadardır [8]. Çölyaklılığın yanı sıra buğday ve glutenle ilgili diğer rahatsızlıklar dünya nüfusunun % 1-6’sını etkilemektedir [8]. Glutenle ilgili rahatsızlıkların farkındalığının artması ve sağlıklı beslenme/sağlıklı yaşam kaygısıyla tüketicilerin diyetlerinden gluteni çıkarmaya veya diyetlerinde gluteni azaltmaya olan ilgilerinin artması sebebiyle günümüzde glutensiz ürünlere talep artmaktadır. Buna bağlı olarak glutensiz gıdaların küresel pazar payının 2020 yılına kadar 4.5 milyar dolardan 7.59 milyar dolara ulaşması beklenmektedir [59]. Bu, yakın gelecekte glutensiz gıda pazarının gıda ve içecek alanında en kazançlı pazarlardan biri olacağı anlamına gelmektedir. Pazardaki bu artışın tüketiciler arasında çölyak ve gluten hassasiyeti konusundaki farkındalığın artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Dünyaya paralel olarak Türkiye’de de glutensiz gıda pazarı gelişmekte fakat miktar ve çeşit açısından yetersiz kalmaktadır. Yani Türkiye’de talebi karşılayacak yeterli arz sağlanamamaktadır [60]. Glutensiz gıda pazarı önemli derecede ekonomik ve sosyal değere sahip olmasına karşın çeşit ve beğeni açısından tüm dünyada oldukça yetersizdir. Nedeni unlu gıda üretiminde ham madde olarak çoğunlukla buğday kullanılması ve bu ürünlerin glutensiz deneklerinin aynı kalitede üretilmemesidir. Hangi ham

maddeden yapılırsa yapılsın glutensiz gıdalar, buğday-temelli olan asıllarının özelliklerini taşımamaktadır.

Kuzey Amerika, 2012 yılındaki yaklaşık % 59 pazar payı ile glutensiz ürünler için en büyük pazardır [61]. Pazardaki büyük talebin İngiltere, İtalya, ABD, İspanya, Almanya, Avustralya, Brezilya, Kanada, Hindistan vb ülkelerden gelmesi beklenmektedir [61].

Glutensiz ürünler pazarı türe göre unlu mamüller, atıştırmalıklar ve tüketime hazır (ready to eat-RTE) ürünler, pizza ve makarna, çeşniler ve soslar ve diğerleri olarak ayrılmıştır. 2018 yılında fırıncılık ürünleri pazarının baskın olduğu tahmin edilirken atıştırmalıkların ve RTE ürünlerin öngörülen dönemde en hızlı artış olacağı tahmin edilmiştir. Gluten hassasiyeti olan tüketicilerin yoğun yaşam tarzları ve artan atıştırma gereksinimleri nedeniyle kaliteli atıştırmalıklara ve RTE ürünlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da üreticileri glutensiz atıştırmalık ve RTE ürünler kategorisine girmeye teşvik etmiştir [62].

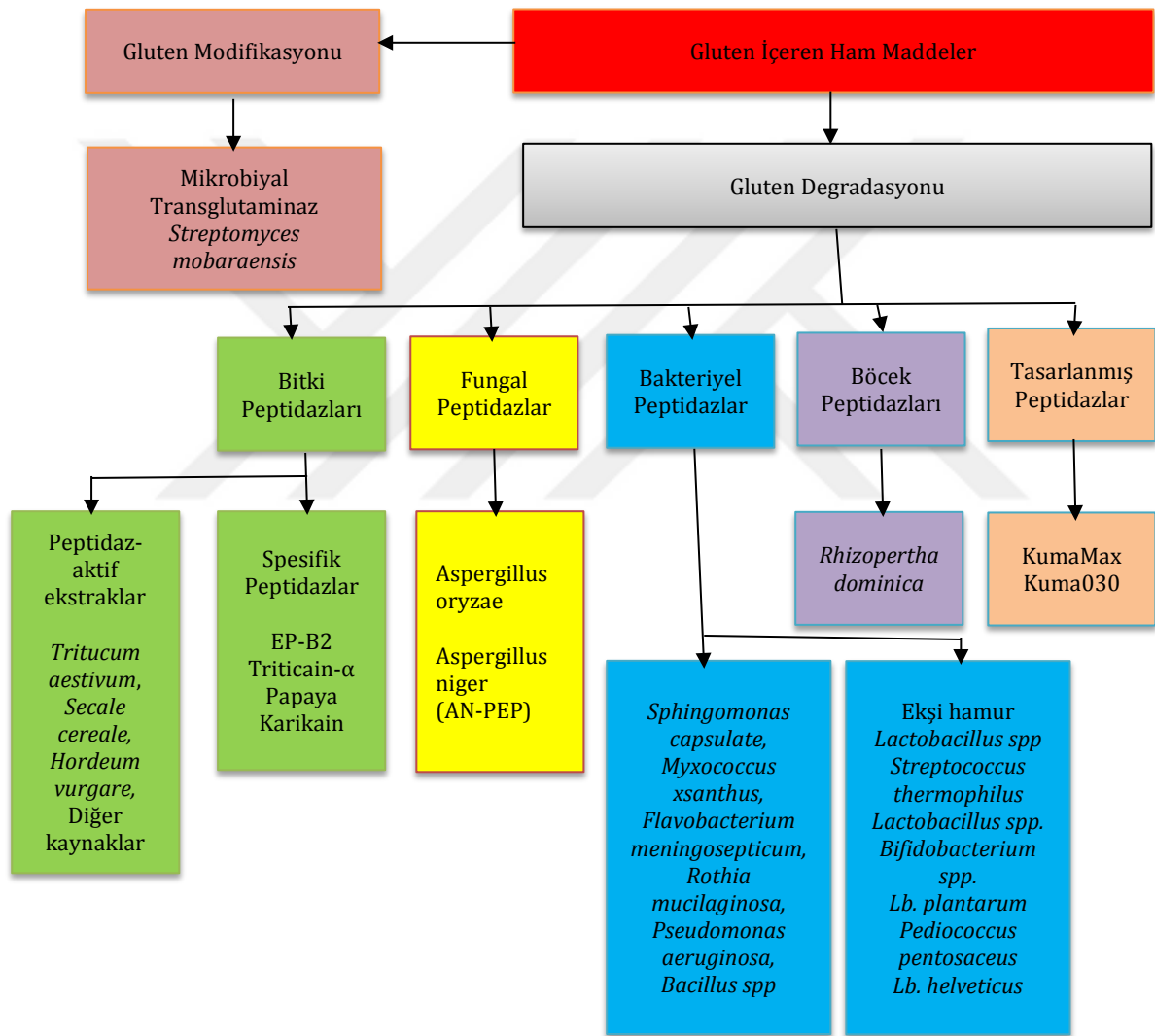
2.5. Gluten Degradasyonu

Buğday, içerdiği glutenle ilişkili enzimlerden kaynaklanan proteolitik aktiviteye sahiptir. Bu enzimler aspartik proteinaz ve serin karboksipeptidazdır [63]. Glutenle ilişkili bu iki enzim depo proteinin proteolizinde aktif olarak görev almasının yanı sıra birliktelikleri gliadin hidrolizini arttırmaktadır [64]. Bu proteazların aktivasyonu glutenin parçalanmasını başlatabildiği için buğdayın işlenmesinde aktivasyon koşulları dikkate alınmalıdır. Buğdayın endospermünde bulunan aspartik proteinaz ve serin karboksipeptidaz asidik koşullarda aktif olup optimum çalışma pH'ları sırasıyla 3.3 ve 4.0'dır [63, 64]. Glutenle ilişkili bir diğer enzim olan sistein proteinaz olgun buğdayda bulunmazken çimlenmiş buğdayda mevcuttur [63]. Optimum pH'sı 4.3 olan sistein proteinaz etkin bir şekilde gliadini hidroliz edebilmektedir [63, 64]. Buğdayın işlenmesinde uygun koşullar sağlandığı takdirde glutenin parçalanmasında buğdayın kendi bünyesinde var olan bu enzimlerin aktivitelerinden faydalanılabilir.

2.5.1. Enzim Uygulamaları

Gluten proteinleri % 26-36 glutamin, % 16-20 glisin ve % 10-15 prolin kompozisyonuna sahiptir [4]. Yüksek glutamin ve prolin içeriği gluten proteinlerini pepsin, tripsin, kimotripsin gibi insan gastrointestinal enzimlerine karşı dirençli hale getirir [8]. Çölyak hastalığının aktif olması için gluten peptitlerinin insan gastrointestinal sindirime dayanması ve ≥ 9 amino asit kalıntısı uzunluğunda HLA-DQ2/8'in bağlama cebine sığacak şekilde lamina propriyaya ulaşması gerekir. Gluten proteinlerinin ≥ 9 amino asit kalıntılarını daha küçük peptitlere degrade eden herhangi bir enzim çölyak immünoreaktivitesini etkin bir şekilde ortadan kaldıracılabilmektedir [8].

Son yıllarda çölyak immünoreaktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla gluteni modifiye etmeye ya da azaltmaya yönelik stratejiler geliştirilmiştir. Şekil 2.4'te görüldüğü üzere enzim uygulamaları ve ekşi hamur fermentasyonundan oluşan ve gluten degradasyonu amaçlanan bu stratejiler; bitki peptidazları (özellikler gluten içeren bitkiler; *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare* ve papaya), fungal peptidazlar (*A. niger* ve *A. oryzae*), bakteriyel peptidazlar (*Sphingomonas capsulate*, *Myxococcus xanthus*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Rothia mucilaginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*), böcek peptidazları ve tasarlanmış peptidaz kullanımlarını içermektedir [8].



Şekil 2.4. Gluten modifikasyonu veya gluten degradasyonu için enzim kaynakları [8].

Glutenin degradasyonu ile ilgili iki farklı yaklaşım mevcuttur: glutenin tüketilmesinden sonra hidrolizini kapsayan medikal yaklaşım ve glutenin tüketiminden önce gıdanın işlenmesiyle gerçekleştirilen gluten hidrolizini kapsayan gıda teknolojisi yaklaşımı [63]. Hem medikal alanda hem de gıda teknolojisi alanında çalışmaları yapılan prolil endopeptidazın (PEP) özellikle

Aspergillus niger prolil endopeptidazının (AN-PEP) optimum çalışma pH'sı 4.5 olup mide koşullarına dayanabildiği gibi pH 8.0 değerinde de aktivitesinin % 20'sini koruyabilmektedir [63]. Medikal yaklaşım ile yapılan bir çalışmada oral AN-PEP enzimi takviyesinin glutensiz diyetin yerini tutamayacağı fakat ara sıra ve/veya yanlışlıkla gluten tüketimi olduğunda sindirimini destekleyeceği belirtilmiştir [65]. Medikal yaklaşımla yapılan çalışmalarda arpadan elde edilen EP-B2, *Sphingomonas capsulate*'dan ve *Flavobacterium meningosepticum*'den elde edilen PEP ile glutenin degradasyonuna yönelik olumlu sonuçlar elde edilmiştir [66, 67]. Fakat bu çalışmalar düşük mide pH'sında sınırlı PEP stabilitesini ve eksik mide içeriği karışımını içermekte ve glutenin onikiparmak bağırsağına ulaşmadan önce tamamen degradasyonunu sağlamak için yüksek enzim konsantrasyonlarını gerektirmektedir [68].

Teknolojik açıdan yapılan çalışmalarda ise AN-PEP kullanımı ile çavdar, arpa, buğdaydan elde edilen ürünlerde gluten miktarı 20 ppm'in altına düşürülmüştür [13, 35, 69, 70].

Walter ve arkadaşları (2014) çimlenmiş ve çimlenmemiş buğday kepeğini ve ekmek içeceğini (bread drink) AN-PEP çözeltisi ile muamele etmişlerdir [35]. 5 g buğday kepeğine 20 ml saf su ve 400 mg/ml derişimde hazırlanan AN-PEP çözeltisinden 50 µl ilave ederek 24 ve 48 saat inkübe etmişlerdir. Çimlenmemiş buğday kepeğindeki gluten derişimi 107285 ppm'den 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda sırasıyla 127 ppm ve 5 ppm'e düşmüştür. Başlangıç gluten derişimi 5335 ppm olan çimlenmiş buğday kepeğinde inkübasyon süreleri sonunda gluten derişimini sırasıyla 16 ppm ve ölçüm limitinin altında tespit etmişlerdir. 5 ml ekmek içeceğine 0.1-10 mg/ml derişimlerde hazırlanan AN-PEP çözeltisinden 50 µl ilave ederek 0-30 dakika inkübe etmişlerdir. Başlangıç gluten içeriği 82.5 ppm olan ekmek içeceğinin gluten derişimini 10 dakika inkübasyon sonunda 20 ppm'in altında bulmuşlardır.

Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada çavdar ununu 500 mg/ml derişimde hazırlanan AN-PEP çözeltisiyle muamele etmişlerdir [13]. Başlangıçta 56173 ppm olan gluten derişimi 48 saat inkübasyon sonunda 20 ppm'in altına düşmüştür.

Walter ve arkadaşları (2014) başka bir çalışmasında AN-PEP ile peptidaz içeren çimlenmiş tahıl (buğday, arpa) kepeği ekstraktlarını kıyaslamışlardır [71]. Başlangıç gluten derişimi 110, 1679 ve 2070 ppm olan üç buğday nişastası örneğini gluten seviyesini 20 ppm'in altına düşürmek için AN-PEP ve çimlenmiş tahıl kepeği ekstraktları ile 4-24 saat muamele etmişlerdir. Tahıl kepeği ekstratlarının aksine AN-PEP buğday nişastasının gluten derişimini 20 ppm'in altına düşürmüştür.

Heredia-Sandoval ve arkadaşları (2016) çalışmalarında buğday ununu AN-PEP çözeltisi ile 35 °C ve 40 °C'de 150 rpm'de karıştırarak 8 saat inkübe etmişlerdir [7]. İnkübasyon sonunda AN-PEP eklenmeyen kontrol örneğinde gluten derişimi 210400 ppm bulunurken AN-PEP ile muamale edilen örnekte gluten tespit edilmemiştir.

Knorr ve arkadaşları (2016) AN-PEP kullanımı ile arpadan glutensiz bira elde etmişlerdir [70]. AN-PEP, bira üretim aşamasında malt şirasının birincil fermentasyonundan önce ve sonra ilave edilmiştir. Malt şirasını % 1 AN-PEP çözeltisi (8 mg/ml) ile 50 °C'de 90 dakika inkübe etmişlerdir. 50 °C'de 90 dakika inkübasyon sonunda şırada gluten seviyesi 19 ppm olarak tespit etmişlerdir. 25 °C'de inkübe edildiğinde inkübasyon süresi uzamış ve 48 saat sonunda ELISA ölçüm limitinin altında gluten derişimi bulmuşlardır.

Buddrick ve arkadaşları (2015) papaya lateksinden elde edilen karikain enzimi ile buğday ekmeğinde gliadin içeriğini azaltmaya çalışmışlardır [72]. Ekmek hamuruna % 0.01-0.03 oranında karikain eklemişler ve 30-37 °C'de 5-7 saat fermente etmişlerdir. 7 saat fermentasyon sonunda kontrol ekmeğinde gliadin derişimi 83851 ppm iken % 0.03 karikain ile işlenmiş ekmekte gluten derişimini 1770 ppm olarak tespit etmişlerdir.

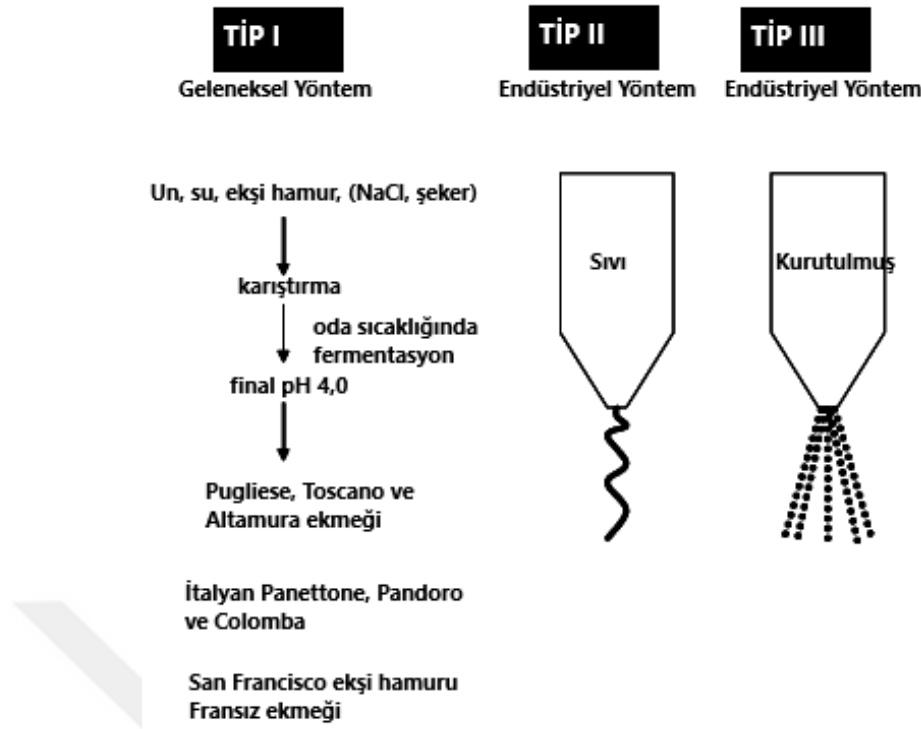
2.6. Ekşi Hamur Fermentasyonu

2.6.1 Ekşi Hamur Tarihçesi ve Üretim Yöntemleri

Ekşi hamur fermentasyonu bilinen en eski biyoteknolojik yöntemlerden biridir. Avrupa'da ekşi hamura ait en eski bulgular İsviçre'de bir kazıda bulunmuş olup 5000 yıl öncesine dayanmasına rağmen mayalanmış hamura ilişkin ilk kanıtlar milattan önce 1500'li yıllara ait Mısır duvar resimlerinde keşfedilmiştir [73, 74]. Ekşi hamur 19. yüzyılda ekmek mayası ile yer değiştirinceye kadar kabartıcı olarak kullanılmıştır [73]. Günümüzde ekmek, kraker, kek gibi çeşitli ürünlerin üretiminde ekşi hamur kullanılmakta ve dünya genelinde çok çeşitli tahıl unlarında uygulaması artmaktadır [73].

Ekşi hamur, un su karışımının ortamdan ve ham maddeden gelen mikroorganizmalarla (LAB-laktik asit bakterileri ve mayalar) veya un su karışımına starter kültür (LAB ve mayalar) ilave edilerek fermente edilmesiyle elde edilmektedir. Üretim yöntemine göre 3 tip ekşi hamur vardır (Şekil 2.5) [73]:

- Tip I ekşi hamur veya geleneksel ekşi hamur
- Tip II ekşi hamur veya hızlandırılmış ekşi hamur
- Tip III ekşi hamur veya kurutulmuş ekşi hamur



Şekil 2.5. Ekşi hamur üretim yöntemleri [73]

Tip I geleneksel yöntemle üretilen ekşi hamurdur. Bu yöntemde mikroorganizmaların aktif durumda olması için un ve su ilavesiyle devamlı ve günlük olarak canlandırma işlemi yapılır. Fermentasyon çok aşamalı olarak oda sıcaklığında (20-30 °C) gerçekleştirilir [75]. Geleneksel yöntemde fermentasyon sonunda pH değeri 4.0 civarındadır [76].

