

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**EKŞİ HAMUR FERMANTASYONUNDA LAKTİK  
ASİT BAKTERİ GLUKONATRANSFERAZLARININ  
ROLÜNÜN VE TEKNOLOJİK ÖNEMİNİN BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**DUYGU ZEHİR ŞENTÜRK**

**DENİZLİ, TEMMUZ - 2024**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**



**EKŞİ HAMUR FERMANTASYONUNDA LAKTİK  
ASİT BAKTERİ GLUKONAT TRANSFERAZLARININ  
ROLÜNÜN VE TEKNOLOJİK ÖNEMİNİN BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**DUYGU ZEHİR ŞENTÜRK**

**DENİZLİ, TEMMUZ - 2024**

**Bu tez çalışmasının birinci kısmı Yıldız Teknik Üniversitesi BAP tarafından FBA-2023-5426 kodlu proje, ikinci kısmı TÜBİTAK tarafından 218O003 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**Duygu ZEHİR ŞENTÜRK**

## ÖZET

### EKŞİ HAMUR FERMANTASYONUNDA LAKTİK ASİT BAKTERİ GLUKONATRAFERAZLARININ ROLÜNÜN VE TEKNOLOJİK ÖNEMİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

DUYGU ZEHİR ŞENTÜRK

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ÖMER ŞİMŞEK)

DENİZLİ, TEMMUZ - 2024

Nişasta, amiloz ve amilopektin adlı glukoz monomerlerinden oluşan ve doğada oldukça yaygın bulunan karbonhidrattır. Ucuz, erişilebilir, bozunabilir ve yenilenebilir özellikleriyle birçok endüstriyel alanda yaygın kullanım alanı olan nişasta çeşitli metotlarla modifiye edilebilir. Bu sayede doğası gereği olan düşük çözünürlük, kolay çirilenme gibi olumsuz özellikleri giderilebilmektedir. Nişastayı modifiye edici özelliği olan enzimlerin laktik asit bakterilerinde varlığı bu enzimlerin nişasta modifikasyonu için kullanılmasına olanak sağlamıştır. GH70 enzim ailesi içerisinde bulunan 4,6 ve 4,3  $\alpha$ -GT enzimleri nişastayı orantısızlaştırma reaksiyonlarıyla düz veya dallı yapıda  $\alpha$ -glukana dönüştürür.

Bu tez çalışmasının ilk kısmında, 4,6 ve 4,3  $\alpha$ -glukanotransferaz üreticisi kültürlerin ekşi hamurda starter olarak kullanımıyla mikrobiyota üzerinde etkisi gösterilmiştir. Ekşi hamurda *Limosilactobacillus reuteri* PFC 338 ve *Limosilactobacillus fermentum* PFC 282 suşlarının taşıdıkları *gtfB* geniyle kodlanan glukanotransferazların, suşların mikroflorada canlı kalma oranını önemli ölçüde arttırdığı ve bu suşlar kullanılarak hazırlanan ekşi hamur ekmeklerinin; kontrol ekmeğine göre depolama süresince daha düşük entalpi değişimi ve depolama sonunda da düşük sertlik değerine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca PFC 338 suşu ile hazırlanan ekşi hamur ekmeklerinin glisemik indeksinin (GI) beyaz ekmeğe göre düşük olduğu görülmüştür. Rekombinant enzimlerin doğrudan kullanıldığı ikinci kısımda ise ürünlerin duyusal kabul edilebilirliğini etkilemeden bayatlamayı geciktirici ve GI düşürücü etkisi tespit edilmiştir. Depolama boyunca kontrol ürünlerine nazaran enzim katkılı ekmeğin ve poğaçaların daha düşük sertlik değeri göstermesi enzimlerin tekstürel profili iyileştirici etkisini ortaya koymaktadır.

Çalışmada glukanotransferazların fermantasyon mikrobiyotasını etkilemesinin yanında, ekmeğin teknolojik özelliklerini etkilediği de görülmüştür. Bu enzimleri üreten laktik suşların starter kültür olarak kullanılmasının önerilmesinin yanında enzimin kendisinin kullanımının da fırıncılık ürünleri teknolojisi açısından öneme sahip olduğu anlaşılmıştır.

**ANAHTAR KELİMELELER:** 4,6  $\alpha$ -Glukanotransferaz, 4,3  $\alpha$ -Glukanotransferaz, Nişasta, Laktik asit bakterisi, Ekşi hamur, Glisemik indeks

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF THE ROLE AND TECHNOLOGICAL IMPORTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA GLUCONATRANSFERASES IN SOURDOUGH FERMENTATION

PH.D THESIS

DUYGU ZEHİR ŞENTÜRK

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: PROF. DR. ÖMER ŞİMŞEK)

DENİZLİ, JULY 2024

Starch is a carbohydrate composed of glucose monomers called amylose and amylopectin and is very common in nature. Starch, which is widely used in many industrial areas with its cheap, accessible, degradable and renewable properties, can be modified by various methods. In this way, inherent negative features such as low resolution and easy gelatinization can be eliminated. The presence of starch-modifying enzymes in lactic acid bacteria has enabled the use of these enzymes for starch modification. 4,6 and 4,3  $\alpha$ -GT enzymes in the GH70 enzyme family convert starch into  $\alpha$ -glucan with a straight or branched structure through disproportionation reactions.

In the first part of this thesis study, the effect of 4,6 and 4,3  $\alpha$ -glucanotransferase producing cultures on the microbiota was demonstrated by using them as starters in sourdough. Glucanotransferases encoded by the *gtfB* gene carried by *Limosilactobacillus reuteri* PFC 338 and *Limosilactobacillus fermentum* PFC 282 strains in sourdough significantly increased the survival rate of the strains in the microflora. In addition, it was observed that sourdough breads prepared using these strains had lower enthalpy change during storage and lower hardness values at the end of storage compared to the control bread. Moreover, it was observed that the glycemic index (GI) of sourdough bread prepared with PFC 338 strain was lower than white bread. In the second part, where recombinant enzymes were used directly, their staling and GI-lowering effects were detected without affecting the sensory acceptability of the products. The fact that enzyme-added bread and pastries showed lower hardness values compared to control products during storage reveals the textural profile improving effect of enzymes.

In the study, it was observed that glucanotransferases not only affected the fermentation microbiota, but also affected the technological properties of bread. In addition to recommending the use of lactic strains producing these enzymes as starter cultures, it has been understood that the use of the enzyme itself is also important for bakery products technology.

**KEYWORDS:** 4,6  $\alpha$ -Glucanotransferase, 4,3  $\alpha$ -Glucanotransferase, Starch, Lactic Acid Bacteria, Sourdough, Glycemic Index

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	vi
TABLO LİSTESİ .....	viii
SEMBOL LİSTESİ .....	x
ÖNSÖZ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı .....	2
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ.....</b>	<b>4</b>
2.1 Laktik Asit Bakteri Glukonotransferazlarının Yapısal ve Biyokimyasal Özellikleri .....	4
2.1.1 Laktik Asit Bakterilerinin Genel Taksonomik Özellikleri .....	4
2.1.2 Laktik Asit Bakterilerinde Şeker Katabolizması .....	5
2.1.2.1 Homofermentatif Katabolizma.....	5
2.1.2.2 Heterofermentatif Katabolizma.....	6
2.1.3 Laktik Asit Bakteri Kaynakları .....	9
2.1.4 Laktik Asit Bakterilerinin Gıda Teknolojisi Açısından Önemi .....	9
2.1.4.1 LAB'lerin Probiyotik Özellikleri .....	10
2.1.4.2 Ekzopolisakkarit.....	11
2.1.5 <i>Limosilactobacillus reuteri</i> 'nin Temel Özellikleri .....	12
2.1.6 <i>Limosilactobacillus fermentum</i> 'un Temel Özellikleri .....	13
2.1.7 Glukansükraz Enzimleri .....	13
2.1.7.1 Glukansükraz Proteinlerinin Yapısı ve Etki Mekanizmaları ..	14
2.1.8 Nişasta Üzerine Etkili Enzim Glukansükrazlar .....	17
2.1.8.1 Glukanotransferaz Enzimlerinin Sınıflandırılması .....	19
2.1.8.2 Glukanotransferazların Katalitik Özellikleri.....	23
2.2 Ekşi Hamurun Üretimi ve Fermantasyon Özellikleri .....	26
2.2.1 Ekşi Hamur Fermantasyon Özellikleri ve Tipleri .....	26
2.2.1.1 Ekşi Hamur Tipleri.....	27
2.2.2 Ekşi Hamur Fermantasyon Mikrobiyatısı .....	31
2.2.3 Ekşi Hamurun Ekmekçilik Açısından Önemi ve Sağlık Üzerine Potansiyel Etkileri .....	36
2.2.3.1 Tekstürel Özellikler Üzerine Ekşi Hamurun Etkisi .....	36
2.2.3.2 Aroma Gelişimine Ekşi Hamurun Etkisi .....	38
2.2.3.3 Raf Ömrünün Arttırılmasında Ekşi Hamurun Etkisi.....	39
2.2.3.4 Beslenme ve Sindirim Üzerine Ekşi Hamurun Etkisi .....	40
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>46</b>
3.1 Kullanılan Suşlar ve Gelişme Ortamları.....	46
3.2 Ekşi Hamur Ortamı Analizleri.....	47
3.2.1 Ekşi Hamur Üretim Deseni ve Örnekleme .....	47
3.2.2 Ekşi Hamurların pH ve Toplam Titrasyon Asitliği Analizi.....	48
3.2.3 Ekşi Hamur Mikrobiyal Analizleri .....	49

3.2.4	Ekşi Hamur Denature Gradient Jel Elektroforezi .....	49
3.2.5	Ekşi Hamur Metagenom Analizi .....	51
3.3	Ekşi Hamur Örnekleri ile Ekmek Üretimi .....	52
3.3.1	Preferment Hamurda Vizkozite Tayini .....	53
3.4	Ekşi Hamur Ekmek Analizleri .....	53
3.4.1	Ekşi Hamur Ekmeklerinin Tekstür Analizi .....	53
3.4.2	Ekşi Hamur Ekmeklerinin Spesifik Hacimleri .....	53
3.4.3	Ekşi Hamur Ekmeklerinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi .....	54
3.4.4	Ekşi Hamur Ekmeklerinin Glisemik İndeks Değerinin Belirlenmesi .....	54
3.4.5	Ekşi Hamur Ekmeklerinin Duyusal Analiz .....	55
3.5	4,6 ve 4,3 $\alpha$ -Glukanotransferazların Fırıncılık Ürünlerinde Kullanılması ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	55
3.5.1	Roll Ekmek Üretimi .....	55
3.5.2	Poğaç Üretimi .....	56
3.5.3	Ekmek ve Poğaç Örneklerinin Spesifik Hacminin Belirlenmesi .....	56
3.5.4	Ekmek ve Poğaç Örneklerinin Tekstür Özelliklerinin Belirlenmesi .....	57
3.5.5	Ekmek ve Poğaç Örneklerinin Glisemik İndeks Değerlerinin Belirlenmesi .....	57
3.5.6	Ekmek ve Poğaç Örneklerinin Kalorimetrik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	57
3.5.7	Ekmek ve Poğaç Örneklerinin Duyusal Analizi .....	58
3.6	İstatistiksel Analiz .....	58
<b>4.</b>	<b>BULGULAR ve TARTIŞMA .....</b>	<b>59</b>
4.1	Bakteriyel Suşların 4,6 ve 4,3 $\alpha$ -Glukanotransferaz Fenotip Özellikleri .....	59
4.2	Laktobasil Suşları ile Üretilen Ekşi Hamurların Özellikleri .....	60
4.2.1	Ekşi Hamurların Toplam Asitlik Özellikleri .....	60
4.2.2	Ekşi Hamurların Mikrobiyal Yükü .....	65
4.2.3	4,6 ve 4,3 AGT Enzimi Üreten Laktobasillerle Fermente Edilen Hamurların DGGE Profili .....	74
4.2.4	4,6 ve 4,3 AGT Enzimi Üreten Laktobasillerle Fermente edilen Hamurların Metagenom Özellikleri .....	77
4.3	4,6 ve 4,3 AGT (+) ve (-) Laktobasiller ile Fermente Edilen Ekşi Hamurların Kullanılmasıyla Üretilen Ekmeklerin Özellikleri .....	84
4.3.1	4,6 ve 4,3 AGT (+) ve (-) Laktobasiller ile Fermente Edilen Hamurların Viskozite Özellikleri .....	84
4.3.2	4,6 ve 4,3 AGT (+) ve (-) Laktobasiller ile Fermente Edilen Ekşi Hamurlar Kullanılarak Üretilen Ekmeklerin Fiziksel Özellikleri .....	85
4.3.2.1	Ekmeklerin GI Değerleri .....	92
4.4	4,6 ve 4,3 $\alpha$ -Glukanotransferaz Enzim Preperatlarının Fırıncılık Ürünlerinde Kullanılması ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	95
4.4.1	Ekmek ve Poğaç Örneklerinin Spesifik Hacimlerinin Belirlenmesi .....	97
4.4.2	Ekmek ve Poğaç Örneklerinin Kalorimetrik Özellikleri .....	97
4.4.3	Ekmek ve Poğaç Örneklerinin Tekstür Özellikleri .....	99
4.4.4	Ekmek ve Poğaç Örneklerinin GI Özellikleri .....	101