Tip II ekşi hamuru yarı akışkan olup endüstriyel talep doğrultusunda ortaya çıkmıştır [77]. Yüksek hamur verimine sahip olması Tip II ekşi hamurunun pompalanabilmesine olanak sağlamaktadır. Endüstride çoğunlukla hamur asitlendirici olarak kullanılmaktadır [78]. Tip II üretimi >30 °C sıcaklıklarda tek aşamalı ve uzun süreli fermentasyon (2-5 gün) ile gerçekleştirilmektedir [73]. Fermentasyonun ilk 24 saatinde hamurun pH değeri 3.5'in altına düşer. Bu durumda mikroorganizma gelişimi durgun fazdadır ve mikroorganizmalar sınırlı metabolik aktivite gösterirler [79].

Tip III, starter kültür kullanarak üretilen ekşi hamurların kurutulup toz haline getirilmesi ile elde edilmektedir. Endüstride asitlendirici ve aroma arttırıcı olarak kullanılmaktadır [78]. Tip III ekşi hamuru üretiminde kurutma prosesine dayanıklı LAB kullanılmalıdır [73].

Ekşi hamurlarda tanımlanan mikroflora ekşi hamur tiplerine göre Tablo 2.1'de verilmiştir. Olgun ekşi hamurlarda LAB miktarı 1×10^9 ile 3×10^9 aralığında, maya miktarı ise 1×10^6 ile 5×10^7 aralığında değişmektedir [80]. Mikrobiyolojik çalışmalar sonucunda ekşi hamur mikroflorasının, 50 türden fazla LAB'dan (özellikle *Lactobacillus* cinsi), 25 türden fazla mayadan (özellikle *Sacchorymyces* ve *Candida*) oluştuğu tespit edilmiştir [80].

Tablo 2.1. Ekşi hamurların sınıflandırılması ve tiplerine göre mikroflorası [81]

Tip I	Tip II	Tip III
Zorunlu heterofermentatif <i>L. sanfranciscensis</i> <i>L. brevis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. fructivorans</i> <i>L. pontis</i> <i>Wiesella cibaria</i>	Zorunlu heterofermentatif <i>L. sanfranciscensis</i> <i>L. brevis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. frumenti</i> <i>L. pontis</i> <i>L. panis</i> <i>L. reuteri</i> <i>W. cunfusa</i>	Zorunlu heterofermentatif <i>L. brevis</i>
Fakültatif heterofermentatif <i>L. alimentarius</i> <i>L. casei</i> <i>L. paralimentarius</i> <i>L. plantarum</i>	Zorunlu homofermentatif <i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. amylovorus (çavdar)</i> <i>L. farciminis</i> <i>L. johnsoni</i>	Fakültatif heterofermentatif <i>L. plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i>
Zorunlu homofermentatif <i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. farciminis</i> <i>L. mindensis</i> <i>L. amylovorus</i>	Mayalar Maya yok <i>S. cerevisiae</i> eklenebilir	
Mayalar <i>Candida humilis</i> (<i>Torulopsis holmii</i> , <i>C. milleri</i>) <i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Candida krusei</i>) <i>Saccharomyces exiguus</i>		

2.6.2. Ekşi Hamur Fermentasyonun Olumlu Etkileri

Ekşi hamur fermentasyonu eski çağlardan beri kullanılan geleneksel bir prosestir. Un, su, LAB ve maya ile fermente edilen ekşi hamur, aroma ve tekstürü geliştirerek ürün kalitesine katkıda bulunur, ürünün besin içeriğini ve raf ömrünü artırır. Ekşi hamur fermentasyonun sağladığı katkılar Şekil 2.6'te özetlenmiştir.

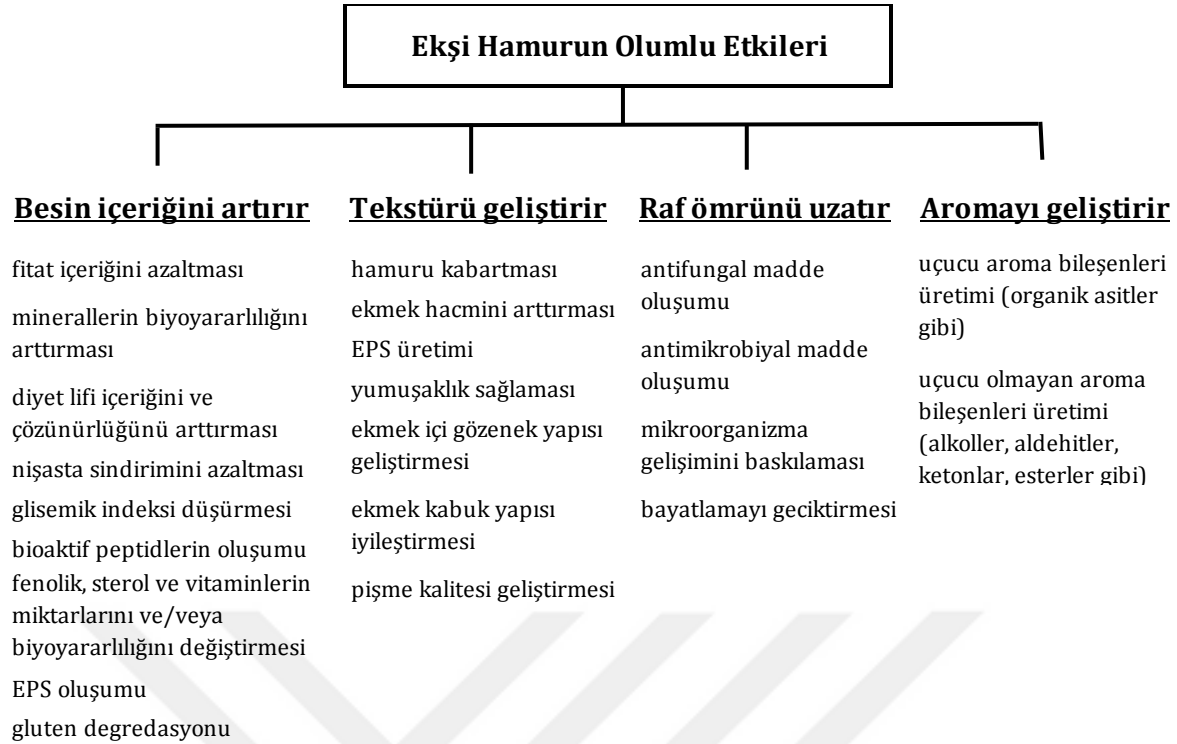
Ekşi hamur fermentasyonu, besinlerin biyoyararlılığını ve miktarlarını artırarak veya azaltarak besin kalitesini etkiler. Fitat içeriğini azaltması, minerallerin biyoyararlılığını arttırması, diyet lifi içeriğini ve çözünürlüğünü arttırması, nişasta sindirimini azaltması, glisemik indeksi düşürmesi, bioaktif peptidlerin oluşumu, gluten degradasyonu, fenolik, sterol ve vitaminlerin miktarlarını ve/veya biyoyararlılığını değiştirmesi, eksopolisakkaritlerin (EPS) oluşumuna olanak vermesi ekşi hamur fermentasyonun besinsel katkılarıdır [23, 80, 82, 83].

Ekşi hamur fermentasyonunda meydana gelen asidifikasyon sonucu ekmek tekstürü gelişmektedir. Asitlenme seviyesine bağlı olarak ekmek hacminde artış, hamurun uzamaya karşı direncinde azalma, hem uzama kabiliyetinde hem de yumuşama derecesinde artış, hamurun gaz tutma kapasitesinde artış ve hamur karıştırma süresinde azalma meydana gelmektedir [84]. Asidifikasyon; gluten, nişasta, arabinoksilatlar gibi yapı oluşturan bileşenlerin çözünürlüğünü etkiler ve tahıl endojen enzimlerinin aktivitesine pozitif yönde müdahale eder [84]. Ayrıca probiyotik özelliğe sahip olan EPS (glukan, fruktan, gluko- ve fruktooligosakkaritler) sağlık üzerine olumlu etkiye sahip olmalarının yanı sıra hamurun viskoelastik özelliklerini, ekmeğin tekstürünü ve raf ömrünü geliştirmektedir [23, 80]. Fermentasyon sırasında LAB'ın ürettiği dekstran, fırın ürünlerinde tazeliği, ağız hissini, ekmek içi yapısını, yumuşaklığı geliştirmiştir [85]. *L. plantarum* kullanılan bir çalışmada biyolojik olarak asitlendirilmiş ekşi hamurdan elde edilen glutensiz ekmeğin 5 gün sonra kimyasal olarak asitlendirilmiş ekşi hamurdan elde edilen glutensiz ekmekten daha yumuşak olduğu tespit edilmiştir [86].

Ekşi hamurla ilişkili asidik koşullar ve proteazlar ekmeğin bayatlamasını geciktirmede rol oynamaktadır. Ekşi hamurun bayatlamayı geciktirici etkisi fermentasyonu gerçekleştiren suşlara bağlı olduğu ve bu etkinin asidifikasyon derecesi ile ilişkili olanlar dışındaki dinamikleri içerdiği belirtilmiştir [80]. Nişasta molekülleri LAB tarafından üretilen enzimlerden etkilenir ve nişastanın retrogradasyon özelliklerinde bir değişikliğe neden olur. Bu da bayatlama hızını yavaşlatır [80]. Corsetti ve arkadaşları (1998) çalışmalarında spesifik LAB suşlarının ekşi hamur ekmeğinde bayatlamayı geciktirdiğini belirtmişlerdir [87]. Moore ve arkadaşları (2007) *L. plantarum* 2115KW, *L. plantarum* FST 1.11 ve *L. sanfranciscensis* TMW 1.52 suşlarını kullandıkları ekşi hamur ile glutensiz ekmekte bayatlamayı geciktirmişlerdir [88].

LAB genel olarak fermente ürünlerin mikrobiyal güvenliğinde ve korunmasında büyük öneme sahiptir. Yağ asitleri veya fenillaktik asit gibi antifungal bileşikler, reutericyclin gibi antibiyotikler, bakteriosinler, organik asitler, CO₂, hidrojen peroksit ve diasetil ekşi hamur laktobasillerinin ürettikleri inhibitör maddelerdir [73]. Pişirme koşullarına dayanıklı LAB tarafından üretilen bu antimikrobiyel maddeler fırıncılık ürünlerindeki bozulmayı ve patojenik mikroorganizmaların gelişimini kontrol etmede yardımcı olabilmektedir [89]. Moore ve arkadaşları (2008) *L. plantarum* FST 1.7 ile fermente edilen ekşi hamurun glutensiz ekmeğin küflenmesini geciktirdiğini ortaya koymuşlardır [86].

Ekşi hamur fermentasyonu sonucunda birçok lezzet bileşeni açığa çıkmaktadır. LAB tarafından gerçekleştirilen çözünür karbonhidratların fermente edilmesi, azotlu bileşiklerin metabolize edilmesi ve uçucu bileşiklerin üretilmesi fırıncılık ürünlerinin lezzetini doğrudan veya dolaylı olarak etkiler [84]. Fermentasyon sonucu oluşan alkoller, aldehitler, ketonlar, asitler, esterler, eter türevleri, furan türevleri, hidrokarbonlar, laktonlar, pirazinler, pirol türevleri ve kükürt bileşikler fırın ürünlerinde lezzet oluşumuna katkıda bulunur [84].



Şekil 2.6. Ekşi hamurun besinsel, tekstürel, raf ömrü ve aroma açısından katkıları

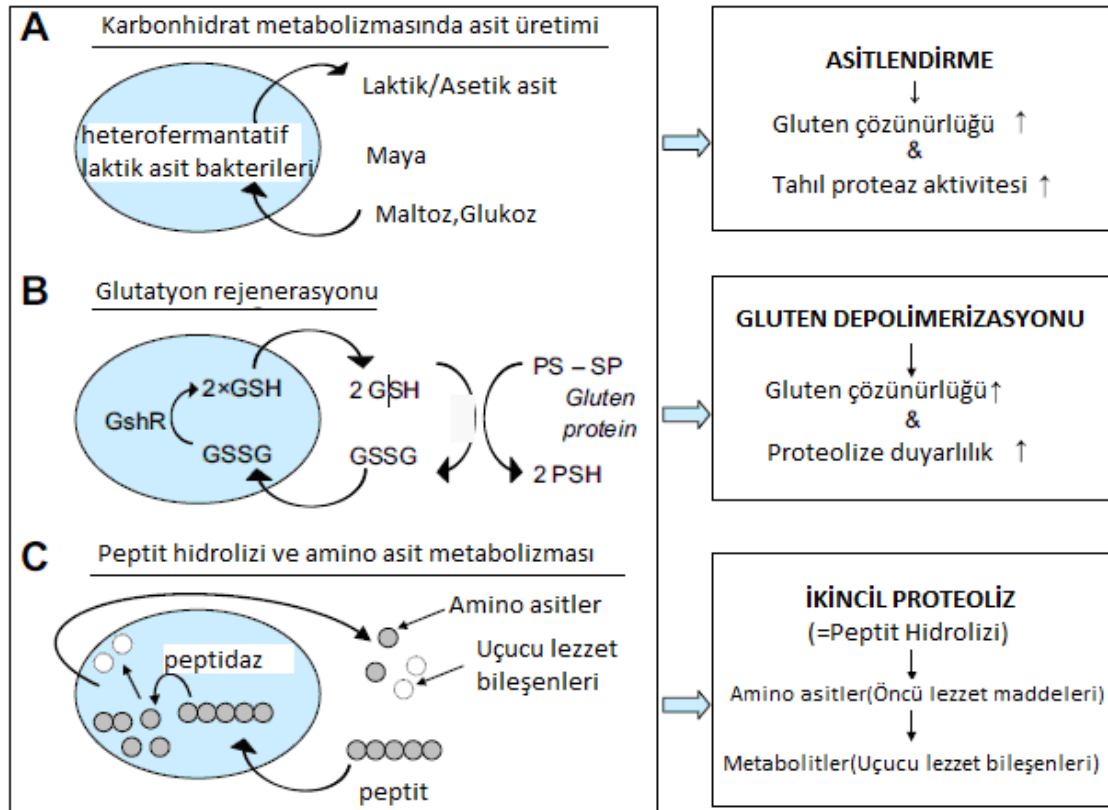
2.6.3. Ekşi Hamurda Asidifikasyon ve Proteolitik Aktiviteler

Olgun ekşi hamurların pH değeri uygulanan işlemin niteliğine ve kullanılan starter kültüre göre 3.5-4.3 arasında değişir. Unun niteliği özellikle kül içeriği asidifikasyon özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ekşi hamur asidifikasyonu gluten, nişasta ve arabinoksilatlar gibi yapı oluşturan bileşenler üzerinde etkilidir. Gluten asitte şişer ve çözünürlüğü artar [80].

Asidifikasyonun gluten proteolizinde önemli bir rolü vardır. LAB'ın nişastayı laktik aside hidrolize etmesi sonucu düşen pH ile glutenin proteolizinde etkili tahıl proteazlarının ve bakteriyel enzimlerin aktivitesinde değişimler meydana gelir [80]. Kawaruma ve Yonezawa (1982) buğday ununda bulunan proteazların optimum aktivitesini pH 4.0 civarında tanımlamıştır [90]. Buğdayın endosperminde bulunan glutenle ilişkili enzimler (aspartik proteinaz ve serin karboksipeptidaz) asidik koşullarda aktif olup optimum çalışma pH'ları sırasıyla 3.3 ve 4.0'dır [63, 64].

LAB'ın proteolitik aktiviteleri tartışmalı bir konu olmasına rağmen ekşi hamur fermentasyonunda çok yönlü rolleri vardır. LAB ortamı asitlendirerek proteoliz için uygun koşulları sağlar ve proteoliz ürünlerini teknolojik açıdan önemli bileşenlere (aroma maddeleri, antimikrobiyel ve antifungal maddeler, EPS vs) çevirirler [63]. Şekil 2.7'te ekşi hamurda gerçekleşen proteoliz özetlenmiştir. LAB'ın gelişimi sonucu oluşan asitlik ile tahıl proteazları aktifleşir ve gluten ağında değişimler meydana gelir. Artan pozitif net yük ve elektrostatik itme,

disülfid bağlarının azalmasına ve glutenin çözünürlüğünün artmasına neden olur [80]. Tahıl proteazları ile gerçekleşen birincil hidroliz ve disülfid bağlarının azalması sonucu gluten degradasyona daha uygun hale gelir ve gluten proteinin yerini peptitler yer alır [28]. Oluşan peptitler ikincil hidrolizde LAB tarafından amino asitlere ve aroma bileşenlerine dönüştürülür [28].



Şekil 2.7. Ekşi hamurda LAB'ın proteolize katkısı [28]

2.6.4. Ekşi Hamurda Gluten Degradasyonuna Yönelik Yapılan Çalışmalar

Ekşi hamur fermentasyonunun avantajlarından biri de gluten degradasyonuna olanak sağlamasıdır. Ekşi hamurun besin içeriği, tekstür, raf ömrü ve lezzet açısından olumlu etkiye sahip olması nedeniyle glutensiz ürünlerde kullanılmasına yönelik gluten degradasyonu konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Di Cagno ve arkadaşları (2002) proteaz ile işlenmiş buğday unu hidrolizatını *L. alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A, *L. hilgardii* 51B suşları ile 37 °C'de 8 saat fermente ederek ekşi hamur üretmişlerdir [83]. Fermentasyon sonucunda albümin, globülin ve gliadin fraksiyonları hidrolize olurken glutenin fraksiyonu hidrolize olmamıştır. *L. alimentarius* 15M 13'ü gliadin olan 39 polipeptit hidroliz etmiştir. Albümin ve globülinin neredeyse tamamı degrade olurken 13 gliadinin sadece 7'si degrade olmuştur. *L. brevis* 14G 15'i gliadin olan 39 polipeptit hidrolize etmiştir. *L. alimentarius* 15M ile karşılaştırıldığında *L. brevis* 14G ile hidroliz

daha belirgin gerçekleşmiştir. Çünkü albümin ve globülin peptitlerinin tamamı ve 15 gliadinin 12'si degrade olmuştur. *L.sanfranciscensis* 7A 18'i gliadin olan 41 polipeptit hidroliz etmiştir. *L.hilgardii* 51B ile daha zayıf bir proteoliz gerçekleşmiştir. Sadece 14 polipeptit hidroliz edilmiştir.

Di Cagno ve arkadaşları (2004) başka bir çalışmada aynı suşları kullanarak buğday (% 30), toksik olmayan yulaf, darı ve karabuğday karışımı ile ekşi hamur elde etmişlerdir [91]. Buğday gliadinleri ve düşük moleküler ağırlıklı, alkolde çözünen polipeptitler neredeyse tamamen hidrolize olmuştur.

Di Cagno ve arkadaşları (2005) aynı suşların kullanıldığı başka bir çalışmada ise buğday irmiğinden ekşi hamur elde etmiş ve makarna üretmişlerdir [92]. 2-DE elektroferez analizi sonucuna göre fermentasyonla 130 gliadin beneğinin 92'si tamamen hidroliz edilmiştir.