4.4.5 Ekmek ve Poğaçā Örneklerinin Duyusal Özellikleri .....	103
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>105</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>107</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>136</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>137</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1: Laktik asit bakterilerinde şeker katabolizma yolları .....	7
Şekil 2.2: LAB'lerinin bazı fonksiyonel özellikleri .....	10
Şekil 2.3: Glukansükrazın temel yapısı .....	15
Şekil 2.4: <i>Liml. reuteri</i> 'den temsili GH70 dekstransukraz Gtf180-ΔN'nin kristal bölgesi ve yapısal organizasyonu .....	16
Şekil 2.5: Glukansükraz reaksiyonlarıyla glikozil birimlerinin büyüyen alfa-glukan zincirinin indirgeyici olmayan ucuna ardışık transferi.....	23
Şekil 2.6: 4,6 AGT enzimlerinin katalitik mekanizması .....	25
Şekil 2.7: Ekşi hamurun inokülasyon temelli sınıflandırılması.....	28
Şekil 2.8: Ekşi hamur sisteminin proses temelli sınıflandırılması.....	31
Şekil 4.9: 4,6 <i>gtfB</i> geninin PZR amplifiye edilmesi sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü .....	59
Şekil 4.10: 4,3 <i>gtfB</i> geninin PZR amplifiye edilmesi sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü .....	60
Şekil 4.11: Kontrol hamurunun, 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş hamurların fermentasyonu sonucu elde edilen ekşi hamurların DGGE jel profili A:25 °C'de fermantasyon B: 30 °C'de fermantasyon .....	75
Şekil 4.12: Kontrol hamurunun, 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş hamurların fermentasyonu sonucu elde edilen ekşi hamurların DGGE jel profili C:25 °C'de fermantasyon D: 30 °C'de fermantasyon.....	76
Şekil 4.13: Kontrol hamurunun, 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş, 25 °C'de fermentasyon sonucu elde edilen hamurların tür çeşitliliği .....	79
Şekil 4.14: Kontrol hamurunun, 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş, 30 °C'de fermentasyon sonucu elde edilen hamurların tür çeşitliliği .....	79
Şekil 4.15: Kontrol hamurunun, 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş, 25 °C'de fermentasyon sonucu elde edilen hamurların tür çeşitliliği .....	81
Şekil 4.16: Kontrol hamurunun, 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş, 30 °C'de fermentasyon sonucu elde edilen hamurların tür çeşitliliği .....	82
Şekil 4.17: Kontrol, 4,6 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerin farklı depolama süresince diferansiyel kalorimetrik değişimleri.....	91
Şekil 4.18: Kontrol, 4,3 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerin farklı depolama süresince diferansiyel kalorimetrik değişimleri.....	92
Şekil 4.19: Kontrol, 4,6 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerin duyusal profili .....	94
Şekil 4.20: Kontrol, 4,3 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerin duyusal profili .....	94
Şekil 4.21: 4 U /g un aktiviteye sahip liyofilize enzim örneği kullanılarak yapılan ekmek (4,6-α-glukanotransferaz) ile enzim içermeyen kontrol ekmeğin (C) pişirilme görüntüsü.....	96

<b>Şekil 4.22:</b> 4 U /g un aktiviteye sahip liyofilize enzim örneği kullanılarak yapılan ekmeğ (4,6- $\alpha$ -glukanotransferaz) ile enzim içermeyen kontrol ekmeğin (C) görüntüsü .....	96
<b>Şekil 4.23:</b> Ekmeğ örneklerinin depolama günlerindeki entalpi değişimleri ...	98
<b>Şekil 4.24:</b> Poğaca örneklerinin depolama günlerindeki entalpi değişimleri ...	98
<b>Şekil 4.25:</b> Kontrol ekmeği, 4.6 ve 4.3 enzim katkılı ekmeğlerin duyuşal özellikleri.....	103
<b>Şekil 4.26:</b> Poğaca, 4.6 ve 4.3 enzim katkılı poğaca örneklerin duyuşal özellikleri.....	104