Tuukkanen ve arkadaşları (2005) çavdar unundan hazırladıkları hamuru starter olarak çavdar ekşi hamuru kullanarak 30 °C'de 24 saat fermente etmişlerdir [93]. SDS-PAGE analizi sonucu fermentasyon boyunca çavdar proteinlerinin özellikle alkolde çözünen sekinlerin degrade olduklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışma ekşi hamur fermentasyonu sırasında çavdarın endojen proteinazlarının özellikle aspartik proteinazlarının sekinleri hidrolize ettiğini doğrulamıştır.

De Angelis ve arkadaşları (2006) buğday ununun toksitesini azaltmak amacıyla ticari liyofilize VSL#3 preparatı (*Streptococcus thermophilus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delburecki* spp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *B. Longum*, *B. infantis*) kullanmışlardır [94]. 80 g buğday unu ve 10⁹ cfu/ g hamur probiyotik aparat içeren 190 ml su ile hazırladıkları hamuru 200 rpm hızda karıştırarak 37 °C'de 24 saat fermente etmişlerdir. VSL#3 probiyotik preparatı toplamda 750 ppm 62-75 ve 33-mer gliadin epitoplarını tamamen hidroliz etmiştir. Hatta ilk 4 saat içerisinde 150 ppm 33-mer epitopu hidroliz olmuştur.

L. brevis ile fermente edilen çavdar ekşi hamurunda fermentasyonun birinci saatinde gluten seviyesi 70953 ppm iken 45. saatte 26551 ppm'e düşmüştür [13]. Zamana bağlı bir azalma bulunmasına rağmen gluten içeriği uzun süreli fermentasyonda bile glutensiz gıdalar için eşik değer olan 20 ppm'in altına düşmemiştir. Bu değer altına düşebilmek için AN-PEP uygulaması yapılmıştır [13].

2.6.4.1. Ekşi Hamur ile Enzim Kombinasyonu

Ekşi hamur fermentasyonu ile glutenin degrade olduğunu doğrulayan birçok çalışma olmasına rağmen bu çalışmalarda glutensiz gıdalar için belirlenmiş olan limitin altında sonuçlar elde edilememiştir. Yani buğday, arpa, yulaf, çavdar gibi glutenli tahılların un ve irmiğinden elde edilen hamurlarda gluten seviyesini 20 ppm'in altına düşürmek için ekşi hamur fermentasyonu tek başına yeterli olmamıştır. Buğday ve çavdar ekşi hamurlarında proteoliz sınırlı

gerçekleşmekte ve tahıl proteinlerinin % 5'inden daha azı degrade olmaktadır ve bu nedenle kapsamlı bir protein degradasyonu için malt veya fungal enzimlerinin ilavesi gerekmektedir [11]. Son zamanlarda gluten degradasyonuna yönelik ekşi hamur fermentasyonu ile enzim uygulamaları birlikte kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Rizzello ve arkadaşları (2007) buğday ununun toksitesini ortadan kaldırmak amacıyla seçilmiş LAB şuşları ve fungal proteazları birlikte kullanmışlardır [9]. Çalışmada 500 verimde (80 g un ve 320 g su ile) hazırlanan hamura 400 ppm *A. niger* ve *A. oryzae* proteazı ekleyerek *Lactobacillus alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. hilgardii* 51B, *L. sanfranciscensis* 7A, LS3, LS10, LS19, LS23 LS 38 ve LS47 şuşları ile 37 °C'de 48 saat fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon boyunca hamur 200 rpm'de karıştırılmıştır. Fermentasyon sonunda ekşi hamurda R5 antikorlu sandwich ve competitive ELISA yöntemi ile 12 ppm gluten tespit edilmiştir. Albümin, globülin ve gliadinler tamamen hidrolize olurken gluteninlerin yaklaşık % 20'si varlığını korumuştur. Fermentasyon sonunda glutensiz hale gelen ekşi hamur püskürtmeli kurutucuda kurutulmuş, öğütülmüş ve ekmek yapımında kullanılmıştır. Ekşi mayalı ekmeğin somun hacminin, ekmek mayası ile üretilen normal buğday ekmeğinin hacmi ile benzer olduğu ifade edilmiştir.

Yine aynı LAB şuşlarının ve aynı proteazların kullanıldığı bir çalışmada durum buğday irmiğinden 500 verimde hamur hazırlanmış ve 200 rpm'de karıştırarak 37 °C'de 72 saat fermente edilmiştir [10]. Çalışmada eşit oranda olacak şekilde toplamda 800 ppm enzim kullanılmıştır. Fermentasyon sonunda R5 antikorlu sandwich ve competitive ELISA sonuçlarına göre buğday irmiği ekşi hamurunda yaklaşık 2 ppm gluten tespit edilmiştir. Fermente edilen glutensiz durum buğday irmiği hamuru dondurarak kurutulmuş, öğütülmüş ve makarna üretiminde kullanılmıştır. Glutensiz buğday irmiğinden üretilen makarnanın pişme ve duyu özellikleri açısından ticari glutensiz makarna ile kıyaslandığında daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Curiel ve arkadaşları (2014) buğday unundan 500 verimde hazırladıkları hamuru aynı LAB şuşları ve aynı enzimlerden 400 ppm kullanarak 30 °C'de 48 saat fermente etmiş ve glutensiz hale getirmişlerdir [12]. Fermentasyon sonunda glutensiz hamur dondurarak kurutulmuş ve öğütüldükten sonra makarna üretiminde kullanılmıştır. R5 antikorlu sandwich ve competitive ELISA ile belirlenen, başlangıç gluten derişimi 98797 ppm olan buğday ununun seçilmiş LAB ve fungal enzimleri ile fermente edilmesi sonucu gluten derişimi <10 ppm'e düşmüştür. Fermente edilmeyen buğday unu ile karşılaştırıldığında, fermente buğday ununun gliadin fraksiyonunda hiçbir organik azot tespit edilmemiştir ve glutenin fraksiyonu % 47'den % 12.5'e düşmüştür. Toplam serbest amino asitlerin derişimi bu farklılıkların doğrulamıştır. Fermente edilmemiş ve fermente buğday ununun toplam serbest amino asit derişimi sırasıyla 987 ve 15212 ppm'dir. Fermente glutensiz buğday unundan üretilen makarna (FGBM), ticari glutensiz makarna (TGM) ve ticari durum buğdayı makarnası (TDBM) ile karşılaştırılmıştır. Protein sindirebilirliği en

yüksek makarna FGBM olmuştur. Ekşi hamur fermentasyondaki proteolizden dolayı FGBM'nin kimyasal skoru, zorunlu amino asit profili, biyolojik değeri ve beslenme indeksi TDBM'den daha yüksek bulunmuştur. Duyusal değerlendirmede FGBM kabul edilebilir bulunmuştur.

Rizzello ve arkadaşları (2016) gluteni hidrolize etmek amacıyla durum buğday irmiğini aynı LAB suşları ve fungal proteazlar ile 30 °C'de 48 saat fermente etmişlerdir [14]. Fungal enzimler hamura son derişimi 400 ppm olacak şekilde ilave edilmiştir. Başlangıç gluten içeriği 100157 ppm olan irmiğin fermentasyon sonunda gluten derişimi 10 ppm'in altında bulunmuştur. Yarı sıvı glutensiz ekşi hamur kurutulmadan ekmek üretiminde kullanılmıştır. Ekşi hamura glutensiz buğday nişastası, mısır unu, zeytinyağı, ekmek mayası, bitkisel proteinler, modifiye nişasta, glikoz, E471, yumurta albümini, tuz ve alfa amilaz ilave edilmiştir. Çalışmada fermente buğday irmiğinden üretilen glutensiz ekmek 5 farklı ticari glutensiz ekmekle kıyaslamışlardır. Fermente buğday irmiği, üretilen ekmeğe ticari glutensiz ekmeklere göre yüksek serbest amino asit içeriği, yüksek protein sindirilebilirliği, düşük nişasta hidroliz indeksi ve daha iyi teknolojik özellikler sağlamıştır. Ayrıca panel testi ile belirlenen duyusal profilin, ekşi hamur ekmeği özelliklerini gösteren geleneksel unlu mamullerinkine çok benzediği düşünülebileceğini ifade etmişlerdir.

Greco ve arkadaşları (2011) yukarıdaki çalışmalarda kullanılan LAB suşları ve fungal proteazlar ile elde ettiği hidrolize buğday unundan üretilen gıdaların çölyaklı bireyler için güvenliğini test etmişlerdir [95]. 60 gün boyunca günlük 200 g hidrolize buğday unundan üretilen gıdaları tüketen 5 çölyaklıda klinik şikayetler olmamış, anti-tTG antikoru artmamış ve ince bağırsak mukozasında Marsh derecelerinde değişim olmamıştır.

Walter ve arkadaşlarının (2015) *L. brevis* ile fermente ettiği çavdar ekşi hamurunda zamana bağlı azalma olmasına rağmen uzun süreli fermentasyon sonunda bile gluten içeriği eşik değerin (20 ppm) altına düşmemiştir [13]. Gluten içeriğini eşik değerin altına düşürmek amacıyla AN-PEP kullanmışlardır. Yaklaşık 80000 ppm gluten içeren çavdar ekşi hamurunda AN-PEP uygulaması ile gluteni sıfırlamışlardır.

2.7. Gluten Analiz Yöntemleri

Glutensiz gıda olarak etiketlenmiş gıdalarda gluten derişimi <20 ppm olmak zorundadır. Glutensiz bir gıdaya çok az miktarda gluten bulaşısı olsa bile gluten hassasiyeti olan bireylerde sağlık problemlerine yol açması nedeniyle glutensiz gıdalarda glutenin nitel ve nicel tespiti bu bireyler ve gıda endüstrisi için çok önemlidir. Günümüzde gluten tespitinde; enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) gibi immünolojik yöntemler; polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi genomik teknikler, MALDI-TOF (matris destekli lazer desorpsiyonu/iyonizasyon) ve LC-MS/MS (sıvı kromatografisi –kütle spektrofotometresi) gibi proteomik tabanlı yöntemler, kütle

spektrofotometresi, kolon kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi kromatografik yöntemler ve SDS-PAGE gibi elektroforetik yöntemler kullanılmaktadır [15, 96]. Codex Alimentarius Standart 118-1979'da gluten analizi için ELISA R5 Mendez yöntemi önerilmektedir [6].

2.7.1. ELISA Yöntemi

ELISA gluten tayini için en sık kullanılan yöntemdir ve nispeten kolaydır. Diğer yöntemlere göre daha ucuzdur ve hızlı sonuç verir [97].

ELISA testleri antijenin antikora bağlanmasını tespit etmek için bir enzime (örneğin yabancu protein preoksidazı veya alkali fosfataz) kovalent olarak bağlanmış bir antikorun tespit edilmesine dayanmaktadır [98]. Enzim, antijen/antikor kompleksinin varlığını gösteren renksiz bir substratı (kromojen) renkli bir ürüne dönüştürür [99].

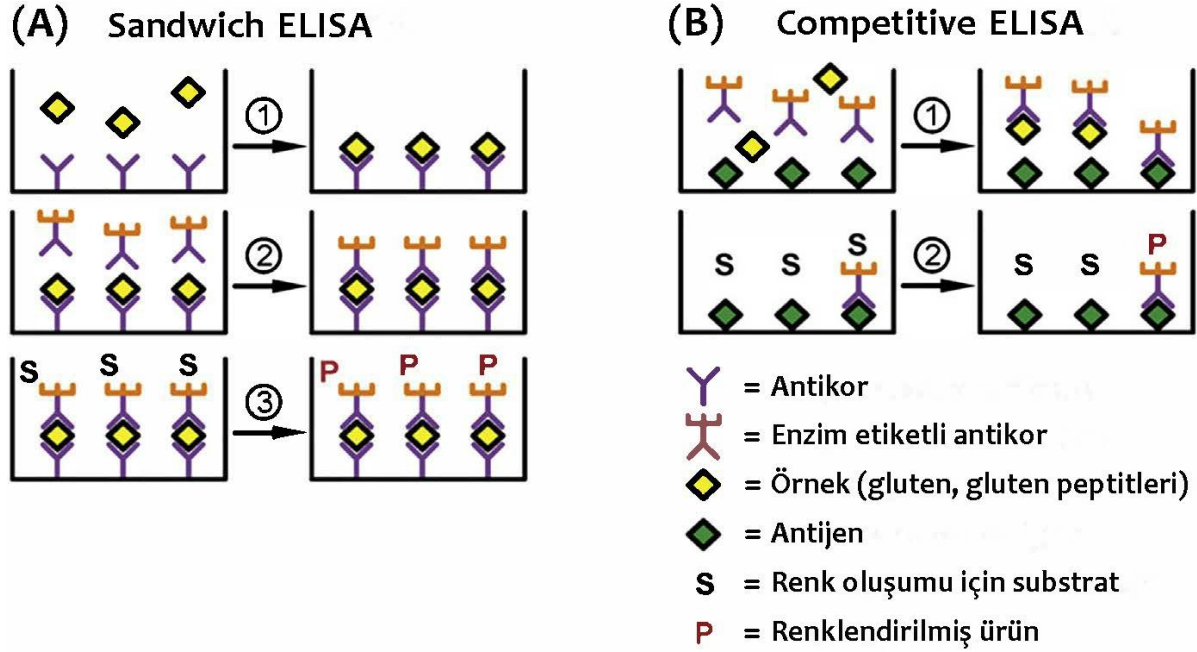
ELISA yöntemiyle gluten tayininde en çok sandwich ve competitive ELISA kullanılmaktadır.

2.7.1.1. Sandwich R5 ELISA

Gluten tespitinde en sık kullanılan ELISA yöntemi sandwich R5 ELISA'dır. Bu yöntemde antijene farklı bölgelerden bağlanan iki antikor (R5 antikor ve R5 konjugat antikor) vardır. R5 antikor, 33 mer peptidi, 26 mer peptidi ve 25 mer peptidi gibi toksik-çölyak peptidlerinde bulunan ve tekrar tekrar ortaya çıkan QQPFP, QQQFP, PQPFP, LQPFP, QQPYP, QLPYP potansiyel çölyak toksik epitoplarını tanımaktadır [100].

Sandwich ELISA yönteminde yakalama antikorları mikroluka kuyucuklarının iç yüzeyine immobilize edilmiştir [97]. Şekil 2.8'de sandwich ELISA'nın mekanizması şematize edilmiştir. Hedef bileşeni yani antijeni (gliadin) içeren çözelti (örnek veya kalibratörler) kuyucuklara eklendiğinde antijen-antikor reaksiyonu başlar (Adım 1). İnkübasyon ve yıkamadan sonra bağlanmayan bileşenler uzaklaşır. Kuyucuklara enzim etiketli antikor (konjugat) eklendiğinde antijen-antikor kompleksi ile reaksiyona girer (Adım 2). Bu yapı sandwich olarak adlandırılmaktadır [101]. Antijen, etiketlenmemiş antikor ile enzim etiketli antikor arasında sıkışmış durumdadır [15]. Yıkama işleminden sonra substrat/kromojen eklendiğinde antikora bağlı olan enzim renksiz olan substrat/kromojeni antikor-antijen-antikor kompleksinin varlığına işaret eden renkli bir ürüne dönüştürür (Adım 3) [101]. Durdurma reaktifinin (stop reagent) eklenmesiyle mikroluka kuyucuğunun içeriği sarı bir ürüne dönüşür. Bir mikroluka okuyucusu kullanarak 450 nm'de absorban ölçümü yapılmaktadır [101]. Ölçülen absorban ekstraktaki antijen derişimi ile doğrudan orantılıdır. Antijenin (gliadin) derişimi bir referans protein ve

kalibrasyon eğrisi kullanarak hesaplanmaktadır [15]. Sandwich R5 ELISA yöntemine dayalı Ridascreen R7001 kitinin tespit limiti 1 ppm gluten, ölçüm limiti ise 5 ppm gluten olarak verilmiştir.



Şekil 2.8. ELISA yöntemleri: (A) Sandwich ELISA (B) Competitive ELISA [15]

R5 monoklonal antikor tabanlı sandwich ELISA yöntemi Codex Alimentarius komisyonu tarafından kabul edilen gluten miktarını belirleme metodudur. Aynı zamanda sandwich R5 ELISA'da bir kısıtlama mevcuttur. Bir protein ya da peptitde R5 antikorunun tanıdığı toksik dizilimlerde en az iki epitopun aynı anda bulunması gerekmektedir. Fakat hidrolize gıdalarda gluten proteinleri parçalanarak sadece bir toksik epitopun görülebileceği peptitlere dönüşmektedir. Bu durumda sandwich R5 ELISA doğru sonuç vermemektedir. Codex Alimentarius komisyonu hidrolize ürünlerde R5 testinin modifikasyonunun (competitive ELISA) uygulanmasını belirtmiştir [102].

2.7.1.2. Competitive R5 ELISA

R5 monoklonal antikoruna dayalı competitive R5 ELISA hem parçalanmış hem de parçalanmamış gluteni kesin olarak ölçebilmektedir. Competitive yöntemi enzimatik olarak degrade olmuş gluteni tanımlamak için idealdir. Bu yöntemde sadece bir antikor kullanılır ve bu nedenle sadece bir antijenik epitopun olması yeterlidir. Ayrıca competitive ELISA, sandwich ELISA'dan daha ucuz ve daha hızlıdır [100].

Competitive ELISA üç bileşenden oluşmaktadır: mikrolaka üzerine immobilize edilmiş antijen, sınırlı ve sabit bir miktarda enzim etiketli antikor ve ekstraktan gelen antijen [15]. Kalibratörden ve örnek ekstraktından gelen antijen (gliadin), bir antikor için mikrolaka yüzeyine immobilize edilmiş antijen (gliadin) ile rekabet eder [101].

Şekil 2.8’de competitive ELISA’nın mekanizması şematize edilmiştir. İlk aşamada mikrolaka kuyucuklarına örnek ekstraktı ve kalibratörler pipetlenir ve ardından enzim etiketli antikor (konjugat) ilave edilir (Adım 1). Burada avantaj olarak kalibratörleri ve örnekleri koyarken acele edilmesine gerek yoktur. Çünkü antijen-antikor reaksiyonu antikor eklendiğinde başlamaktadır. İnkübasyon ve yıkamadan sonra substrat/kromojen eklenmesiyle yüzeydeki antijene (gliadine) bağlanan enzim etiketli antikor (konjugat) renk reaksiyonunu katalizler ve kromojeni maviye çevirir (Adım 2). Durma reaksiyonundan sonra renk maviden sarıya döner ve mikrolaka okuyucusunda absorbans okunur. Renk gelişimi karşılıklı olarak hedef analitle orantılıdır [101]. Competitive R5 ELISA yöntemine dayalı Ridascreen R7021 kitinin tespit limiti 4.6 ppm gluten, ölçüm limiti ise 10 ppm gluten olarak verilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Ekşi Hamur Fermentasyonu için Hazırlanan Hamur Bileşenleri

Enzim ile glutensizleştirilmek üzere gerçekleştirilen ekşi hamur fermentasyonunda katkısız buğday unu (Sinangil, Parti No: 691, Türkiye) ve çeşme suyu kullanılmıştır.

Fermentasyon için laktik asit bakteri kaynağı olan (*Lactobacillus fermentum*) toz ekşi maya (Dr. Oetker, Parti No: 1806898, Türkiye) kullanılmıştır.

Gluten degradasyonunu için *A. niger* proteazı (3,000 spektrofotometrik asit proteaz birimi/g) ve *A. oryzae* proteazı (500,000 tirozin temelindeki hemogloblin birimleri/g) BIO-CAT Inc. (Troy, Virgina, ABD) firmasından temin edilmiştir

A. niger proteazı pH 1.0-4.0. ve 30-65 °C aralığında aktiftir ve optimum çalışma koşulları pH 2.5 ve 50 °C' dir. *A. oryzae* proteazı pH 2.5-6.5 ve 25-60 °C aralığında aktiftir ve optimum çalışma koşulları pH 3.0 ve 50 °C dur.

3.1.2. Ekmek Üretiminde Kullanılan Malzemeler

Glutensiz ekmek üretiminde; üretilen glutensiz buğday unu, çeşme suyu, ayçiçek yağı (Ona, Türkiye), şeker (Torku, Türkiye), tuz (Billur, Türkiye), ksantan gam (Tito, Türkiye) ve kabartma tozu (Dr Oetker, Türkiye) kullanılmıştır.

Üretilen glutensiz buğday unundan yapılan ekmek, ticari glutensiz un karışımından (Sinangil, Türkiye) ve normal buğday unundan (Sinangil, Türkiye) üretilen ekmek ile karşılaştırılmıştır. Buğday unundan ve ticari glutensiz un karışımından üretilen ürünlerde ksantan gum ve kabartma tozu kullanılmazken toz ekşi maya (Dr. Oetker, Türkiye) kullanılmıştır.

3.1.3. Kimyasallar

Gluten tayininde, R7021 Ridascreen Gliadin Competitive kiti (R-Biopharm AG, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan diğer kimyasallar; etanol (Merck, Almanya), sodyum hidroksit (Merck, Almanya); fenolftaleyn (Merck, Almanya), hekzan (Merck, Almanya), EDTA (Sigma-Aldrich, Almanya)'dir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneme Planı

Çalışmada değişken olarak 4 farklı hamur verimi (un su bulamacının kütlesi/un kütlesi × 100), 4 farklı enzim derişimi ve 3 farklı fermentasyon süresi seçilmiş ve denemeler en az iki kez tekrar edilmiştir. Deneme planı Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Sıvı hamurlarda gluten degradasyonu için oluşturulmuş deneme planı

Değişkenler	Değişken Seviyeleri			
Hamur Verimi	400	500	600	700
Enzim Derişimi (ppm) (1:1 oranında <i>A.niger</i> ve <i>A.oryzae</i> proteazı)	500	600	700	800
Fermentasyon Süresi (saat)	36	42	48	

3.2.2. Ham Madde Analizleri

3.2.2.1 Nem Tayini

Unda nem tayini AACCI Method 44-15.02'ye göre yapılmıştır [103]. Sabit tartıma gelmiş ve darası alınmış tartım kaplarına 3 g un tartılmıştır. Örnekler 130°C'de etüvde sabit tartıma gelene kadar yaklaşık 2-2.5 saat kurutulmuştur. Kurutma sonrasında örnekler desikatöre alınarak oda sıcaklığına kadar soğuması beklenmiştir. Soğuyan örneklerin ağırlığı hassas terazi ile ölçülmüştür. Örneklerin % nemi Eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Nem} = \frac{\text{Kütle kaybı (g)}}{\text{Başlangıçtaki örnek kütlesi (g)}} \times 100 \quad (1)$$

3.2.2.2. Kül Tayini

Unda kül tayini AACCI Method 08-01.01'e göre yapılmıştır [104]. Sabit tartıma gelmiş ve darası alınmış porselen krozelere 3 g un tartılmıştır. Örnekler 550°C'de beyaz kül oluşuncaya kadar kül fırınında yakılmıştır. İşlem sonrasında krozeler desikatöre alınarak oda sıcaklığına soğuması beklenmiştir. Soğuyan krozelerin ağırlığı hassas terazi ile ölçülmüştür. Örneklerin % kül miktarı Eşitlik 2'ye göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Kül} = \frac{\text{Kalıntı kütlesi (g)}}{\text{Örnek kütlesi (g)}} \times 100 \quad (2)$$

3.2.2.3. Protein Tayini

Unda protein tayini otomatik azot tayin cihazı (LECO FP 528) ile yapılmıştır. Cihazı kullanıma hazır hale getirmek için gaz tüpleri açılmıştır ve basınç 40 Psi'ye ayarlanmıştır. Combustion Furn 850 °C, Reduction Heater 750 °C oluncaya kadar beklenmiştir. Bir tane boş yakma yapılmıştır. Tc Cell Current değerinin 90 mA'e düştüğünde cihaz hazır hale gelmiştir. Kalibrasyon yapmak için cihaza üç adet boş yakma verilmiştir. Alınan sonuçlarla kalibrasyon ayarı yapılmıştır. Tekrar boş yakma verilerek kalibrasyon değerinin doğru olup olmadığı kontrol edilmiştir (okunan değer 0.00'a yakın olması gerekmektedir). Cihazla üç adet 0.25 g standart EDTA okunmuştur. Alınan sonuçlarla cihaz kalibrasyon ayarı yapılmıştır. Tekrar bir adet 0.25 g standart EDTA okutularak kalibrasyon değerinin doğru olup olmadığı kontrol edilmiştir (okunan değer 9.57±0.03'e yakın olması gerekmektedir). Cihaz kalibrasyonu tamamlandıktan sonra 0.25 g örnek jel kapsülün içine tartılmıştır ve okuma yapılmıştır. Cihazdan okunan değer direk olarak numunedeki toplam azotu % olarak vermektedir. Bulunan azot değeri buğday unu için olan çevirme faktörü (5.07) ile çarpılarak örnekteki protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.2.4. Yağ Tayini

Unda yağ tayini VELD-SCIENTIFICA marka SER 148 model Soxhlet ekstraksiyon cihazında yapılmıştır. Kartuşlara 3 g un tartılmış ve kartuşun ağzı pamuk ile kapatılmıştır. Kartuşlara metal yüzükler takıldıktan sonra cihaza yerleştirilmiştir. Etüvde kurutularak sabit tartıma gelmiş ve darası alınmış cam kaplara kabın yarısını bir miktar geçecek kadar hekzan koyulup cihaza yerleştirilmiştir. Kartuşlar hekzana daldırıldıktan sonra 130 °C'de ekstraksiyon başlatılmıştır. İşlem bitince hekzanlı kaplar etüvde 60 °C'de kurutularak sabit tartıma getirilmiştir. Kurutma işleminden sonra cam kaplar desikatöre alınarak oda sıcaklığına getirilmiştir ve ağırlığı hassas terazide ölçülmüştür. Örnekteki yağ miktarı (%) Eşitlik 3'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Ham Yağ} = \frac{\text{Cam kaptaki kalıntı kütlesi (g)}}{\text{Örnek kütlesi (g)}} \times 100 \quad (3)$$

3.2.3. Gluten Degradasyonu İçin Sıvı Hamurların Hazırlanması

Çalışmada 400, 500, 600 ve 700 olmak üzere 4 farklı verimde sıvı hamur hazırlanmıştır. Hamur verimleri Eşitlik 4'e göre hesaplanmıştır. Hamurlara un kütlesi üzerinden % 10 toz ekşi maya ilave edilmiştir.

$$\text{Hamur Verimi (HV)} = \frac{\text{Un su bulamacının kütlesi (g)}}{\text{Un kütlesi (g)}} \times 100 \quad (4)$$

Hazırlanan hamurlara toplamda 500, 600, 700 ve 800 ppm olacak şekilde eşit miktarda *A. niger* ve *A. oryzae* proteazı eklenmiştir.

3.2.4. Ekşi Hamur Fermentasyonu

4 farklı verimde hazırlanan ve 4 farklı derişimde enzim ilave edilen sıvı hamurlar etüvde 37°C'de [9] manyetik bir karıştırıcı yardımıyla 400 rpm'de karıştırılarak 36, 42 ve 48 saat fermente edilmiştir. Deneme planındaki her bir deney 2 tekerrür olarak çalışılmıştır. Şekil 3.1'de çalışmada kullanılan etüv ve karıştırma sistemi gösterilmektedir. Fermentasyon boyunca sıvı hamurlarda pH ölçümü ve titrasyon asitliği tayini yapılmıştır. Fermentasyon sonunda sıvı hamurlarda gluten tayini yapılmıştır.

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan fermentasyon sistemi

3.2.4.1. Gluten Tayini

R7021 gliadin competitive kit ile AACCI 38.55.01 yöntemine göre bazı modifikasyonlar ile gluten tayini yapılmıştır [105]. Gluten tayini, ekstraksiyon ve ELISA prosedürü olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Her iki aşamada da kullanılacak ekipman, banko, cam malzeme, araç ve gereçler % 40'lık etanol ile silinmiştir.

Ekstraksiyon aşamasında ilk olarak 1 ml sıvı örnek (katılarda 1 g örnek) 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır, üzerine 9 ml (katı örneklerde 10 ml) % 60'lık etanol eklendikten sonra 30 saniye vorteks cihazında (Dlab MX S) karıştırılmıştır. Karıştırılan örnekler oda sıcaklığında 10 dakika rotatorda (Dlab MX-RD-Pro) aşağı yukarı olacak şekilde karıştırılmıştır. 10 dakika sonunda örnekten 1 ml alınarak 2 ml'lik santrifüj tüpüne koyulmuş ve oda sıcaklığında 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan başka bir tüpe 500 µl alınmıştır. Böylece örneklerin ekstraksiyon aşaması tamamlanmıştır.

ELISA test aşamasında öncelikle örnek seyreltme sıvısı (sample diluent) saf su ile seyreltilmiş (4+1) ve vorteksde karıştırılmıştır. 980 µl seyreltilmiş örnek seyreltme sıvısına 20 µl süpernatant eklenmiş ve vorteksde karıştırılmıştır. Beş farklı konsantrasyondaki standarttan ve seyreltilmiş örneklerden 50 µl alınarak mikropłaka kuyucuklarına sırayla koyulmuş ve ardından her kuyucuğa 50 µl seyreltilmiş konjugattan (10+1) ilave edilmiştir. Dikkatlice çalkalanan mikropłaka 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklar saf su ile seyreltilmiş (9+1) yıkama çözeltisi (wash buffer) ile üç kez yıkanmıştır. Yıkama sonrasında kuyucuklarda baloncuk kalmamasına dikkat edilmiştir. Yıkamadan sonra kuyucuklara 100 µl kırmızı kromojen eklenmiş, hafifçe karıştırılmış ve karanlıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 100 µl durdurma çözeltisi (stop solution) eklenmiş ve 450 nm'de absorbandsı okunmuştur. Sonuçlar RIDA SOFT Win Z9999 (Version 1.79, R-Biopharm, Darmstadt, Almanya) yazılımı ile hesaplanmıştır.

3.2.4.2. pH Ölçümü

Fermente edilen hamurlarda 0, 18, 36, 42 ve 48. saatlerde pH ölçümleri yapılmıştır. pH ölçümleri, hamurlara bir pH metre (Ohaus Starter3100) daldırılarak yapılmıştır.

3.2.4.3. Titrasyon Asitliği Tayini

Fermente edilen hamurlarda 0, 18, 36, 42 ve 48. saatlerde titrasyon asitliği tayini yapılmıştır. Erlene alınan 10 ml hamur örneğinin üzerine 100 ml saf su ilave edilerek karıştırılmıştır. Hazırlanan karışıma 3-4 damla fenolftaleyn damlatılarak 0.1 N sodyum hidroksit

çözeltisi ile açık pembe renk oluncaya kadar titre edilmiştir. Titrasyon asitliği Eşitlik 5'ten yararlanılarak hesaplanmıştır [106].

$$\% \text{ Asitlik} = \frac{V \times f \times E \times 100}{M} \quad (5)$$

V: Harcanan sodyum hidroksit miktarı, ml

f: Baz çözeltisinin faktörü

E: 1 ml 0.1 N sodyum hidroksitin eşdeğeri asit miktarı, g (laktik asit için 0.009008)

M: Örnek miktarı, ml veya g

3.2.5. Glutensiz Buğday Unu Elde Edilmesi

Fermentasyon sonunda sıvı hamurlar oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek faz ayrımı sağlanmıştır. Ardından hamur tortusu dipte kalacak şekilde üst fazdaki su uzaklaştırılmıştır. Fazla suyu uzaklaştırılan hamurlar etüvde 40 °C'de 48 saat kurutulmuştur ve kuru hamurlar öğütücü yardımıyla un haline getirilmiştir.

3.2.6. Glutensiz Buğday Ununda Yapılan Analizler

3.2.6.1. Nem Tayini

Üretilen glutensiz buğday ununda yapılan nem tayini “3.2.2. Ham Madde Analizleri” başlığı altında anlatılmıştır.

3.2.6.2. Kül Tayini

Üretilen glutensiz buğday ununda yapılan kül tayini “3.2.2. Ham Madde Analizleri” başlığı altında anlatılmıştır.

3.2.6.3. Protein Tayini

Üretilen glutensiz buğday ununda yapılan protein tayini “3.2.2. Ham Madde Analizleri” başlığı altında anlatılmıştır.

3.2.6.4. Yağ Tayini

Üretilen glutensiz buğday ununda yapılan yağ tayini “3.2.2. Ham Madde Analizleri” başlığı altında anlatılmıştır.

3.2.6.5. pH Ölçümü

Üretilen glutensiz buğday ununda pH ölçümleri Ergün ve arkadaşlarına (2010) göre yapılmıştır [107].

3.2.6.6. Titrasyon Asitliği Tayini

Üretilen glutensiz buğday ununda pH ölçümleri Ergün ve arkadaşlarının (2012) yöntemine göre yapılmıştır [107]. Erlene alınan 10 g un örneğinin üzerine 100 ml saf su ilave edilerek karıştırılmıştır. Hazırlanan karışıma 3-4 damla fenolftaleyn damlatılarak 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisi ile açık pembe renk oluncaya kadar titre edilmiştir. Titrasyon asitliği Eşitlik 5'ten yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Ekmek Üretimi

800 ppm enzim kullanılan 500 verimli hamurdan üretilen glutensiz buğday unundan ekmek üretimi yapılmıştır. Aynı zamanda ticari glutensiz un karışımından ve buğday unundan da ekşi mayalı ekmek üretilerek karşılaştırma yapılmıştır.

Glutensiz buğday ekmeği hamurunda 100 g glutensiz buğday unu, 3 g kabartma tozu, 2 g ksantan gam, 3 g tuz, 7 g şeker, 3.5 g sıvı yağ ve 53 ml su kullanılmıştır. Ticari glutensiz un karışımı ve normal buğday unundan üretilen hamurlarda kabartma tozu yerine toz ekşi maya kullanılmıştır. Ticari glutensiz un karışımından ve normal buğday unundan hazırlanan hamurlarda 100 g un, 8 g toz ekşi maya, 3 g tuz, 7 g şeker, 3.5 g sıvı yağ ve 62 ml su kullanılmıştır. Hamurlar hamur yoğurma makinesinde (Arisco JH-350A-5L) 6 dakika yoğurularak elde edilmiştir. Hazırlanan hamurlar 2.5 saat oda sıcaklığında fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyondan sonra 45 g'lık bezelere bölünmüş ve bıçak atılarak yarım saat daha bekletilmiştir. Glutensiz buğday ekmeği (GBE) 35 dakika, ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek (TGE) 38 dakika ve normal buğday ekmeği (NBE) 45 dakika 180 °C'de pişirilmiştir.

3.2.7.1. Ekmek Duyusal Analizi

Glutensiz buğday unundan, ticari glutensiz un karışımından ve normal buğday unundan üretilen üç ekmek örneğinin duyusal değerlendirilmesi eğitilmiş 15 panelist tarafından yapılmıştır. Kontrol örneği olarak normal buğday unundan üretilen ekmek sunulmuştur. Panelistlerden ekmek örneklerinin genel görünümünü, kabuk rengini, iç rengini, gözenek yapısını, kokusunu, tadını, çiğnenenebilirliğini, tekstürünü ve genel beğenisini 7 ölçekli (1-çok kötü, 7-çok iyi) hedonik test ile değerlendirmeleri istenmiştir. Duyusal değerlendirme formu örneği EK 1’de verilmiştir.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi SPSS 20.0 paket programı ile yapılmıştır. Kimyasal ve duyusal analizlerden elde edilen veri ortalamaları one-way ANOVA testine tabi tutulmuş ve önemli bulunan farklılıklar Tukey’s karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Ham Madde Analiz Sonuçları

Ekşi hamur fermentasyonunda standart bir buğday unu kullanılması amacıyla buğday ununun nem, kül, protein ve yağ içeriği (kuru maddede) belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan buğday ununun içeriği (kuru maddede)

Un Bileşenleri	Miktar (%)
Nem	10.27±0.16
Kül	0.71±0.01
Yağ	1.49±0.04
Protein	11.26±0.02

Buğday ununun nem içeriği mikrobiyolojik bozulma ve raf ömrü açısından önemlidir. Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği'nde ekmeklik buğday ununun nem içeriği en fazla % 14.5 olarak verilmiştir [108]. Kullanılan buğday ununun nem içeriği tebliğe göre ekşi hamur fermentasyonunda kullanılmaya uygun bulunmuştur.

Kül içeriği buğday unundaki minarel içeriği hakkında bilgi vermektedir. Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği'nde ekmeklik buğday ununun kül içeriği kuru maddede % 0.7 ile % 0.8 arasında verilmiştir [108]. Kullanılan buğday ununun kül içeriği tebliğe göre ekşi hamur fermentasyonunda kullanılmaya uygun bulunmuştur.

Unda protein değeri hem besin değeri açısından hem de teknolojik açıdan büyük öneme sahiptir. Buğday ununda protein miktarı kuru maddede % 11.26±0.02 olarak tespit edilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği'ne göre ekmeklik buğday ununda protein miktarı kuru maddede en az % 10.5 olması gerekmektedir [108]. Kullanılan buğday ununun protein içeriği tebliğe göre ekşi hamur fermentasyonunda kullanılmaya uygun bulunmuştur.

4.2. Sıvı Hamur Analiz Sonuçları

4.2.1. Gluten Tayini Sonuçları

Buğday ununda gluten degradasyonu için ekşi hamur fermentasyonu gerçekleştirilmiş ve *A. niger* ile *A. oryzae* proteazı kullanılmıştır. Ekşi hamur fermentasyonu için 4 farklı verimde sıvı hamur hazırlanmış, hamurlara 4 farklı derişimde enzim ilave edilmiş ve hamurlar 3 farklı sürede fermente edilmiştir. Fermentasyon süreleri sonunda sıvı hamurların gluten derişimi competitive

ELISA yöntemi ile tayin edilmiş ve gluten derişimi 20 ppm'in altında olan hamur formülasyonları ve fermentasyon süreleri belirlenmiştir.

4.2.1.1. 400 Verimli Sıvı Hamurların Gluten Tayini Sonuçları

400 verimli sıvı hamurda deneme planında yer alan en yüksek enzim derişiminde (800 ppm) ve en yüksek fermentasyon süresinde (48 saat) dahi gluten derişimi 20 ppm'in altına düşmemiştir (29.06 ppm). Bu nedenle 400 verimli hamur ile diğer parametrelerde deneme yapılmamıştır. Ancak ulaşılabilen en düşük gluten derişiminde (29.06 ppm) sıvı hamurun 100 birimlik kütlesine en az 46 birim kuru glutensiz bir un eklendiğinde glutensiz bir hamura dönüştürülebilir. Bununla birlikte elde edilen hamur tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday hamuru olan glutensiz bir hamur olur.