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1:</b> GtfB enziminin son ürün çeşidine göre gruplandırılması.....	22
<b>Tablo 2.2:</b> Ekşi hamurlardan izole edilen LAB ve mayalar.....	35
<b>Tablo 3.3:</b> <i>gtfB</i> geni tespiti için kullanılan PZR bileşimi.....	46
<b>Tablo 3.4:</b> <i>gtfB</i> geni tespiti için kullanılan PZR döngüsü.....	46
<b>Tablo 3.5:</b> PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler.....	47
<b>Tablo 3.6:</b> Çalışmada kullanılan bakteriyel suşlar ve özellikleri .....	47
<b>Tablo 3.7:</b> Ekşi hamur deneme deseni .....	48
<b>Tablo 3.8:</b> PZR-DGGE analizinde %25, %30, %50 ve %60'lık denatüre çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan temel bileşenler ve oranları .....	50
<b>Tablo 3.9:</b> Ekmek ve poğaçaya üretiminde un esasına göre kullanılmış formülasyon.....	56
<b>Tablo 4.10:</b> 25°C'de 4,6 AGT (+) ve (-) suşları ile fermente edilen ve kontrol hamurlarının TTA değerleri (% Laktik Asit cinsinden) ...	62
<b>Tablo 4.11:</b> 25 °C'de 4,3 AGT (+) ve (-) suşları ile fermente edilen ve kontrol hamurlarının TTA değerleri (% Laktik Asit cinsinden) ...	62
<b>Tablo 4.12:</b> 30 °C'de 4,6 AGT (+) ve (-) suşları ile fermente edilen ve kontrol hamurlarının TTA değerleri (% Laktik Asit cinsinden) ...	64
<b>Tablo 4.13:</b> 30 °C'de 4,3 AGT (+) ve (-) suşları ile fermente edilen ve kontrol hamurlarının TTA değerleri (% Laktik Asit cinsinden) ...	64
<b>Tablo 4.14:</b> 25 °C' de fermente edilen hamurların farklı pasajlar sonunda laktobasil yükü (log kob/g) .....	66
<b>Tablo 4.15:</b> 30 °C'de fermente edilen hamurların farklı pasajlar sonunda laktobasil yükü (log kob/g) .....	67
<b>Tablo 4.16:</b> 25 °C' de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda laktokok yükü (log kob/g).....	68
<b>Tablo 4.17:</b> 30 °C' de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda laktokok yükü (log kob/g).....	69
<b>Tablo 4.18:</b> 25 °C' de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda TAMB sayısı (log kob/g).....	70
<b>Tablo 4.19:</b> 30 °C'de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda TAMB sayısı (log kob/g).....	71
<b>Tablo 4.20:</b> 25 °C'de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda maya-küf sayısı (log kob/g) .....	72
<b>Tablo 4.21:</b> 30 °C'de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda maya-küf sayısı (log kob/g) .....	73
<b>Tablo 4.22:</b> Kontrol hamuru ve 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ile fermente edilen hamurların viskozite özellikleri.....	85
<b>Tablo 4.23:</b> Kontrol hamuru ve 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ile fermente edilen hamurların viskozite özellikleri.....	85
<b>Tablo 4.24:</b> Kontrol hamuru ve 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ekşi hamurları ile hazırlanan ekmeklerin spesifik hacim özellikleri.....	86
<b>Tablo 4.25:</b> Kontrol, 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ekşi hamurları ile hazırlanan ekmeklerin spesifik hacim özellikleri.....	86

<b>Tablo 4.26:</b> Kontrol, 4,6 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerinin tekstürel özellikleri.....	87
<b>Tablo 4.27:</b> Kontrol, 4,3 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerinin tekstürel özellikleri.....	88
<b>Tablo 4.28:</b> Beyaz ekmek, 4,6 AGT (+) ve (-) suşları kullanılarak hazırlanan ekşi hamur ekmeklerinin glisemik indeks değeri.....	92
<b>Tablo 4.29:</b> Beyaz ekmek, 4,3 AGT (+) ve (-) suşları kullanılarak hazırlanan ekşi hamur ekmeklerinin glisemik indeks değeri.....	93
<b>Tablo 4.30:</b> Ekmek ve poğaçaya örneklerinin fiziksel özellikleri .....	97
<b>Tablo 4.31:</b> 4-6 ve 4-3 $\alpha$ -glukanotransferaz katkılı ve katkısız (kontrol) ekmek örneklerinin tekstürel özellikleri.....	100
<b>Tablo 4.32:</b> 4-6 ve 4-3 $\alpha$ -glukanotransferaz katkılı ve katkısız (kontrol) poğaçaya örneklerinin tekstürel özellikleri.....	101
<b>Tablo 4.33:</b> Kontrol ekmeği, 4.6 ve 4.3 enzim katkılı ekmeklerin GI değerleri.....	102
<b>Tablo 4.34:</b> Poğaçaya, 4.6 ve 4.3 enzim katkılı poğaçaların GI değerleri .....	102

## SEMBOL LİSTESİ

<b>GH</b>	: Glikozid Hidrolaz
<b>GS</b>	: Glukan Sükraz
<b>GT</b>	: Glukanotransferaz
<b>LAB</b>	: Laktik Asit Bakterisi
<b>EPS</b>	: Ekzopolisakkarit
<b>HV</b>	: Hamur Verimi
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>IMMP</b>	: İzomalto/malto-polisakkarit
<b>IMO</b>	: İzomaltooligosakkarit
<b>GI</b>	: Glisemik İndeks
<b>KOB</b>	: Koloni Oluşturan Birim

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle her türlü desteği sağlayan yol göstericim olan değerli hocam Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK'e, tez izleme komitesi toplantılarında bilgi ve tecrübeleriyle ışık tutan Prof. Dr. Sebahattin NAS ve Prof. Dr. Enes Dertli'ye teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında laboratuvar imkanlarından faydalandığım Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na, ihtiyaç duyduğum her anda desteğini esirgemeyen başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Sami Gökhan ÖZKAL olmak üzere tüm bölüm hocalarımıza teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında verdikleri destekten dolayı Dr. Öğr. Üyesi Furkan DEMİRGÜL ve Yüksek Gıda Müh. Ece ÇETİN'e bu zamana kadar beni hep destekleyen, bugüne gelmem için pek çok fedakarlık gösteren annem Gönül, babam Kenan ZEHİR'e, canımın içi kardeşlerim ve sevgili eşim İbrahim ŞENTÜRK'e teşekkürlerimi sunuyorum.