4.2.1.2. 500 Verimli Sıvı Hamurların Gluten Tayini Sonuçları

500 verimli sıvı hamura 500 ppm enzim ilave edildiğinde belirlenen fermentasyon sürelerinde gluten derişimi 20 ppm'in altına düşmemiştir. Enzim ilavesi 500 ppm olduğunda 36, 42 ve 48 saat fermentasyon sonunda gluten derişimi sırasıyla 60.76 ppm, 59.38 ppm ve 38.24 ppm olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Bu gluten derişimlerine sahip sıvı hamurların 100 birimlik kütlesine en az sırasıyla 203.8, 196.9 ve 91.2 birim kuru glutensiz bir un eklendiğinde glutensiz bir hamura dönüştürülebilir. Bununla birlikte elde edilen hamurlar tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday hamuru olan glutensiz hamurlar olur.

500 verimli sıvı hamura 600 ppm enzim ilave edildiğinde de belirlenen fermentasyon sürelerinde gluten derişimi 20 ppm'in altına düşmemiştir (Tablo 4.2). Enzim ilavesi 600 ppm olduğunda 36, 42 ve 48 saat fermentasyon sonunda gluten derişimi sırasıyla 54.92 ppm, 53.06 ppm ve 32.72 ppm olarak tespit edilmiştir. Bu gluten derişimlerine sahip sıvı hamurların 100 birimlik kütlesine en az sırasıyla 174.6, 165.3 ve 63.6 birim kuru glutensiz bir un eklendiğinde glutensiz bir hamura dönüştürülebilir. Bununla birlikte elde edilen hamurlar tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday hamuru olan glutensiz hamurlar olur.

Enzim ilavesi 700 ppm olduğunda 36, 42 ve 48 saat fermentasyon sonunda gluten derişimi sırasıyla 38.72 ppm, 35.24 ppm ve 19.26 ppm olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Gluten derişimi 38.72 ppm ve 35.24 ppm olan sıvı hamurların 100 birimlik kütlesine en az sırasıyla 93.6 ve 76.2 birim kuru glutensiz bir un eklendiğinde glutensiz bir hamura dönüştürülebilir. Bununla birlikte elde edilen hamurlar tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri

glutensiz buğday hamuru olan glutensiz hamurlar olur. Gluten derişimi 19.26 ppm olan sıvı hamur gluten derişimi 20 ppm'in altında olması nedeniyle glutensiz olarak kabul edilebilmektedir. Fakat kuru temelde gluten derişimi hesaplandığında bu formülasyonun kuru temelde glutenli olduğu (96.3 ppm) sonucuna varılmıştır. Bu nedenle bu hamurdan glutensiz un elde etmek mümkün değildir. Gluten derişimi 96.3 ppm olan bu unun 100 birim kuru maddesine 383.9 g kuru bir glutensiz un eklendiği durumda, gluten derişimi 19.9 ppm olan glutensiz bir un elde edilebilir. Ancak bu un tamamıyla glutensiz buğday unu olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday unu olan glutensiz bir un olur.

500 verimli hamura 800 ppm enzim ilave edildiğinde ise hamurun gluten derişimi 36, 42 ve 48 saat fermentasyon sonunda sırasıyla 29.74 ppm, 13.82 ppm ve <10 ppm olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Gluten derişimi 29.74 ppm olan sıvı hamurun 100 birimlik kütlesine en az 48.7 birim kuru glutensiz bir un eklendiğinde glutensiz bir hamura dönüştürülebilir. Bununla birlikte elde edilen hamur tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday hamuru olan glutensiz bir hamur olur. Gluten derişimi 13.82 olan sıvı hamurun kuru temelde gluten derişimi 69.1 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle 42 saat fermentasyon süresi bu hamurdan glutensiz un elde etmek için yetersiz bulunmuştur. Gluten derişimi 69.1 ppm olan bu unun 100 birim kuru maddesine 247.2 g kuru bir glutensiz un eklendiği durumda, gluten derişimi 19.9 ppm olan glutensiz bir un elde edilebilir. Ancak bu un tamamıyla glutensiz buğday unu olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday unu olan glutensiz bir un olur. Ridascreen R7021 gluten analiz kitinin ölçüm sınırı 10 ppm'dir. Gluten derişimi <10 ppm olan sıvı hamurların gluten derişimi 0 ile 10 ppm arasında hangi değerde olduğu bilinmediği için kuru temelde gluten derişimi hesaplanamamaktadır. Bu nedenle bu hamurlar kurutulup un haline getirilmiş ve unda gluten tayini yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda 800 ppm enzim ilave edilen, 48 saat sonunda gluten derişimi <10 ppm olan 500 verimli hamurun kurutulmasıyla elde edilen unda da gluten derişimi <10 ppm olarak tespit edilmiştir. Yani, 800 ppm enzim ilave edilen 500 verimli hamurdan 48 saat fermentasyon ile glutensiz buğday unu elde edilebilmektedir.

Tablo 4.2. 500 verimli hamurda enzim derişimine ve fermentasyon süresine göre gluten derişimi (ppm) (Not: Parantez içindeki değerler kuru temel üzerindendir)

Fermentasyon Süresi (saat)	Gluten Derişimi (ppm)			
	500 ppm enzim	600 ppm enzim	700 ppm enzim	800 ppm enzim
36	60.76±12.61	54.92±4.53	38.72±4.79	29.74±9
42	59.38±6.18	53.06±1,9	35.24±3.97	13.83±1.14 (69.1)
48	38.24±11.5	32.72±8,69	19.26±1.48 (96.3)	<10 (<10)

4.2.1.3. 600 verimli Sıvı Hamurların Gluten Tayini Sonuçları

600 verimli hamura 500 ppm enzim ilave edildiğinde belirlenen fermentasyon sürelerinde gluten seviyesi 20 ppm'in altına düşmemiştir (Tablo 4.3). Enzim ilavesi 500 ppm olduğunda 36, 42 ve 48 saat fermentasyon sonunda gluten derişimi sırasıyla 54.92 ppm, 53.06 ppm ve 32.72 ppm olarak tespit edilmiştir. Bu gluten derişimlerine sahip sıvı hamurların 100 birimlik kütesine en az sırasıyla 174.6, 165.3 ve 63.6 birim kuru glutensiz bir un eklendiğinde glutensiz bir hamura dönüştürülebilir. Bununla birlikte elde edilen hamurlar tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday hamuru olan glutensiz hamurlar olur.

600 verimli hamura 600 ppm enzim ilave edildiğinde ise 36, 42 ve 48 saat fermentasyon sonunda hamurun gluten derişimi sırasıyla 24.68 ppm, 13.32 ppm ve <10 ppm olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Gluten derişimi 24.68 ppm olan sıvı hamurun 100 birimlik kütesine en az 23.4 birim kuru glutensiz bir un eklendiğinde glutensiz bir hamura dönüştürülebilir. Elde edilen bu hamur tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday hamuru olan glutensiz bir hamur olur. Gluten derişimi 13.32 olan sıvı hamur glutensiz olmasına rağmen kuru temelde gluten derişimi 20 ppm'in üstünde (79.92 ppm) hesaplanmıştır. Bu nedenle 600 ppm enzim ilave edilen 600 verimli hamurdan glutensiz un elde etmek için 42 saat fermentasyon süresi yetersiz bulunmuştur. Gluten derişimi 79.92 olan bu unun 100 birim kuru maddesine 301.6 g kuru bir glutensiz un eklendiği durumda, gluten derişimi 19.9 ppm olan glutensiz bir un elde edilebilir. Ancak bu un tamamıyla glutensiz buğday unu olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday unu olan glutensiz bir un olur. Hamurun gluten derişimi 48 saat fermentasyon sonunda <10 ppm olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle 48 saat fermentasyon sonunda hamur kurutulup un haline getirildikten sonra unda gluten tayini yapılmış ve unun

gluten derişimi 12.48 ppm bulunmuştur. Yani, 600 ppm enzim ilave edilen 600 verimli hamurdan 48 saat fermentasyon sonunda glutensiz buğday unu elde edilebilmektedir.

600 verimli hamura 700 ppm enzim ilave edildiğinde ise 36 saat sonunda gluten derişimi 19.04 ppm olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.3). 36. saatte glutensiz hale gelmesine rağmen bu hamur kuru temelde glutenli (114.24 ppm) olduğu için 36 saat fermentasyon süresi yeterli bulunmamıştır. Gluten derişimi 114.24 ppm olan bu unun 100 birim kuru maddesine 474.1 g kuru bir glutensiz un eklendiği durumda, gluten derişimi 19.9 ppm olan glutensiz bir un elde edilebilir. Ancak bu un tamamıyla glutensiz buğday unu olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday unu olan glutensiz bir un olur. 42 saat fermentasyon süresi sonunda ise hamurun gluten derişimi <10 ppm olarak tespit edilmiştir. Bu hamurun kurutulmasıyla elde edilen unda da gluten derişimi <10 ppm olarak bulunmuştur. Yani, 700 ppm enzim ilave edilen 600 verimli hamurdan 42 saat fermentasyon sonunda glutensiz buğday unu elde edilebilmektedir.

600 verimli hamura 800 ppm enzim ilave edildiğinde 36 saat sonunda gluten derişimi 13.84 ppm olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.3). 36. saatte glutensiz hale gelmesine rağmen bu hamur kuru temelde glutenli (83.04 ppm) olduğu için 36 saat fermentasyon süresi yeterli bulunmamıştır. Gluten derişimi 83.04 ppm olan bu unun 100 birim kuru maddesine 317.3 g kuru bir glutensiz un eklendiği durumda, gluten derişimi 19.9 ppm olan glutensiz bir un elde edilebilir. Ancak bu un tamamıyla glutensiz buğday unu olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday unu olan glutensiz bir un olur. 42 saat fermentasyon süresi sonunda ise hamurun gluten derişimi <10 ppm olarak tespit edilmiştir. Bu hamurun kurutulmasıyla elde edilen unda da gluten derişimi <10 ppm olarak bulunmuştur. Yani, 800 ppm enzim ilave edilen 600 verimli hamurdan 42 saat fermentasyon sonunda glutensiz buğday unu elde edilebilmektedir.

Tablo 4.3. 600 verimli hamurda enzim derişimine ve fermentasyon süresine göre gluten derişimi (ppm) (Not: Parantez içindeki değerler kuru temel üzerindendir)

Fermentasyon Süresi (saat)	Gluten Derişimi (ppm)			
	500 ppm enzim	600 ppm enzim	700 ppm enzim	800 ppm enzim
36	54.92±4.53	24.68±4.1	19.04±0.84 (114.24)	13.84±1.96 (83.04)
42	53.06±1.9	13.32±3.82 (79.92)	<10 (<10)	<10 (<10)
48	32.72±8.68	<10 (12.48)	<10 (<10)	<10 (<10)

4.2.1.4. 700 verimli Sıvı Hamurların Gluten Tayini Sonuçları

500 ppm enzim ilave edilen 700 verimli hamurun gluten derişimi 36, 42 ve 48 saat fermentasyon sonunda 32.86 ppm, 12.04 ppm ve <10 ppm olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Gluten derişimi 32.86 ppm olan sıvı hamurun 100 birimlik kütlesine en az 64.3 birim kuru glutensiz bir un eklendiğinde glutensiz bir hamura dönüştürülebilir. Elde edilen bu hamur tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday hamuru olan glutensiz bir hamur olur. Gluten derişimi 12.04 olan sıvı hamur glutensiz olmasına rağmen hamurun kuru temelde gluten derişimi 84.28 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle 500 ppm enzim ilave edilen 700 verimli hamurdan glutensiz un elde etmek için 42 saat fermentasyon süresi yetersiz bulunmuştur. Gluten derişimi 84.28 ppm olan bu unun 100 birim kuru maddesine 323.5 g kuru bir glutensiz un eklendiği durumda, gluten derişimi 19.9 ppm olan glutensiz bir un elde edilebilir. Ancak bu un tamamıyla glutensiz buğday unu olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday unu olan glutensiz bir un olur. Gluten derişimi, 48 saat fermentasyon sonunda ise <10 ppm olarak tespit edilmiştir. Bu hamurun 48 saat sonunda kurutulmasıyla elde edilen unda da gluten derişimi 20 ppm'in altında (16.77 ppm) bulunmuştur. Yani, 500 ppm enzim ilave edilen 700 verimli hamurdan 48 saat fermentasyon sonunda glutensiz buğday unu elde edilebilmektedir.

700 verimli hamura 600 ppm enzim ilave edildiğinde de 36, 42 ve 48 saat fermentasyon sonunda hamurun gluten derişimi sırasıyla 34.23 ppm, <10 ppm ve <10 ppm olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Gluten derişimi 34.23 ppm olan sıvı hamurun 100 birimlik kütlesine en az 61.15 birim glutensiz bir un eklendiğinde glutensiz bir hamura dönüştürülebilir. Elde edilen bu hamur tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday hamuru olan glutensiz bir hamur olur. Gluten derişimi <10 ppm olan sıvı hamurların kurutulmasından elde edilen unda da gluten derişimi <10 ppm olarak tespit edilmiştir. Yani, 600 ppm enzim ilave edilen 700 verimli hamurdan 42 saat fermentasyon sonunda glutensiz buğday unu elde edilebilmektedir.

700 verimli hamura 700 ve 800 ppm enzim ilave edildiğinde ise 36. saatte hamur glutensiz hale gelmiştir (Tablo 4.4). İki enzim derişiminde de hamurun gluten derişimi 36 saat sonunda <10 ppm bulunmuştur. Enzim ilavesi 700 ve 800 ppm olan bu glutensiz hamurların kurutulmasıyla elde edilen unların da glutensiz olduğu tespit edilmiştir. Unların gluten derişimleri sırasıyla 11.67 ppm ve <10 ppm bulunmuştur. Yani, 700 ve 800ppm enzim ilave edilen 700 verimli hamurlardan 36 saat fermentasyon uygulanarak glutensiz buğday unu elde edilebilmektedir. Enzim ilavesi 700 ve 800 ppm olan 700 verimli hamurlar 36 saatte glutensiz hale gelmesi nedeniyle deneme planının dışına çıkılarak bu hamurların 30. saatteki gluten derişimlerine de bakılmıştır. Hamurların gluten derişimi 30 saat fermentasyon sonunda sırasıyla

30.15±2.03 ppm ve 19.29±2.35 ppm bulunmuştur. Kuru temelde hesaplama yapıldığında 30 saat fermente edilen bu hamurlardan glutensiz un elde etmek mümkün değildir.

Tablo 4.4. 700 verimli hamurda enzim derişimine ve fermentasyon süresine göre gluten derişimi (Not: Parantez içindeki değerler kuru temel üzerindendir)

Fermentasyon Süresi (saat)	Gluten Derişimi (ppm)			
	500 ppm enzim	600 ppm enzim	700 ppm enzim	800 ppm enzim
30	analiz yapılmadı	analiz yapılmadı	30.15±2.03	19.29±2.35 (135.03)
36	32.86±7.78	34.23±8.34	<10 (11.67)	<10 (<10)
42	12.04±0.74 (84.28)	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)
48	<10 (16.77)	<10 (<10)	<10 (<10)	<10 (<10)

Gluten derişimi 20 ppm'in altında olan sıvı hamurlar glutensiz olmasına rağmen bu hamurlardan elde edilen unlar glutenli olabilmektedir. Gluten derişimi ölçüm sınırı (<10 ppm) ile 20 ppm arasında olan sıvı hamurlar kuru temelde glutenli olarak hesaplanmıştır. Bu hamurlardan elde edilen glutenli buğday ununa belli bir miktar glutensiz kuru bir un eklenmesiyle glutensiz buğday unu karışımı elde etmek mümkündür. Bu unlar tamamıyla glutensiz buğday unu olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday unu olan glutensiz unlar olmaktadır. Gluten derişimi <10 ppm olan sıvı hamurlar kurutulup un haline getirilmiş ve unda gluten tayini yapılmıştır. Gluten derişimi <10 ppm olan sıvı hamurlardan elde edilen bütün unlar glutensiz bulunmuştur.

Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te görüldüğü üzere aynı sürede ve enzim derişiminde hamur verimi arttıkça gluten derişimi azalmıştır. Verim arttıkça hamurun su miktarı artmakta ve un/su oranı azalmaktadır. Birim enzim başına düşen substrat miktarı azaldığı için gluten derişimi de azalmaktadır. Hamur veriminin artmasıyla gluten derişiminin 20 ppm'in altına düşmesi için gereken fermentasyon süresi ve enzim derişimi azalmıştır.

Aynı hamur veriminde ve fermentasyon süresinde enzim derişiminin artmasıyla gluten derişimi azalmıştır (Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4). Aynı miktardaki substrata daha fazla enzim etki ettiği için gluten derişimi daha düşük olmuştur. Enzim derişimini arttırmak başlangıç reaksiyon hızını arttırdığı için gluten seviyesini 20 ppm'in altına düşürmek için gerekli olan fermentasyon süresini azaltmıştır. Aynı zamanda enzim derişimini arttırmak daha düşük hamur

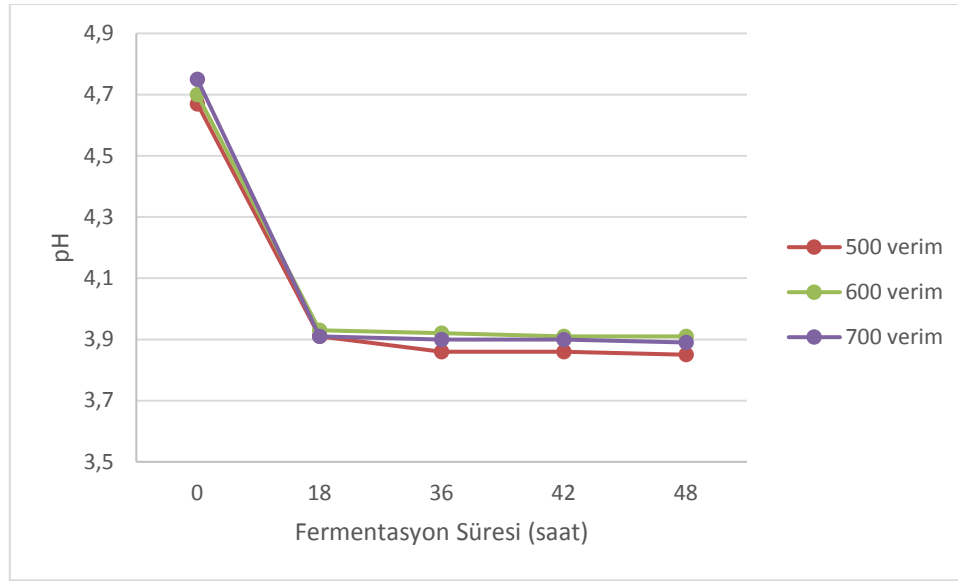
veriminde çalışmaya imkan sağlamıştır. Hamur verimi düştükçe un/su oranı artacağı için enzim derişimi arttırmak gerekmektedir.

Aynı hamur veriminde ve enzim derişiminde fermentasyon süresi arttıkça gluten derişimi azalmıştır (Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4). Çünkü enzimatik reaksiyonlarda zamanla substrat azalmaktadır.

Bulgular literatür bulgularıyla uyumludur. Rizello ve arkadaşları (2007) buğday unundan 500 verimde hazırladıkları ve 37 °C'de 48 saat fermente ettikleri ekşi hamurlarda gluten derişimini 400 ppm *A. niger* ve *A. oryzae* proteazı kullanarak 12 ppm'e düşürmüşlerdir [9]. De Angelis ve arkadaşları (2010) 800 ppm *A. niger* ve *A. oryzae* proteazı kullandıkları, buğday irmiğinden hazırladıkları 500 verimdeki hamurları glutensiz hale getirmek için 37 °C'de 72 saat fermente etmişlerdir [10]. Curiel ve arkadaşları (2014) buğday unundan 500 verimde hazırladıkları hamuru *A. niger* ve *A. oryzae* proteazlarından 400 ppm kullanarak 30 °C'de 48 saat fermente etmiş ve glutensiz hale getirmişlerdir [12].

4.2.2. pH Ölçüm Sonuçları

Çalışmada gerçekleştirilen ekşi hamur fermentasyonu boyunca hamurlarda 0, 18, 36, 42 ve 48. saatlerde pH değerleri ölçülmüştür. Hamurların fermentasyon boyunca pH değerleri düşme eğilimdedir. Fermentasyon başlangıcında hamurların pH değerleri 4.67- 4.75 aralığında iken 48 saat fermentasyon süresi sonunda 3.85-3.91 aralığına düşmüştür. Şekil 4.1'te farklı verimlerdeki hamurların fermentasyon boyunca pH değerindeki değişim gösterilmiştir. Verimleri 500, 600 ve 700 olan hamurların fermentasyon sonundaki pH değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).



Şekil 4.1. Farklı verimlerinde hazırlanan hamurlarda fermentasyon boyunca pH değerinin zamana bağlı değişimi

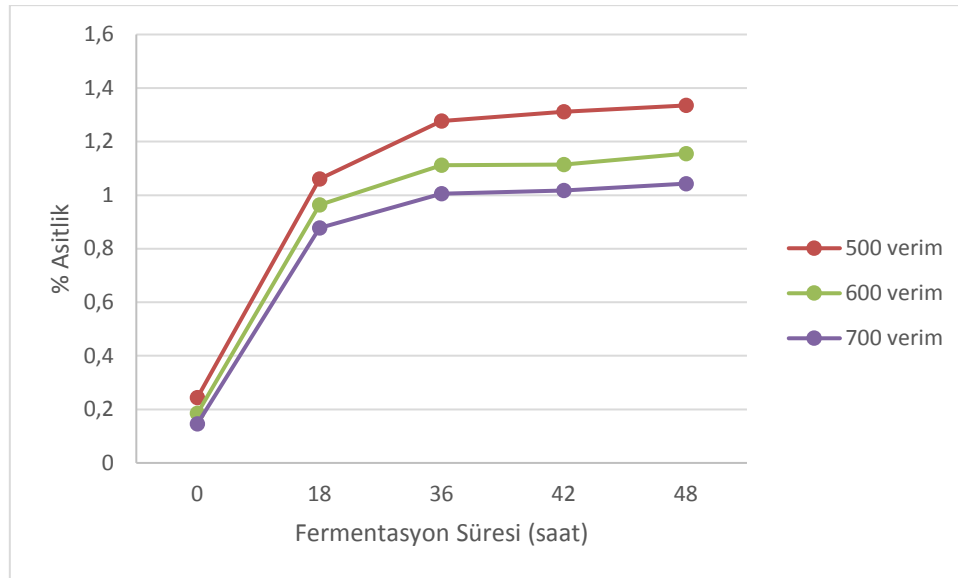
Asidifikasyonun gluten degradasyonunda önemli bir rolü vardır. pH değerinin düşmesi ile glutenin proteolizinde etkili olan tahıl proteazları ve kullanılan fungal proteazlar aktifleşmektedir. Tahıl proteazlarının optimum çalışma pH değeri 4.0 [90], *A. niger* ve *A. oryzae* proteazının sırasıyla optimum pH değeri 2.5 ve 3.0'tür. 18 saat fermentasyon ile hamurların pH değeri 3.91-3.93 aralığına düşmüştür. Hamurlar en düşük pH değerine ulaşmasına rağmen bazı koşullarda gluten derişimi 36. saatte 20 ppm'in altına düşerken bazı koşullarda düşmemiştir. Uygun asidik koşullara ulaşıldığında gluten derişiminin düşmesinde pH değerinden daha çok enzim derişimi, süre ve hamur verimi etkili olmuştur. Örneğin 500 verimli hamurda 36. saatte uygun pH değerine düşmesine rağmen deneme planında yer alan fermentasyon süresi ve enzim derişimi yeterli olmamıştır. Buna rağmen 700 verimli hamurda 36. saatte gluten derişimi 20 ppm altına düşmüştür. Ekşi hamur fermentasyonu proteoliz sınırlı gerçekleşmekte ve glutenin % 5'inden daha azı degrede olabilmektedir ve bu nedenle kapsamlı bir gluten degradasyonu için enzim ilavesi gerekmektedir [11]. Süre ve hamur verimi (substrat-un derişimi) enzim reaksiyonunu etkilediği için bu parametreler gluten degridasyonunda daha belirleyici olmaktadır.

Bulgular literatür bulgularıyla uyumludur. Thiele ve arkadaşları (2002) 400 hamur veriminde hazırladıkları ekşi hamurlarda pH değerini 8 saat fermentasyon süresi sonunda 4.5-5.0 aralığında, 24 saat fermentasyon süresi sonunda 3.5-4.0 aralığında bulmuştur [109]. Yağmur (2013) çalışmasında buğday unuyla 250 ve 400 hamur veriminde hazırladığı ekşi hamurlarda pH değerinin 72 saat fermentasyon süresi sonunda sırasıyla 5.85'ten 3.32'ye ve 5.98'den 3.12'ye düştüğünü tespit etmiştir [110]. Gül ve arkadaşları (2005), Şimşek ve arkadaşları (2006), Dertli ve arkadaşları (2016) çalışmalarında sırasıyla Isparta, Trabzon ve Uşak'taki yerel fırınlardan

topladıkları ekşi hamur örneklerinin pH değerlerini 3.37-3.95 arasında belirlemişlerdir [89, 111, 112]. Ayrıca pH değeri ile ilgili elde edilen sonuçlar Clarke ve arkadaşları (2004), Di Cagno ve arkadaşları (2004), Pepe ve arkadaşları (2004), Paramithiotis ve arkadaşları (2005), De Angelis ve arkadaşları (2006), Kömen (2010), Minervini ve arkadaşları (2011), Küçükçoban (2012), Settani ve arkadaşları (2013), Lhomme ve arkadaşları (2014), Reale ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmalardan elde edilen sonuçlarla da uyumludur [23, 91, 94, 113-120] Bu çalışmalarda 150, 160, 245, 400 gibi farklı verimlerdeki ekşi hamurların fermentasyon sonunda pH değerleri 3.41-4.3 arasında bulunmuştur.

4.2.3. Titrasyon Asitliği Tayini Sonuçları

Çalışmada gerçekleştirilen ekşi hamur fermentasyonu boyunca sıvı hamurlarda 0, 18, 36, 42 ve 48. saatlerde titrasyon asitliği tayini yapılmıştır. Fermentasyon boyunca hamurların asitliği artmıştır. Fermentasyon başlangıcında hamurların % 0.164-% 0.244 aralığında olan asitlik değerleri fermentasyon sonunda % 1.043-% 1.335 aralığına yükselmiştir. Şekil 4.2'de farklı verimdeki hamurların fermentasyon boyunca asitlik değerlerindeki değişim gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere fermentasyon boyunca sıvı hamurlarda hamur verimi arttıkça titrasyon asitliği azalmıştır. Verimi 500, 600 ve 700 olan sıvı hamurların fermentasyon sonundaki asitlik değerleri arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.2. Farklı verimlerinde hazırlanan hamurlarda fermentasyon boyunca asitliğin zamana bağlı değişimi

LAB laktik asit üreterek ortamı asitlendirmiş ve pH değerini düşürmüştür. Ortamın pH değerinin düşmesi ile gluten degradasyonu için uygun koşullar sağlanmıştır. Hamurların toplam

asitliği 48 saat fermentasyon süresi sonunda % 1.043-% 1.335 aralığına yükselmiştir. Gluten seviyesi 20 ppm'in altına düştüğü en yüksek asitlik (% 1.311) 500 verimli, 800 ppm enzim ilaveli hamurda 42 saat sonunda olmuştur, en düşük asitlik ise (% 0.953) 700 verimli, 800 ppm enzimli hamurda 30 saat sonunda olmuştur. Uygun asidik koşullara ulaşıldığında gluten derişiminin düşmesinde pH ve asitlik değerinden daha çok enzim derişimi, süre ve hamur verimi etkili olmuştur. Örneğin; 400 verimli hamurda asidik koşullar sağlanmasına rağmen deneme planında yer alan fermentasyon süresi ve enzim derişimi yeterli olmamıştır.

Titrasyon asitliği bulguları literatür bulgularıyla uyumludur. Paramithiotis ve arkadaşları (2005) 24 saat fermentasyon sonunda buğday unundan hazırladığı ekşi hamurda asitlik değerini % 0.910-1.126 aralığında bulmuştur [115]. Akgün (2007) çalışmasında buğday unundan 200 hamur verimi ile hazırladığı ekşi hamurda fermentasyonun 7. gününde asitliği % 1.34-1.71 aralığında bulmuştur [121]. Kömen (2010) buğday unundan 150 hamur veriminde hazırladığı ekşi hamurda asitlik değeri 24 saat fermentasyon sonunda % 0.646-1.138 aralığında, 48 saat fermentasyon sonunda % 1.215-1.562 aralığında bulmuştur [23]. Yağmur (2013) buğday unundan 250 ve 400 verimde hamurlar hazırlamış ve 3 gün fermente etmiştir [110]. 250 verimdeki hamurda asitlik % 0.178'den % 1.347'ye yükselmiş, 400 verimdeki hamurda % 0.111'de % 1.084'e yükselmiştir. Yapılan çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da hamur verimi arttıkça asitlik değeri azalmıştır. Settani ve arkadaşları (2013) buğday unundan hazırlanan 160 verimdeki ekşi hamurda 21 saat sonunda asitliği % 0.901-1.694 aralığında bulmuştur [118]. Lhomme ve arkadaşları (2014) buğday unundan hazırlanan 245 verimdeki ekşi hamurda asitliği % 0.811-1.441 aralığında tespit etmiştir [119]. Reale ve arkadaşları (2016) çalışmasında buğday unundan 250 verimde ekşi hamur hazırlamış ve 24 saat fermente etmiştir [120]. Fermentasyon sonunda asitlik değeri % 0.315'ten % 0.766'ya yükselmiştir. Corona ve arkadaşları (2016) buğday irmiğinden hazırladıkları ekşi hamurda asitliği % 0.811 olarak bulmuşlardır [122].

4.3. Glutensiz Buğday Unu Analiz Sonuçları

Ekmek yapımında kullanılacak un üretimi için kurutma prosesinin kolay olması açısından en az su içeriğine sahip yani en düşük verimli glutensiz hamur (800 ppm enzim ilavesi ile 48 saat fermente edilen 500 verimli hamur) seçilmiştir. Bu hamurdan elde edilen glutensiz buğday ununda nem, kül, yağ, protein, pH ve titrasyon asitliği tayinleri yapılmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Glutensiz buğday ununun kimyasal analiz sonuçları (kuru maddede)

Kimyasal Özellik	Miktar
Nem (%)	7.56±0.73
Kül (%)	0.74±0.02
Yağ (%)	1.36±0.04
Protein (%)	8.74±0.03
pH	3.95±0.04
Asitlik (%) (laktik asit cinsinden)	4.04±0.03

Üretilen glutensiz sıvı hamurun aşırı suyu uzaklaştırılıp etüvde 40 °C’de 48 saat uygulanan kurutma prosesi sonunda tekstürel olarak kuruduğu tespit edilmiş ve nem tayini yapılmıştır. Unun nem değeri % 7.56±0.73 bulunmuştur. Ertop (2017) etüvde, liyofilizatörde ve püskürtmeli kurutucuda kuruttuğu toz ekşi hamurların nem değerlerini % 4.8 ile % 6.02 arasında tespit etmiştir [123]. Reale ve arkadaşları (2019) püskürtmeli kurutucuda kuruttukları ekşi hamur tozlarının nemini % 6.23-7.56 bulmuşlardır [124]. Bu çalışmada 6 aylık depolama sonunda düşük nem içeriğine sahip (<% 7.5) toz ekşi hamurlarda LAB yaşama yeteneğinin dikkat çekici bir şekilde korunduğunu ve LAB sayısında bir logaritmik azalma olduğunu ifade etmişlerdir. Akgün (2007) etüvde 40 °C’de 3 gün kurutarak elde ettiği ekşi hamur tozlarının nemini % 9.19-10.64 arasında bulmuştur [121]. Çalışmada glutensiz buğday ekşi hamurundan elde edilen unun nem değeri literatür bulgularıyla uyumlu bulunmuştur.

Glutensiz buğday ununun kül içeriği kuru maddede % 0.74±0.02 bulunmuştur. Stefano ve arkadaşları(2018), Golshan Tafti ve arkadaşları (2013) ve Reale ve arkadaşları (2019) ekşi hamur tozlarında kül içeriğinde benzer sonuçlar bulmuşlardır (sırasıyla % 1.01, % 1.9 ve % 0.814-0.866) [124-126].

Glutensiz buğday ununda, normal buğday ununda ve ticari glutensiz buğday ununda kuru maddede sırasıyla % 8.74±0.03, % 11.26±0.02 ve % 1.61±0.01 protein tespit edilmiştir. Un örneklerinin protein değerleri arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur (p<0,05). Glutensiz buğday ununun protein miktarı ticari glutensiz unun protein değerinden oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

Glutensiz buğday ununun pH değeri 3.95±0.04 bulunmuştur. Ertop (2017) farklı yöntemlerle kuruttuğu ekşi hamurlarda pH değerini 4.14-4.51 aralığında tespit etmiştir [123]. Akgün (2007) ve Reale ve arkadaşları (2019) toz ekşi hamurların pH ölçümlerinde benzer sonuçlar (sırasıyla 3.92-4.16 ve 3.9-4.3) elde etmişlerdir [121, 124].

Glutensiz buğday ununun toplam asitlik değeri kuru maddede % 4.04±0.03 olarak Akgün (2007) ile benzer (% 5.07) bulunmuştur [121].

4.4. Ekmek Duyusal Analiz Sonucu

Glutensiz buğday unundan, ticari glutensiz un karışımından ve normal buğday unundan üretilmiş ekmeklerin duyusal analiz sonuçları Tablo 4.6'da verilmiştir. Duyusal analizde ekmeğin genel görünümü, kabuk rengi, iç rengi, gözenek yapısı, kokusu, tadı, çiğnenebilirliği, tekstürü ve genel beğenisi 7 puan üzerinden hedonik test ile değerlendirilmiştir. Ekmeklerin dış görünümü ve iç görünümü Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Ekmek örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları

Duyusal Özellik	Ekmek Örnekleri		
	NBE	TGE	GBE
Genel Görünüm	5.93±0.80 ^a	3.07±2.12 ^b	4.53±1.55 ^a
Kabuk Rengi	6.00±0.76 ^a	2.60±1.45 ^b	4.47±1.60 ^c
İç Rengi	6.00±1.25 ^a	4.07±1.87 ^b	4.00±1.57 ^b
Gözenek Yapısı	6.07±0.88 ^a	4.07±1.71 ^b	3.60±1.50 ^b
Koku	6.27±0.96 ^a	3.80±1.86 ^b	3.47±1.96 ^b
Tat	6.00±1.36 ^a	3.80±1.70 ^b	2.33±1.63 ^c
Çiğnenebilirlik	5.67±1.34 ^a	4.07±1.53 ^b	3.27±1.58 ^b
Tekstür	6.07±1.10 ^a	3.40±1.76 ^b	2.93±1.28 ^b
Genel Beğeni	6.13±0.99 ^a	3.20±1.61 ^b	2.93±1.33 ^b

NBE: Normal buğday ekmeği (ekşi mayalı), TGE: Ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek, GBE: Glutensiz buğday ekmeği

Ortalama± standart sapma

Aynı satırda aynı harfler ile gösterilen değerler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olmadığını göstermektedir ($p>0.05$).

Ekşi mayalı normal buğday ekmeği ile glutensiz buğday ekmeğinin genel görünümüne verilen değerler arasında farklılık önemli bulunmazken ($p>0.05$) ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmekte önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Genel görünümde en yüksek puanı normal buğday ekmeği, en düşük puanı ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek almıştır. Glutensiz buğday ekmeği ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmekten daha yüksek puan almıştır. Değerlendiriciler normal buğday ekmeğine genel görünümde 5.93, ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmeğe 3.07, glutensiz buğday ekmeğine 4.53 puan vermişlerdir.

Kabuk rengi açısından üretilen ekmeklerin farklılığı önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Kabuk rengi değerlendirmesinde en yüksek puanı normal buğday ekmeği alırken glutensiz buğday ekmeği ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmekten daha yüksek puan almıştır. Panelistler normal buğday ekmeğine kabuk renginde 6.00, ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmeğe 2.60, glutensiz buğday ekmeğine 4.47 puan vermişlerdir.

Glutensiz buğday ekmeği ile ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmeğin iç rengine verilen puanlar arasında farklılık önemli bulunmazken ($p>0.05$) normal buğday ekmeğinde önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Panelistler normal buğday ekmeğine iç rengine 6.00, ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmeğe 4.07, glutensiz buğday ekmeğine 4.00 puan vermişlerdir.

Gözenek yapısı açısından ekmekler değerlendirildiğinde glutensiz buğday ekmeği ile ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek arasında farklılık önemli bulunmazken ($p>0.05$) normal buğday ekmeğinde önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Panelistler normal buğday ekmeğinin gözenek yapısına 6.07, ticari glutensiz un karışımından üretilene 4.07, glutensiz buğday ekmeğine 3.60 puan vermişlerdir.

Koku açısından glutensiz buğday ekmeği ile ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek arasında farklılık önemli bulunmamış ($p>0.05$) normal buğday ekmeğinde ise önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Panelistler glutensiz buğday ekmeğinin kokusundaki ekşimsiliğin fazla olduğunu belirtmişlerdir. Koku değerlendirmesinde en yüksek puanı normal buğday ekmeği, en düşük puanı glutensiz buğday ekmeği almıştır. Panelistler normal buğday ekmeğinin kokusuna 6.27, ticari glutensiz un karışımından üretilene 3.80, glutensiz buğday ekmeğine 3.47 puan vermişlerdir.

Ekmek örneklerinin tadındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Panelistler glutensiz buğday ekmeğinin ekşi tadının yoğun olduğunu belirtmişlerdir. Ekmek örneklerinin tat değerlendirmesinde en yüksek puanı normal buğday ekmeği alırken en düşük puanı ekşiliğin fazla olmasından dolayı glutensiz buğday ekmeği almıştır. Tat değerlendirmesinde normal buğday ekmeği 6.00, ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek 3.80 ve glutensiz buğday ekmeği 2.33 puan almıştır.

Çiğnenebilirlikteki farklılık; ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek ve glutensiz buğday ekmeği bazında önemli bulunmazken ($p>0.05$) normal buğday ekmeğinde önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Panelistler çiğnenebilirlik için en yüksek puanı normal buğday ekmeğine, en düşük puanı glutensiz buğday ekmeğine vermiştir. Normal buğday ekmeği 5.67, ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek 4.07 ve glutensiz buğday ekmeği 3.27 puan almıştır.