# 1. GİRİŞ

Nişasta; doğada oldukça yaygın bulunan, toksik olmayan ve diyetimiz için de uygun temel karbonhidrat kaynaklarından biridir. Bileşim olarak amilopektin (%70-80) ve amilozdan (%20-30) oluşan bu biyopolimer temel olarak tahıllardan (mısır, buğday, pirinç, sorgum, arpa), yumrularından (patates ve manyok) ve yeşil meyvelerden (muz) elde edilmektedir. Bitkilerden elde edilen nişasta doğal nişasta olarak kabul edilir ve bu nişastaların büyük bir kısmı yüksek glisemik indeksleri (GI) nedeniyle sindirim ve besin değeri açısından sorun teşkil etmektedir. Gastrointestinal kanaldaki hidroliz hızına göre nişastalar  tre ayrılabilir; hızlı sindirilebilen nişasta (RDS), yavaş sindirilebilen nişasta (SDS) ve dirençli nişasta (RS). RDS tüketimini takiben 20 dakika içinde glikoz moleküllerine dönüştürülen bir nişasta türüdür ve kana glikoz salınımı (kan şekerini) hızla yükseltir. Yavaş sindirilebilen nişasta sindirimi uzun süren ve ince bağırsakta tamamen sindirilen nişastadır. Dirençli nişasta ise GI sistemde  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukosidaz gibi  $\alpha$ -hidrolitik enzimler tarafından sindirilemezken; bir fraksiyonu kolondaki mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilir.

Her ne kadar doğal nişasta maliyetinin düşük olması, kolay bulunabilirliği, yenilenebilirliği, biyo parçalanabilir olması gibi olumlu özelliklere sahip olsa da yüksek GI özelliğine ek olarak suda znrlğnn düşük olması, hızlı retrogradasyon, sineresis, zayıf termal özellikler, mekanik stres ve asite karşı düşük direnç gibi nitelikleri de ticari alanda kullanımını sınırlandırmaktadır. Nişastanın istenen fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini kazanması, yeni fonksiyonel özellikler edinebilmesi ve endüstriyel alana uygunluğunun geliştirilmesi için modifikasyonu kaçınılmazdır. Başlıca modifikasyon metotları arasında yer alan kimyasal, fiziksel ve biyoteknolojik yaklaşımların biri veya birkaçı kullanılarak nişastanın kusurları giderilerek yeni gluklan yapıları retilenmektedir ve bu şekilde dönüşüme ğratılmış nişasta modifiye nişasta olarak adlandırılmaktadır.

Bu modifikasyon yöntemleri arasında özellikle tüketicilerin temiz içerikli ürün taleplerini karşılamak ve evre sağlığını olumsuz etkileyecek atık veya yan ürün



oluşumunu engellemek amacıyla biyoteknolojik yaklaşımlar dikkat çekmektedir. Bu biyoteknolojik metotlardan biri de enzim kullanımıdır.

Yakın zamanda çeşitli bakteriler tarafından üretilen 4,3 ve 4,6 alfa glukanoferaz enzimlerinin tespit edilmesi, bu enzimlerin biyolojik ve teknolojik rolünün anlaşılması bakımından dikkat çekmiştir. Laktik asit bakterileri tarafından da üretilen bu enzimler orantısızlaştırma reaksiyonlarıyla  $\alpha$ -(1,4) glikozidik bağ içeren amiloz ve nişasta gibi polimerleri düz ve/veya dallanmış forma getirerek çok çeşitli yapıda  $\alpha$ -glukan oluşturabilmektedir. Bu şekilde substrat olarak kullandığı polimere gerek işlenebilirlik gerekse de sağlığımız üzerine katkı sağlayacak fonksiyonel özellikler kazandırarak çeşitli alanlarda kullanım imkanı sağlamaktadır. Özellikle fırıncılık sektöründe ekmek üretiminde bu enzimleri üreten mikroorganizmaların starter kültür olarak kullanımı veya bakteriler tarafından üretilen enzimlerin ekmek üretiminde katkı olarak kullanımı çevre dostu bir yaklaşımla tüketicilere yeni ürünler sunacaktır. Bu durum hem ürün çeşitliliğini artırır hem de tüketicilere daha sağlıklı seçenekler sunmanın yanında ürün raf ömrünü ve duysal profilini iyileştirme gibi olumlu katkılarda sağlayarak gıda endüstrisine sürdürülebilir ve yenilikçi çözümler sunabilir.

Laktik asit bakterileri fermente gıdaların fermantasyon mikrobiotasında rol alan mikroorganizmalardır. LAB'ler fermente gıdaların fizikokimyasal özellikler ve kalitesi üzerine etkisi bulunmaktadır. Bazı LAB'lerin glukanoferaz enzimlerinin biyolojik ve fiziksel özelliklerine etkisi veya bu enzimlerin LAB fizyolojisindeki rolü henüz bilinmemektedir.

## **1.1 Tezin Amacı**

Yakın zamanda keşfedilen 4,3 ve 4,6  $\alpha$ -glukanoferaz enzimlerinin kristal yapısı ve karakterizasyonu çeşitli çalışmalar ışığında aydınlatılmaktadır. Oysa ki; enzimin hücredeki fizyolojik rolü ve gıda sistemi gibi kompleks bir ekosistemdeki fonksiyonu henüz tam olarak anlayamamıştır. Bu doğrultuda bu tez çalışmasının amacı;

- 1) 4,3 ve 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz üreticisi bakteri şuslarının ekşi hamur ortamında *in situ* kullanımı ile ekşi hamur fermantasyonunda biyoçeşitlilik üzerine etkisini incelemek.
- 2) 4,3 ve 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz üreticisi bakteriyel suşların ekşi hamur üretiminde starter olarak kullanımının fırıncılık sektörüne kazandırabileceği işlenebilirlik özelliklerini, duyuusal kabul edilebilirliğini ve GI değerlerini belirlemek
- 3) 4,3 ve 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz preparatların ekmek ve poğaçta üretiminde katkı maddesi olarak kullanılması ve kalite özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi ile enzimin floradaki rolünün anlaşılması ve endüstriyel kullanımına ışık tutmaktır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Laktik Asit Bakteri Glukonotransferazlarının Yapısal ve Biyokimyasal Özellikleri

#### 2.1.1 Laktik Asit Bakterilerinin Genel Taksonomik Özellikleri

Laktik Asit Bakterileri (LAB) Gram pozitif, düşük pH'ya dirençli, spor oluşturmeyen, katalaz negatif, genellikle hareketsiz, düşük guanin + sitozin içeren kok, kokobasil ya da çubuk şeklinde morfoloji gösterebilen, aerotolerant anaerob bakterilerdir. Karbonhidratları tek veya ana enerji kaynağı olarak kullanır ve metabolizması sonucunda da büyük oranda laktik asit oluştururlar (Mozzi 2016; Wang ve diğ. 2021).