Ekmekler tekstürel açıdan değerlendirildiğinde ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek ile glutensiz buğday ekmeği arasındaki farklılık önemli bulunmamış ($p>0.05$), normal buğday ekmeği için önemli bulunmuştur ($p<0.05$). En yüksek puanı normal buğday ekmeği alırken en düşük puanı glutensiz buğday ekmeği almıştır. Panelistler normal buğday ekmeğinin tekstürüne 6.07, ticari glutensiz un karışımından üretilene 3.40, glutensiz buğday ekmeğine 2.93 puan vermişlerdir.

Genel beğeni; ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek ve glutensiz buğday ekmeği bazında istatistiksel olarak önemli bulunmamış ($p>0.05$), normal buğday ekmeği için önemli bulunmuştur ($p<0.05$). En beğenilen ekmek normal buğday ekmeği olurken en az beğenilen glutensiz buğday ekmeği olmuştur. Genel beğeni değerlendirmesinde normal buğday ekmeği 6.13, ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek 3.20, glutensiz buğday ekmeği 2.93 puan almıştır.



Şekil 4.3. Ekmek örneklerinin dış görünümü NBE: Normal buğday ekmeği (ekşi mayalı), TGE: Ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek, GBE: Glutensiz buğday ekmeği



Şekil 4.4. Ekmek örneklerinin iç görünümü NBE: Normal buğday ekmeği (ekşi mayalı), TGE: Ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek, GBE: Glutensiz buğday ekmeği

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Türkiye’de glutensiz gıda pazarı hem ürün kalitesi hem de ürün çeşidi açısından oldukça kısırdır. Pazarda mevcut olan glutensiz gıdaların ana bileşeni çoğunlukla nişasta ve düşük proteinli unlardır (örneğin mısır unu, pirinç unu) ve bu gıdalar kalite ve lezzet açısından tüketici beklentilerini karşılamamaktadır. Ayrıca pazarda bulunan glutensiz gıdaların fiyatları glutenli gıdaların fiyatlarına oranla çok daha yüksektir. Glutensiz beslenen bireyler (ZGB ve TGB) mecburi olarak kalite açısından zayıf, besin değeri düşük, sınırlı çeşide sahip ve çok yüksek fiyatlı glutensiz gıda tüketmektedir. Bunlara ek olarak tüketici özellikle ekmekte alışagelmış olan buğday lezzetini aramaktadır. Bu çalışma glutensiz gıda tüketicilerinin bu sorunlarına çözüm bulmaya yöneliktir. Buğday ununun glutensiz gıda üretiminde kullanılabilmesi ile buğday lezzetine olan özlemin giderileceği, buğday ununun ucuz bir ham madde olması sebebiyle glutensiz gıda fiyatını düşürebileceği, protein, mineral ve vitamin miktarının yüksek olması nedeniyle glutensiz gıdaların besleyici değerini yükseltebileceği düşünülmektedir. Bu araştırmada buğday unundan hazırlanmış sıvı hamurlara fungal enzim ilave edilerek ekşi hamur fermentasyonu uygulanmıştır. 400, 500, 600 ve 700 olmak üzere 4 farklı verimde hazırlanan hamurlar 500, 600, 700 ve 800 ppm enzim ilavesi ile 36, 42 ve 48 saat sürelerde fermente edilmiştir. Fermentasyon sonunda gluten seviyesinin 20 ppm’in altına düşen hamur verimleri, enzim derişimleri ve fermentasyon süreleri belirlenmiştir. Gluten seviyesi 20 ppm’in altına düşen en düşük hamur verimindeki formülasyon kurutularak un elde edilmiş ve ekmek üretiminde kullanılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuç ve öneriler aşağıdaki şekilde maddeler halinde özetlenmiştir.

- Belirlenen koşullarda 400 verimli hamurda gluten derişimi 20 ppm’in altına düşmemiştir. Bu hamura belli bir miktar glutensiz un karıştırılması ile glutensiz hamur elde etmek mümkündür. Fakat bu hamur tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday hamuru olan bir hamur olmaktadır. Ayrıca fermentasyon süresinin uzaltılmasıyla ya da enzim derişiminin arttırılmasıyla gluten derişiminin 20 ppm’in altına düşeceği düşünülmektedir.
- 500 verimli hamura 500 ve 600 ppm enzim ilave edildiğinde gluten derişimi 20 ppm’in altına düşmemiştir. Bu hamurlara belli bir miktar glutensiz un karıştırılması ile glutensiz hamur elde etmek mümkündür. Fakat bu hamurlar tamamıyla glutensiz buğday hamuru olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday hamuru olan hamurlar olmaktadır. 700 ppm enzim ilavesiyle 48 saat sonunda gluten derişimi 20 ppm’in altına düşmüştür. Fakat bu formülasyon kuru temelde glutenli hesaplanmıştır. Bu formülasyondan elde edilecek glutenli una belli miktar kuru glutensiz un karıştırılması ile glutensiz buğday unu karışımı

elde etmek mümkündür. Fakat bu durumda bu un tamamıyla glutensiz buğday unu olmayıp, bileşenlerinden biri glutensiz buğday unu olan bir un olmaktadır. Enzim derişiminin 800 ppm'e çıkarılmasıyla fermentasyon süresi kısalmış ve 42 saat sonunda gluten seviyesini eşik değerin altına düşmüştür.

- 600 verimli hamurda gluten derişiminin 20 ppm altına düşmesi için gerekli enzim derişimi ve fermentasyon süresi azalmıştır. 600 verimli hamura da 500 ppm enzim ilave edildiğinde gluten derişimi 20 ppm'in altına düşmemiştir. 600 ppm enzim ilavesi ile 42 saat sonunda gluten derişimi 13.32 ppm'e düşmüştür. Bu formülasyon kuru temelde glutenli olarak hesaplanmıştır. Bu formülasyondan elde edilecek glutenli buğday ununu glutensiz yapabilmek için belli bir miktar kuru glutensiz un karıştırılması gerekmektedir. Enzim derişiminin 700 ve 800 ppm'e çıkarılması ile gluten seviyesinin 20 ppm'in altına düşmesi için gerekli süre 36 saate düşmüştür.
- 700 verimli hamurun gluten derişimi 500 ppm enzim ilavesi ile 42 saatte 20 ppm'in altına düşmüştür. Fakat bu formülasyon da kuru temelde glutenli olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle bu formülasyondan elde edilecek glutenli buğday ununu glutensiz yapabilmek için belli bir miktar kuru glutensiz un karıştırılması gerekmektedir. 700 verimli hamura 600 ppm enzim ilave edildiğinde 42 saatte glutensiz hale gelmektedir. 700 ve 800 ppm enzim ilave edildiğinde ise 36. saate glutensiz hale gelmiştir ve bu nedenle deneme planının dışına çıkılarak 30. saatte de gluten derişimi belirlenmiştir. Enzim derişiminin arttırılmasıyla sıvı hamurun gluten derişimi 20 ppm'in altına düşmesi için gerekli fermentasyon süresi 30 saate kadar düşmüştür.
- Sonuç olarak hamur veriminin artması ile glutensiz hale getirmek için gerekli fermentasyon süresi ve enzim derişimi azalmıştır. Ayrıca enzim derişimini arttırmak da fermentasyon süresini azaltmıştır. Kullanılan su ve enzim miktarı, kurutma prosesi için gerekli enerji sarfiyatı ve sürenin göz önünde bulundurularak yapılacak olan maliyet hesabı ile glutensiz buğday unu üretimi için en uygun hamur verimi, fermentasyon süresi ve enzim derişimi belirlenebilir.
- Elde edilen sonuçlara göre hamur verimi pH ve asitlik değerleri üzerine etki etmiştir. Ekşi hamurların fermentasyon sonundaki pH değeri 3.85-3.91, asitlik değeri % 1.043-1.335 arasında değişmiştir. Hamur verimi arttıkça titrasyon asitliği azalmıştır.
- Gluten derişiminin 20 ppm'in altına düştüğü en düşük verimine sahip (500 verimli) hamur 40 °C'de 48 saat kurutulmuş ve un haline getirilmiştir. Glutensiz buğday ununun kimyasal içeriği % 7.56 nem, % 0.738 kül (kuru maddede), % 1.356 yağ (kuru maddede), % 8.74 protein (kuru maddede) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 3.95 pH değerine ve % 4.04 (kuru maddede) asitlik değerine sahiptir. Glutensiz buğday ununun protein değeri ticari glutensiz un karışımındaki (% 1.6) ile kıyaslandığında oldukça yüksek protein

içeriğine sahip olduğu söylenebilir. Yüksek protein içeriğine sahip glutensiz buğday ununun glutensiz gıda üretiminde başarıyla kullanılması ile glutensiz gıdaların besin değerinin yükseleceği ve tüketici beklentilerinin karşılanacağı düşünülmektedir.

- Duyusal analizde ekşi mayalı normal buğday ekmeği (NBE), ticari glutensiz un karışımından üretilen ekmek (TGE) ve glutensiz buğday ekmeği (GBE) olmak üzere 3 farklı ekmek örneği değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda en beğenilen ekmek kontrol örneği olan NBE olmuştur. TGE ve GBE arasında istatistiksel olarak sadece genel görünüm, kabuk rengi ve tat arasında farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). İç rengi, gözenek yapısı, koku, çiğnenebilirlik, tekstür ve genel beğeni açısından GBE ve TGE istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). Genel görünüm ve kabuk rengi değerlendirmesinde GBE, TGE'den daha yüksek puan almıştır. Ekşi tadın yoğun olması sebebiyle GBE panelistler tarafından beğenilmemiş ve en düşük puanı almıştır. Ekşi tattaki yoğunluk kurutma prosesinin uzun olmasından, kurutma boyunca fermentasyonun devam etmesinden ve dolayısıyla ekşiliğin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kurutma süresinin kısaltılması ile tatta iyileşme olacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca ekşi tadın diğer bir ifadeyle asidik tadın formülasyon çalışmaları ile giderilmesi ile glutensiz buğday ununun daha ucuz ve daha besleyici olması sebebiyle ticari glutensiz un karışımlarının yerini tutacağı ve glutensiz buğday unundan üretilen glutensiz gıdaların daha tercih edileceği düşünülmektedir.
- Ekşi tadın baskılanması ya da örtülmesi için şeker kullanımı tavsiye edilebilir. Bunun için kek, kurabiye, bisküvi gibi şekerli gıdalar üretimi daha uygun olabilir ya da ekşi tadın istenildiği tarhana gibi ürünlerin üretiminde kullanılabilir.
- Bu çalışma sonuçlarına göre buğday ununun ekşi hamur fermentasyonu ve enzim kullanımı ile glutensiz hale getirilebildiği başarıyla gösterilmiştir. Glutensiz buğday unundan ekmek üretilerek buğday temelli glutensiz gıda üretiminin mümkün olacağı gösterilmiştir. Tat sorunun giderilmesiyle glutensiz buğday ürünlerinin pazarda ciddi bir yere sahip olması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Özcan H., Bayramoğlu, O. ve Aydın, N. (2019). Buğday tarımı. 23 Haziran 2019 tarihinde <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/ktae/Belgeler/brosurler/Bu%C4%9Fday%20Tar%C4%B1m%C4%B1.pdf> adresinden erişildi.
- [2]. Chirido, F. G. ve Arranz, E. (2015). Cereal proteins immunostimulatory and toxic peptides. Arranz, Bañares, Rosell, Rodrigo ve Peña (Ed.), *Advances in the understanding of gluten related pathology and the evolution of gluten-free foods* (ss. 141-163). Barcelona: Omnia Science.
- [3]. Osborne, T. B. (1924). *The vegetable proteins*. Longmans, Green and Co.: Londra.
- [4]. Scherf, K. A., Koehler, P. ve Wieser, H. (2016). Gluten and wheat sensitivities - an overview. *Journal of Cereal Science*, 67, 2-11.
- [5]. Türk Gıda Kodeksi, Gluten İntoleransı Olan Bireylere Uygun Gıdalar Tebliği No: 2012/4, Resmi Gazete Sayısı: 28163, Resmi Gazete Tarihi: 04.01.2012.
- [6]. Codex Alimentarius, Standard For Foods For Special Dietary Use For Persons Intolerant To Gluten, CODEX STAN 118-1979, (revised 2008, amendment 2015).
- [7]. Heredia-Sandoval, N. G., Calderón de la Barca, A. M. ve Islas-Rubio, A. R. (2016). Gluten degradation in wheat flour with *Aspergillus niger* prolyl-endopeptidase to prepare a gluten-reduced bread supplemented with an amaranth blend. *Journal of Cereal Science*, 71, 73-77.
- [8]. Scherf, K. A., Wieser, H. ve Koehler, P. (2018). Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Research International*, 110, 62-72.
- [9]. Rizzello, C-G., De Angelis, M., Di Cagno, R., Camarca, A., Silano, M., Losito, I. ve diğerleri. (2007). Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4499-4507.
- [10]. De Angelis, M., Cassone, A., Rizzello, C-G., Gagliardi, F., Minervini, F., Calasso, M. ve diğerleri. (2010). Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from *triticum turgidum* l. var. durum by sourdough lactobacilli and fungal proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (2), 508-518.
- [11]. Gänzle, M.G. (2014). Enzymatic and bacterial conversion during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 37, 2-10.
- [12]. Curiel, J. A., Coda, R., Limitone, A., Katina, K., Raulio, M., Giuliani, G. ve diğerleri. (2013). Manufacture and characterization of pasta made with wheat flour rendered gluten-free using fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Cereal Science*, 59 (1), 79-87.
- [13]. Walter, T., Wieser, H., ve Koehler, P. (2015). Degradation of gluten in rye sourdough products by means of a proline-specific peptidase. *European Food Research and Technology*, 240, 517-524.

- [14]. Rizzello, C. G., Montemurro, M., ve Gobbetti, M. (2016). Characterization of the bread made with durum wheat semolina rendered gluten free by sourdough biotechnology in comparison with commercial gluten-free products. *Journal of Food Science*, 81 (9), H2263–H2272.
- [15]. Wieser, H., Koehler, P. ve Konitzer, K. (2014). *Celiac disease and gluten: multidisciplinary challenges and opportunities*. USA: Elsevier.
- [16]. Der Borght, A. V., Goesaert, H., Veraverbeke, W. S. ve Delcour, J. A. (2005). Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science*, 41, 221-237.
- [17]. Wang, P., Chen, H., Mohanad, B., Xu, L., Ning, Y., Xu, J. ve diğerleri (2014). Effect of frozen storage on physico-chemistry of wheat gluten proteins: studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. *Food Hydrocolloids*, 39, 187-194.
- [18]. Padalino, L., Conte, A. ve Del Nobile, M. (2016). Overview on the general approaches to improve gluten-free pasta and bread, *Foods*, 5 (4), 87-95.
- [19]. Wieser, H. (2000). Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species I. Qualitative and quantitative composition of gluten protein types. *European Food Research and Technology*, 211, 262-268.
- [20]. Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24 (2), 115–119.
- [21]. Ciclitira, P. J., Ellis, H. J. ve Lundin, K. E. A. (2005). Gluten-free diet--what is toxic?. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 19 (3), 359-371.
- [22]. Shewry, P. R. ve Tatham, A. (1997). Biotechnology of wheat quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, 397-406.
- [23]. Kömen, G. (2010). *Structural changes of gliadins during sourdough fermentation as a promising approach to gluten free-diet*. Yüksek Lisans Tezi, İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü Üniversitesi, İzmir.
- [24]. Wieser, H. (1995). The precipitating factor in coeliac disease. *Bailliere's Clinical Gastroenterology*, 9, 191-207.
- [25]. Türksoy, S. ve Özkaya, B. (2006). Gluten ve çölyak hastalığı, *Türkiye 9. Gıda Kongresi kitabı* içinde (ss. 807-810). Bolu.
- [26]. Ciclitira P. J., Evans D. J., Fagg N. L. K., Lennox, E. S. ve Dowling, R. H. (1984). Clinical testing of gliadin fractions in coeliac patients. *Clinical Science*, 66, 357-364.
- [27]. Özüğür, G. (2011). *Ekşi hamur kullanımının glutensiz ekmeklerin bazı kalite özelliklerine etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- [28]. Gänzle, M. G., Lõponen, J. ve Gobbetti, M. (2008). Proteolysis in sourdough fermentations : mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 513-521.

- [29]. Stănciuc, N., Banu, I., Bolea, C., Patraşcu, L. ve Aprodu, I. (2018). Structural and antigenic properties of thermally treated gluten proteins. *Food Chemistry*, 267, 43–51.
- [30]. Lee, A. ve Newman, J.M. (2003). Celiac diet: its impact on quality of life. *Journal of the American Dietetic Association*, 103 (11), 1533-1535.
- [31]. Shewry P. R, Miflin, B. J. ve Kasarda D. D. (1984) The structural and evolutionary relationships of the prolaminstorage proteins of barley, rye and wheat. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Science*, 304, 297-308.
- [32]. Shewry, P. R., Tatham, A. S., Forde, J., Kreis, M. ve Miflin, B.J. (1986). The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of Cereal Science*, 4 (2), 97–106.
- [33]. Elli, L., Villalta, D., Roncoroni, L., Barisani, D., Ferrero, S., Pellegrini, N. ve diğerleri. (2017). Nomenclature and diagnosis of gluten-related disorders: A position statement by the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (AIGO). *Digestive and Liver Disease*, 149, 138-146.
- [34]. Sapone, A., Bai, J.C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P.H., Hadjivassiliou, M. ve diğerleri. (2012). Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*, 10 (13), 1-12.
- [35]. Walter, T., Wieser, H. ve Koehler, P. (2014). Degradation of gluten in wheat bran and bread drink by means of a proline-specific peptidase. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 4 (5), 1-6.
- [36]. Jnawali, P., Kumar, V. ve Tanwar, B. (2016). Celiac disease: overview and considerations for development of gluten-free foods, *Food Science and Human Wellness*, 1-8.
- [37]. Cureton P. ve Fasano, A. (2009). The increasing incidence of celiac disease and the range of gluten-free products in the marketplace. Gallagher (Ed.), *Gluten free food science and technology* (ss. 1-16). United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- [38]. Catassi, C. ve Fasano, A. (2008). Celiac disease. Arendt ve Dal Bello (Ed.), *Gluten-free cereal product and beverage* (ss. 1-22). USA: Elsevier
- [39]. Green, P. H. R. ve Cellier, C. (2007). Celiac disease. *New England Journal of Medicine*, 357 (17), 1731–1743.
- [40]. Çölyak Yaşam Derneği. (2015). Çölyak hastalığı. 26.06.2019 tarihinde <http://www.colyak.org.tr/sayfa.asp?Sayfa=Kategori&Bolum=5> adresinden erişildi.
- [41]. Mir, S. A., Shah, M. A., Naik, H. R. ve Zargar, I. A. (2016). Influence of hydrocolloids on dough handling and technological properties of gluten-free breads. *Trends in Food Science and Technology*, 51, 49–57.
- [42]. Thompson T. 2000. Folate, iron, and dietary fiber contents of the gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 100 (11), 1389-1395.

- [43]. Pellegrini, N. ve Agostoni, C. (2015). Nutritional aspects of gluten-free products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (12), 2380–2385.
- [44]. Yazynina, E., Johansson, M., Jagerstad, M. ve Jastrebova, J. (2008). Low folate content in gluten-free cereal products and their main ingredients. *Food Chemistry*, 111, 236–242.
- [45]. Naik, R. D., Seidner, D. L. ve Adams, D. W. (2018). Nutritional consideration in celiac disease and nonceliac gluten sensitivity. *Gastroenterology Clinics of North America*, 47 (1), 139–154.
- [46]. Mintel. (2015). Gluten-free foods US October 2015 report. 22 Haziran 2019 tarihinde <https://www.mintel.com/press-centre/food-and-drink/half-of-americans-think-gluten-free-diets-are-a-fad-while-25-eat-gluten-free-foods> adresinden erişildi.
- [47]. Mintel. (2016). Gluten-free foods US October 2016 report. 22 Haziran 2019 tarihinde <http://academic.mintel.com/display/748050/#> adresinden erişildi.
- [48]. The Hartman Group I. (2018). *The Hartman Group's Health & Wellness 2015 and Organic & Natural 2014 reports*. 22 Haziran 2019 tarihinde <http://www.hartman-group.com/acumenPdfs/gluten-free-2015-09-03.pdf> adresinden erişildi.
- [49]. Miranda, J., Lasa, A., Bustamante, M. A., Churrua, I. ve Simon, E. (2014). Nutritional differences between a gluten-free diet and a diet containing equivalent products with gluten. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69, 182-187.
- [50]. Reilly, N. R. (2016). The gluten-free diet: recognizing fact, fiction, and fad. *Journal of Pediatrics*, 175, 206–210.
- [51]. Lee, A. R., Ng, D. L., Zivin, J. ve Green, P. H. R. (2007). Economic burden of a gluten-free diet. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 20, 423-430.
- [52]. Castillo, C., Rivas, C. C. (2008). Costs of a basic food basket for celiac patients in Chile. *Revista Medica De Chile*, 136, 613-619.
- [53]. Stevens, R. ve Rashid, M. (2008). Gluten-free and regular foods: a cost comparison. *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research*, 69, 147-150.
- [54]. Abernethy, G., ve Bannerman, E. (2011). Comparison of the cost, choice and availability of a healthy balanced gluten-free diet (GFD) with a standard diet that meet nutrient and food based guidance. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70 (OCE4), E188.
- [55]. Burden, M., Mooney, P. D., Blanshard, R. J., White, W. L., Cambray-Deakin, D. R., Sanders, D. S. (2015). Cost and availability of gluten-free food in the UK: in store and online, *Postgraduate Medical Journal*, 91, 622-626.
- [56]. Lambert, K. ve Ficken, C. (2015). Cost and affordability of a nutritionally balanced gluten-free diet: is following a gluten-free diet affordable?. *Nutrition & Dietetics*, 73, 36-42.
- [57]. Panagiotou, S. ve Kontogianni, M. D. (2017). The economic burden of gluten-free products and gluten-free diet: a cost estimation analysis in Greece. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 30 (6), 746–752.

- [58]. Atasoy, G. (2017). *Türkiye’de satılan glutensiz gıdalarda fiyat ve gluten araştırması*, Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.
- [59]. Mbbm. (2018). Dünya glutensiz ürünler pazarı. 10 Haziran 2019 tarihinde <http://www.magazinebbm.com/?p=672> adresinden erişildi.
- [60]. Atasoy, G., Gökhisar, Ö. K. ve Turhan, M. (2019). Gluten Free Food Issues. *Food Science and Techonology*, Under Evoluation
- [61]. Rosell, C.M. ve Matos, M.E. (2015). Market and nutrition issues of gluten-free foodstuff. Arranz, Bañares, Rosell, Rodrigo ve Peña (Ed.), *Advances in the understanding of gluten related pathology and the evolution of gluten-free foods* (ss. 675-713). Barcelona: Omnia Science.
- [62]. Market Research Report. (2018). Gluten-free products markets by types (bakery products, snacks & RTE products, pizzas & pastas, condiments & dressings), distribution channel (conventional stores, specialty stores, drugstores & pharmacies), and region –global forecast to 2023. 22 Kasım 2018 tarihinde <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/gluten-free-products-market-738.html> adresinden erişildi.
- [63]. Loponen, J. (2006). *Prolamin degradation in sourdough. academic dissertation*, Department of Food Technology, University of Helsinki, Helsinki.
- [64]. Dunaevsky, Y. E., Sarbakanova, S. T. ve Belozersky, M-A. (1989). Wheat seed carboxypeptidase and joint action on gliadin of proteases from dry and germinating seeds. *Journal of Experimental Botany*, 40 (221), 1323–1329.
- [65]. Montserrat, V., Bruins, M-J., Edens, L. ve Koning, F. (2015). Influence of dietary components on aspergillus niger prolyl endoprotease mediated gluten degradation. *Food Chemistry*, 174, 440–445.
- [66]. Matysiak-Budnik, T., Candalh, C., Cellier, C., Dugave, C., Namane, A., Vidal-Martinez, T. ve diğerleri. (2005). Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*, 129, 786-796.
- [67]. Gass, J., Bethune, M. T., Siegel, M., Spencer, A. ve Khosla, C. (2007). Combination enzyme therapy for gastric digestion of gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology*, 133, 472-480.
- [68]. Schuppan, D. ve Junker, Y. (2007). Turning swords into plowshares transglutaminase to detoxify gluten. *Gastroenterology*, 133, 1025-1038.
- [69]. Guerdrum, L. J. ve Bamforth, C. W. (2012). Prolamins levels throughs brewing and the impact of prolyl endoproteinaz. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 70 (1), 35-38.
- [70]. Knorr, V., Wieser, H. ve Koehler, P. (2016). Production of gluten-free beer by peptidase treatment. *European Food Research and Technology*, 242, 1129–1140.
- [71]. Walter, T., Wieser, H. ve Koehler, P. (2014) Production of gluten-free wheat starch by peptidase treatment. *Journal of Cereal Science*, 60, 202-209.

- [72]. Buddrick, O., Cornel, H. J. ve Small, D.M. (2015). Reduction of toxic gliadin content of wholegrain bread by the enzyme caricain. *Food Chemistry*, 170, 343-347.
- [73]. Corsetti, A. ve Settani, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40, 539-558.
- [74]. Cappelle, S., Guylaine, L., Gänzle, M. ve Gobbetti, M. (2013). History and social aspects of sourdough. Gobbetti ve Gänzle (Ed.), *Handbook on sourdough biotechnology* (ss. 1-11). New York: Springer.
- [75]. Messens, W. ve De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 31-43.
- [76]. Ekmekci, İ. (2014). *Glutensiz ekşi maya ekmeği üretimi için starter kültür oluşturulması*. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- [77]. Palomba, S., (2008). *Sourdoughs for sweet baked products: microbiology, characterization, screening and study of exopolysaccharides produced by microbial strains*. Doktora tezi, Universty Degli Studi Di Napoli Federico, Italy.
- [78]. Meroth, C. B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M. J. ve Hammes, W. P. (2003). Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1), 475-482.
- [79]. Özüğür, G. (2011). *Ekşi hamur kullanımının glutensiz ekmeklerin bazı kalite özelliklerine etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- [80]. Arendt, E. K., Ryan, L. A. M, ve Dal Bello, F. (2007). Impact of Sourdough on the Texture of Bread. *Food Microbiology*, 24(2), 164-175.
- [81]. De Vuyst, L. ve Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 43-56.
- [82]. Poutanen, K., Flander, L. ve Katina, K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 26 (7), 693-699.
- [83]. Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M. ve diğerleri. (2002). Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria : effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (2), 623-633.
- [84]. Gobetti M., De Angelis, M., Di Cagno, R. ve Rizello, C.G., (2008). Sourdough/lactic acid bacteria. Arendt ve Dal Bello (Ed.), *Gluten free cereal products and beverages* (ss. 267-283), USA: Elsevier.
- [85]. Lacaze, G., Wick, M. ve Cappelle, S. (2007). Emerging fermentation technologies: development of novel sourdoughs. *Food Microbiology*, 24, 155-60.

- [86]. Moore, M. M., Bello, F. D. ve Arendt, E-K. (2008). Sourdough fermented by lactobacillus plantarum fst 1.7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread. *European Food Research And Technology*, 226, 1309–1316.
- [87]. Corsetti A., Gobbetti M., Balestrieri F., Paoletti, F., Russi, L. ve Rossi, J. (1998). Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. *Journal of Food Science*, 60 (2), 347-351.
- [88]. Moore, M. M., Juga, B., Schober, T. J. ve 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), 357–364.
- [89]. Şimşek, Ö., Çon, A.H. ve Tulumoğlu, Ş., (2006). Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*, 17, 263-270.
- [90]. Kawamura, Y., Yonezawa, D., 1982. Wheat flour proteases and their action on gluten proteins in dilute acetic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 767–773.
- [91]. Di Cagno, R., De Angelis, M., Auricchio, S., Greco, L., Clarke, C., De Vincenzi, M. ve diğerleri. (2004). Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2), 1088–1096.
- [92]. Di Cagno, R., De Angelis, M., Alfonsi, G., De Vincenzi, M., Silano, M., Vincentini, O. ve diğerleri. (2005). Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4393-4402.
- [93]. Tuukkanen, K., Loponen, J., Mikola, M., Sontag-Strohm, T. ve Salovaara, H. (2005). Degradation of secalins during rye sourdough fermentation. *Cereal Chemistry Journal*, 82 (6), 677–682.
- [94]. De Angelis, M., Rizzello, C. G., Fasano, A., Clemente, M. G., De Simone, C., Silano, M. ve diğerleri. (2006). VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762, 80–93.
- [95]. Greco, L., Gobbetti, M., Auricchio, R., Di Mase, R., Landolfo, F., Paparo, F. ve diğerleri. (2011). Safety for patients with celiac disease of baked goods made of wheat flour hydrolyzed during food processing. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9, 4-29.
- [96]. Karademir, E. ve Yalçın, E. (2017). Toksik gluten peptitlerin detoksifikasyonunda yeni yöntemler ve gluten toksisitesinin belirlenmesi. *Gıda*, 42(2), 177-185.
- [97]. Wieser, H. 2008. Detecting of gluten. Arendt ve Dal Bello (Ed.), *Gluten-free cereal product and beverage* (ss. 47-72). USA: Elsevier
- [98]. Scherf, K. A. ve Poms, R. E. (2016). Recent developments in analytical methods for tracing gluten. *Journal of Cereal Science*, 67, 112–122.

- [99]. Yeung, J. 2006. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in foods. (Ed.) Koppelman ve Hefle (Ed.), *Detecting Allergens in Food* (ss. 109-121). Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC.
- [100]. Mena, M. C. ve Sousa, C. (2015). Analytical tools for gluten detection policies and regulation. Arranz, Bañares, Rosell, Rodrigo ve Peña (Ed.), *Advances in the understanding of gluten related pathology and the evolution of gluten-free foods* (ss. 527-565). Barcelona: Omnia Science.
- [101]. Immer U. ve Lacorn, M. (2015). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in food. Flanagan (Ed.), *Handbook of food allergen detection and control* (ss. 199-214). Cambridge: Elsevier.
- [102]. Mena, M. C., Lombardía, M., Hernando, A., Méndez, E. ve Albar, J. P. (2012). Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody. *Talanta*, 91, 33-40.
- [103]. AACC International Method 44.15-02, Moisture-Air-Oven Method, Final approval October 30, 1975; Reapproval November 3, 1999.
- [104]. AACC International Method 08.01-01, Ash-Basic Method, Final approval April 13, 1961; Reapproval November 3, 1999.
- [105]. AACC International Method 38-55.01, Gluten in Fermented Cereal-Based Products by Competitive ELISA, First approval February 2013.
- [106]. Cemeroglu, B. (2010). Gıda Analizleri, Ankara: Bizim Grup Basım Evi
- [107]. Ergün, A., Certel, M., Ertugay, Z. ve Kotancılar, G. (2012). Tahıl ve ürünlerinde analitik kalite kontrolü ve laboratuvar uygulama klavuzu, Dördüncü Baskı, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, 131-186.
- [108]. Türk Gıda Kodeksi, Buğday Unu Tebliği, Tebliğ No: 2013/9, Resmi Gazete Sayısı: 28606, Resmi Gazete Tarihi: 20 Nisan 2013.
- [109]. Thiele, C., Gänzle, M. G. ve Vogel, R. F. (2002). Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chemistry*, 79(1), 45-51.
- [110]. 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, Adana.
- [111]. Gül, H., Özçelik, S., Sağdıç, O., Certel, M., (2005). Sourdough bread production with lactobacilli and *s. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochemistry*, 40, 691-697.
- [112]. Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T. ve Sağdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *Lwt-Food Science and Technology*, 71, 116-124.

- [113]. Clarke, C. I., Schober, T. J., Dockery, P., O'Sullivan, K. ve Arendt, E. K. (2004). Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chemistry*, 81(3), 409–417.
- [114]. Pepe, O., Giuseppe, B., Anastasio, M., Moschetti, G., Ercolini, D. ve Villani, F. (2004). Technological and molecular diversity of lactobacillus plantarum strains isolated from naturally fermented sourdoughs. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 443-453.
- [115]. Paramithiotis, S., Chouliaras, Y., Tsakalidou, E. ve Kalantzopoulos, G. (2005). Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochemistry*, 40(8), 2813–2819.
- [116]. Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G. ve diğerleri. (2012). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (4), 1251–1264.
- [117]. Küçükçoban, A, (2012). *Sıvı ekşi hamur sistemi için uygun laktik asit bakteri kombinasyonunun belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.
- [118]. Settanni, L., Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Corona, O., Miceli, A. ve Moschetti, G. (2013). An integrated technological approach to the selection of lactic acid bacteria of flour origin for sourdough production. *Food Research International*, 54 (2), 1569–1578.
- [119]. Lhomme, E., Mezaize, S., Ducasse, M. B., Chiron, H., Champomier-Vergès, M. C., Chaillou, S. Ve diğerleri. (2014). A polyphasic approach to study the dynamics of microbial population of an organic wheat sourdough during its conversion to gluten-free sourdough. *International Microbiology*, 17 (1), 1–9.
- [120]. Reale, A., Di Renzo, T., Zotta, T., Preziuso, M., Boscaino, F., Ianniello, R. ve diğerleri (2016). Effect of respirative cultures of Lactobacillus casei on model sourdough fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 622–629.
- [121]. Akgün, F.B. (2007). *Ekşi Hamur Tozu Eldesi ve Ekmek Üretiminde Kullanılabilme Olanakları*. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.
- [122]. Corona, O., Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Nasca, A., Francesca, N., Martorana, A. ve diğerleri. (2016). Industrial application of selected lactic acid bacteria isolated from local semolinas for typical sourdough bread production. *Food Microbiology*, 59, 43-56.
- [123]. Ertop, M.H. (2017). Farklı fermentasyon ve kurutma yöntemleriyle üretilmiş toz ekşi hamurun bazı mikrobiyolojik nitelikleri ve ekmekteki küf gelişimi üzerine etkileri. *Gıda*, 42 (5), 609-619.
- [124]. Reala, A., Di Renzo, T., Preziuso, M., Panfili, G., Cipriano, L. ve Messina, M.C. (2019). Stabilization of sourdough starter by spray drying technique: new breadmaking perspective. *Food Science and Technology*, 99, 468-475.

- [125]. Stefanello, R., Machado, A., Cavaleiro, C., Santos, M., Nabeshima, E., Coppetti, M. ve diğerleri. (2018). Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production. *LWT Food Science and Technology*, 89, 510-517.
- [126]. Golshan Tafti, A., Peighambardoust, S.H., Haseri, J., Bahrami A. ve Bonab, E.S. (2013). Physico-chemical and funtional properties of spray-dried sourdough in bread making. *Food Science and Technology International*, 19, 271-278.



EK 1: Duyusal Analiz Formu

Örnek Kodu:

Size sunulan ekşi mayalı ekmek örneklerini soldan sağa doğru verilen sırada hedonik ölçeğe göre 7 puan üzerinden değerlendiriniz. Genel görünüm, kabuk rengi, iç rengi, gözenek yapısı, koku, tat, çiğnenebilirlik, tekstür ve genel beğeni için uygun puanı belirtiniz.

1. Ekmeğin **genel görünümü** hakkındaki düşüncenizi işaretleyiniz.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
1	2	3	4	5	6	7
Çok Kötü						Çok İyi

2. Ekmeğin **kabuk rengi** hakkındaki düşüncenizi işaretleyiniz.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
1	2	3	4	5	6	7
Çok Kötü						Çok İyi

3. Ekmeğin **iç rengi** hakkındaki düşüncenizi işaretleyiniz.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
1	2	3	4	5	6	7
Çok Kötü						Çok İyi

4. Ekmeğin **gözenek yapısı** hakkındaki düşüncenizi işaretleyiniz.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
1	2	3	4	5	6	7
Çok Kötü						Çok İyi

5. Ekmeğin **kokusu** hakkındaki düşüncenizi işaretleyiniz.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
1	2	3	4	5	6	7
Çok Kötü						Çok İyi

6. Ekmeğin **tadı** hakkındaki düşüncenizi işaretleyiniz.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
1	2	3	4	5	6	7
Çok Kötü						Çok İyi

7. Ekmeğin ağızda **çiğnenebilirliği** hakkındaki düşüncenizi işaretleyiniz.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
1	2	3	4	5	6	7
Çok Kötü						Çok İyi

8. Ekmeğin **tekstürü** hakkındaki düşüncenizi işaretleyiniz.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
1	2	3	4	5	6	7
Çok Kötü						Çok İyi

9. Ekmek hakkındaki **genel beğeninizi** işaretleyiniz.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
1	2	3	4	5	6	7
Çok Kötü						Çok İyi

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Büşra ŞAHİN

Doğum Tarihi : 16.12.1991

E-mail : busrasahin4237@gmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Okul	Yıl
Yüksek Lisans	Gıda Mühendisliği Bölümü	Mersin Üniversitesi	2016-
Yüksek Lisans	Gıda Mühendisliği Bölümü	Ege Üniversitesi	2014-2016 (Yatay Geçiş)
Lisans	Gıda Mühendisliği Bölümü	Ege Üniversitesi	2009-2014
Lise	Matematik/Fen	Tavşanlı IMKB Anadolu Öğretmen Lisesi	2005-2009

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. Esmer Kızıllırmak, Ö. and **Şahin, B.** 2018, Chapter of “Active Packaging Applied to Dairy Products”, *Advances in Dairy Products*, Edited by Contò, F., Del Nobile, M.A., Faccia, M., Zambrini, A.V., Conte, A., Wiley Blackwell, Italy, page 296-314.
2. Esmer Kızıllırmak, Ö.; Çağındı, Ö. and **Şahin, B.** 2017, Does the realistic contact and daily use conditions limit the use of polycarbonate baby bottles for migration and residue level of bisphenol-A, *Journal of Food and Health Science*, 3(4),150-160..
3. **Şahin, B.** and Turhan, M. 2017. Toward wheat products with degraded gluten. Abstract Book of 16th European Young Cereal Scientists and Technologists Workshop, Thessaloniki, GREECE, April 18-21, 2017, p. 26. (sözlü sunum).
4. **Şahin, B.** and Esmer Kızıllırmak, Ö. 2017. Innovative Food Packaging Technologies Applied in Dairy Products. Abstract Book of International Conference on Agriculture, Forest, Food Science and Technologies, May 15-17, p. 1264. (sözlü sunum).