LAB'lerin ilk sınıflandırması, *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Tetracoccus* ve *Microbacterium* cinsleri şeklinde 1919 yılında Orla-Jensen tarafından gerçekleştirilmiştir (Orla –Jensen 1919). Mevcut sınıflandırmaya göre LAB'leri; *Firmicutes* filumu, *Bacilli* sınıfı, *Lactobacillales* takımına ve *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* ve *Streptococcaceae* ailelerinde bulunur (Ruiz-Rodríguez ve diğ. 2017). LAB'nin *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* gibi dört temel cinsi tanımlanmıştır. Ancak daha sonraki taksonomik revizyonlar *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* olarak yeni cinsleri içermektedir (Mozzi 2016).

*Lactobacillus* cinsine 250'den fazla tür atanmıştır. Günümüzde Dünya'nın farklı ülkelerini içinde barındıran araştırma grupları tarafından *Lactobacillus* türlerini, 23'ü yeni cins olmak üzere 25 cins halinde yeniden sınıflandırmıştır. Alt grupları; *Lactobacillus delbrueckii* ve *Paralactobacillus*'lar ile (daha önceden var olan) yeni gruplar *Acetilactobacillus*, *Agriactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*,

*Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* ve *Secundilactobacillus*'dur (Zheng ve diğ. 2020).

Laktik asit bakterileri içerisinde gıda fermantasyonu açısından önemli cins üyeler *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Weissella* olarak karşımıza çıkmaktadır (Wang ve diğ. 2021).

Fermente ürünlerde geniş kullanımları ve insan tüketiminde güvenli uzun geçmişi nedeniyle çoğu LAB, Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilen (GRAS) veya nitelikli güvenlik karinesi (QPS) statüsüne sahiptir. *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve bazı *Streptococcus* türleri GRAS olarak yer alır (Coelho ve diğ. 2022). Bununla beraber *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Carnobacterium* cinslerine ait birkaç tür patojen olabilir ve GRAS olarak uygun değildir (Mozzi 2016). Ayrıca *Enterococcus* cinsinin hiçbir üyesi virülans faktörlerinden ve çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlerinden dolayı QPS statüsü için önerilmemektedir (Coelho ve diğ. 2022).

## **2.1.2 Laktik Asit Bakterilerinde Şeker Katabolizması**

Laktik asit bakterileri önemli bir metaboliti olan laktik asiti (LA) heksoz ve pentoz gibi şekerlerin anaerobik fermantasyonu ile üretir (Abedi ve Hashemi 2020, Bangar ve diğ. 2022). Burada LA üretim verimliliği; sıcaklık (5 – 45 °C), pH (3,5–9,6), ihtiyaç duyulan besinlerin varlığı (amino asitler, peptidler, nükleotidler, vitaminler vb.) ve LAB türüne bağlıdır. LAB; enerji üretimi ve metabolizmalarını sürdürmek için genellikle glikoz kullanırlar. Buna ek olarak LAB'nin kullanabileceği fruktoz, mannoz ve galaktoz gibi başka heksozlar da vardır (Bangar ve diğ. 2022).

### **2.1.2.1 Homofermentatif Katabolizma**

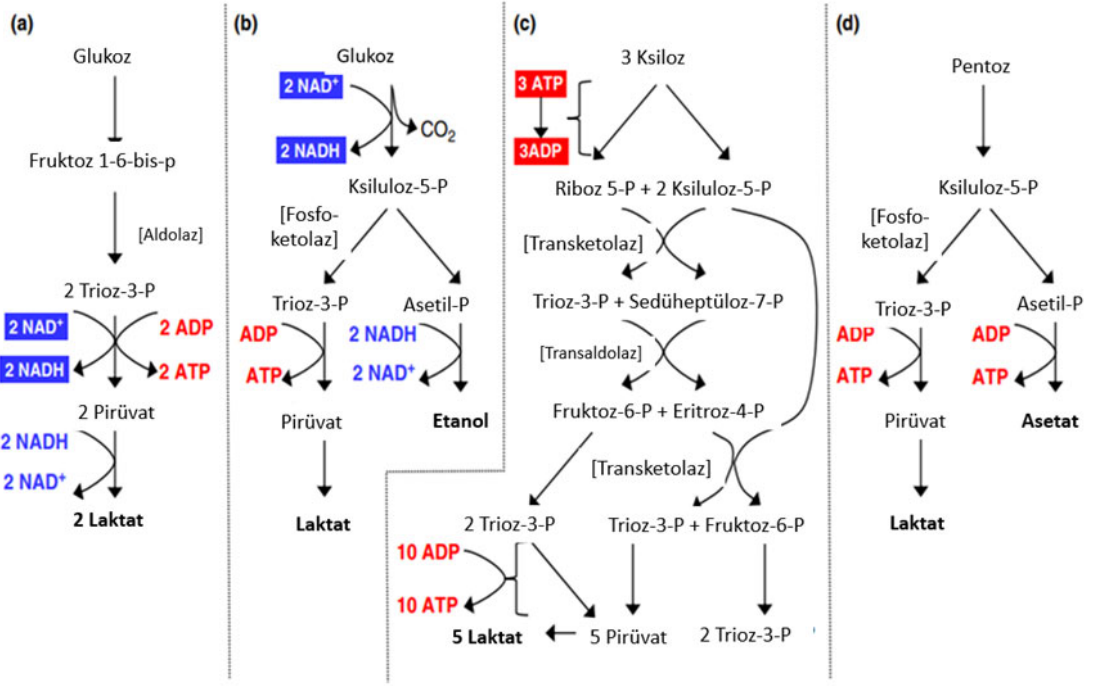
Bu katabolizmaya sahip LAB'lar, aldolaz enzimine sahiptir ve glikozu çok büyük oranda (%90-95) laktik asite dönüştürebilir. Homofermentatif LAB genellikle

Embden-Meyerhof Parnas yoluyla (glikoliz yolu ve pentoz fosfat yolunu kullanarak) heksoz ve pentoz şekerleri kullanır ve tüketilen bir mol glikoza karşılık ana son ürün olarak iki laktik asit molekülü üretir (Şekil 2.1). *Companilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Latilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* ve bazı *Lactobacillus*'lar (*Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus helveticus* gibi) homofermentatif LAB'ını içerir (Abedi ve Hashemi 2020; Muñoz ve diğ. 2011; Oshiro ve diğ. 2021). Ortam sıcaklığı, pH, O<sub>2</sub> miktarı, CO<sub>2</sub>'e bağlı olarak üretilen yan ürünlerin (süksinik, malik veya diğer organik asitler, alkoller ve aromatik maddeler) miktarı değişebilmektedir (Gunkova ve diğ. 2021).

### 2.1.2.2 Heterofermentatif Katabolizma

Bu grup LAB'leri glikozu LA, asetik asit (AA), format, etanol, diasetil, asetoin ve CO<sub>2</sub>'e metabolize edebilir. Heterofermentatif LAB, heksozları metabolize ederken fosfoglukonat yolunu ve pentoz şekerlerini metabolize ederken ise fosfoketolaz yolunu kullanabilir (Şekil 2.1) (Abedi ve Hashemi 2020; Muñoz ve diğ. 2011).

Homo ve heterofermentatif reaksiyonu birbirinden ayıran temelde früktoz-difosfat aldolazın homofermentatif LAB'de varlığıdır.



**Şekil 2.1:** Laktik asit bakterilerinde şeker katabolizma yolları a) Emden Meyerhoff Parnas Yoluyla heksozların homofermentatif metabolizması. (b) Heksozların fosfoketolaz yolu yoluyla heterofermentatif metabolizması. (c) Pentozların pentoz fosfat yolu yoluyla homofermentatif metabolizması. (d) Fosfoketolaz yolu yoluyla pentozların heterofermentatif metabolizması (Gänzle 2015).

Şeker katabolizmasında kullanılan enzimlerin sistematığıne göre LAB'ler üç grupta sınıflandırılmıştır:

**Kesin homofermentatif LAB;** EMP yolu kullanan bu grup mikroorganizmalar fruktoz –difosfat aldolaz enzimine sahiptirler.

**Fakültatif heterofermentatif LAB;** 2 dehidrogenaz, glikoz-6P-dehidrogenaz ve 6-P glukonat dehidrogenaz enzimlerini içerir. Pentoz fosfat yolunu izleyerek şeker fermantasyonu tamamlanır.

**Fakültatif homofermentatif LAB;** *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Latilactobacillus curvatus*, *Latilactobacillus sakei* gibi laktobasiller früktoz-difosfat-aldolaz enzimi ile heksozları laktik asite; indüklenebilir 6-fosfoglukonat/fosfoketolaz yolu ile de pentozları laktik ve asetik asite fermente eder (Kılıç 2014).

Zorunlu heterofermentatif LAB, şekerleri 6 fosfoglukonik asit/fosfoketolaz yolu yoluyla fermente ederken; *Companilactobacillus alimentarius*, *Lacp. plantarum*, *Lacc. casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus pentosus* ve *Lactobacillus xylosus* gibi fakültatif heterofermentatif türler heksozları homolaktik yol ve pentozları da heterolaktik yolla fermente ederler. Pentozların katabolizması pentoz fosfat yolunun metabolik ara maddelerine dönüştürüldüğü ek dönüşüm adımları gerektirir (Martinez ve diğ. 2013).

*Levilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* ve bazı *Lactobacillus* spp. cinsleri heterofermentatif olabilir ve bununla beraber *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum* ve *Limosilactobacillus reuteri* türleri mutlak heterofermentatiflerdir (Abedi ve Hashemi 2020; Muñoz ve diğ. 2011; Oshiro ve diğ. 2021).

LAB tam bir trikarboksilik asit (TCA) enzimlerine sahip olmadığından, üretilen piruvat, asetat, asetoin, laktat ve/veya etanole dönüştürülür ve metabolik bir son ürün olarak hücrelerden uzaklaştırılır (Doi 2019). Glikoza ek olarak heksozlar (mannoz, fruktoz ve galaktoz) izomerizasyon ve/veya fosforilasyondan sonra fermente edilebilirler (König ve Fröhlich 2017).

LAB'ler şekerin yanı sıra sitrat, laktat ve malat gibi organik asitlerden, arjinin ve glutamin gibi amino asitlerden ve gliserolden çeşitli metabolik yollar aracılığıyla piruvat ve/veya ATP üretebilir (Doi 2019). Glikoz metabolizması sonucu elde edilen laktat verimi (teorikte) EMP, pentoz fosfat (PP) ve fosfoketolaz yolları (PK) için sırasıyla 2, 1,67 ve 1 mol'dür. Ksilozdan laktat verimi ise PP yolunda 1,67 ve PK da ise 1 moldür (Eiteman ve Ramalingam 2015). Laktoz ve galaktozun Leloir yoluyla katabolizması *Lactococcus garvieae* ATCC 49156, *Lc. lactis* IL 1403, *Lc. lactis* SK11, *Lc. lactis* MG1363 (Fortina ve diğ. 2009), *Lc. lactis* ATCC 7962 (Vaughan ve diğ. 1998), *Lb. helveticus* ATCC 15009T (Fortina ve diğ. 2003), *Streptococcus thermophilus* (Anbukkarasi ve diğ. 2014) için tespit edilmiştir. Rozhkova ve diğ. (2023) *Lacticaseibacillus paracasei* ABK Leloir yoluyla Tagatoz-6P yolu kombinasyonu ve *Lb. helveticus* H9 tarafından tek bir Leloir yoluyla metabolize edildiği gösterilmiştir. Bununla beraber; *Lacc. casei* (Wu ve Shah 2017), *Lacc. rhamnosus*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*

ve *Streptococcus mutans* laktozu Tagatoz-6P yoluyla katabolize eder (Wu ve diğ. 2015, Iskandar ve diğ. 2019).

Karbonhidratlara ait metabolik yolların, çevreye ve büyüme koşullarına bağlı olarak aynı mikrobiyal suş tarafından zaman içerisinde değiştirilebileceği unutulmamalıdır (El Fechtali ve diğ. 2023).

### **2.1.3 Laktik Asit Bakteri Kaynakları**

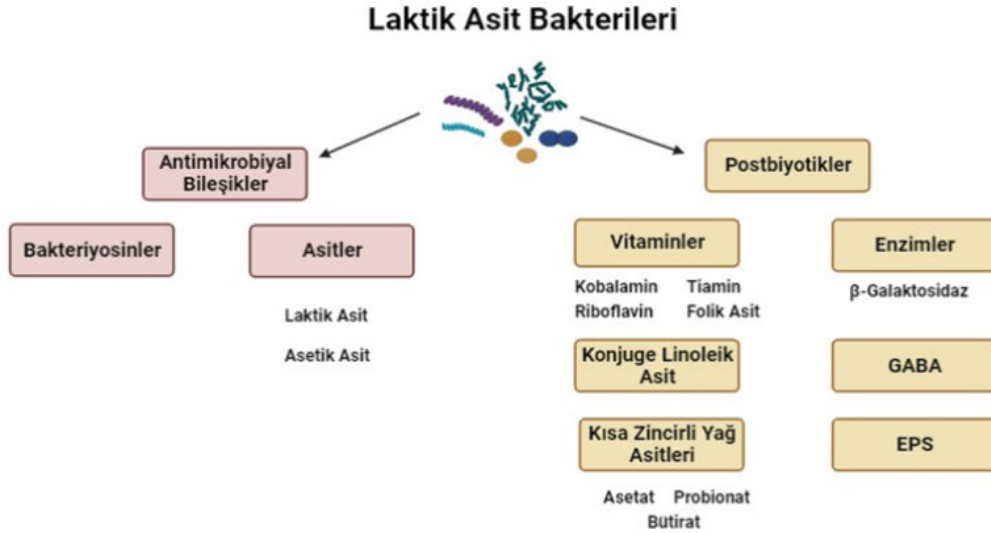
Uzun yıllardır varlıkları bilinen LAB'lar süt ve süt ürünleri, taze ya da işlenmiş etler, balık, tahıllar ve sebzeler de dahil olmak üzere tüm gıdalardan, yem, su, kanalizasyon ve toprağa kadar oldukça geniş bir kaynaktan bulunmaktadır. Bunlara ek olarak bazı LAB'lar insan ve hayvanların gastrointestinal ve ürogenital sistemlerinin doğal sakini iken bir kısmı da çeşitli ekstrem koşullara (yüksek tuz, alkollü içecek gibi) özel olarak adapte olmuş şekilde karşımıza çıkmaktadır (Mokoena ve diğ. 2021; Ayivi ve diğ. 2020; Teneva-Angelova ve diğ. 2018).

### **2.1.4 Laktik Asit Bakterilerinin Gıda Teknolojisi Açısından Önemi**

Laktik asit bakterileri; çeşitli olumsuz ortamlara toleransı, basit metabolizması ve çeşitli karbon kaynaklarını metabolize etme yeteneği ile endüstriyel alanda yaygın kullanım alanına sahiptir (Sun ve diğ 2014; Coelho ve diğ. 2022).

Laktik asit bakterileri ve/veya üretmiş oldukları ürünleri gıda sistemlerinde çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Temelde; doğrudan ve dolaylı (LA, konjuge linoleik asit, GABA, bakteriosin, reuterin ve reuterisiklin, ekzopolisakkarit (EPS), bioaktif peptit) kullanımı ile gıda sistemlerinde starter, destek, koruyucu ve probiyotik kültür olarak uygulamaları bulunmaktadır (Şekil 2.2).





**Şekil 2.2:** LAB'lerinin bazı fonksiyonel özellikleri ([BioRender.com](https://www.biorender.com) kullanılarak oluşturulmuştur)

#### 2.1.4.1 LAB'lerin Probiyotik Özellikleri

Probiyotik kısaca ; “Yeterli miktarlarda alındığında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Vijaykumar ve diğ. 2022). Yapılan pek çok çalışma probiyotiklerin insan sağlığını olumlu ve iyileştirici birçok etkide bulunduğu bilinmektedir. Bunlar arasında; konakçı bağışıklığının iyileştirilmesi, sindirimin düzenlenmesi başta olmak üzere birçok metabolik hastalıkların önlenmesinde faydalı olduğu gösterilmiştir potansiyel antioksidan yeteneğini, antimikrobiyal ve anti-tümör aktivitesini bildirmiştir (Feng ve diğ. 2023; Wang ve diğ. 2017; Han ve diğ. 2015).

Probiyotikler bağırsak mikrobiyotasının modifiye ederek konakçı sağlığına olumlu yönde katkı sağlamaktadır. Laktoz toleransının ve sindirimin iyileştirilmesi, mide-bağırsak enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisi, kolorektal kanserlerin önlenmesi, kan kolesterol düzeylerinde azalma ve zihinsel sağlığın iyileştirilmesi gibi törepatik fonksiyonları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Kobyliak ve diğ. 2016; Coelho ve diğ. 2022).

Fermente ürünlerin üretiminde veya bazı probiyotik yoğurtlarda olduğu gibi son ürüne fermantasyondan sonra probiyotik bakterilerin yeterli konsantrasyonda

aşılması yoluyla fonksiyonel gıda üretimi gerçekleştirilmektedir (Pereira ve diğ. 2023).

Gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan probiyotik laktobasil türleri *Lb. acidophilus*, *Lacp. plantarum*, *Lacc. rhamnosus*, *Lacc. paracasei*, *Lacc. casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Liml. reuteri*, *Liml. fermentum*, *Ligilactobacillus salivarius* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'tur.

Probiyotik LAB'lerin probiyotik özellikleri sağlamasındaki faktörlerden birisi de ekzopolisakkarit üretimleridir. Bu bakterilerin çok çeşitli EPS'leri üretebildikleri görülmüştür ve EPS'nin gastrointestinal geçiş sırasında probiyotiklerin hayatta kalması üzerine önemli bir katkısı vardır (Caggianiello ve diğ. 2016). EPS probiyotik bakterilerin üzerinde koruyucu bir tabaka oluşturarak onların asidik ve enzimatik stresin yanı sıra safra tuzları ve pankreas sularına karşı toleranslarını geliştirebilir ve dolayısıyla bağırsak kanalındaki hayatta kalmalarını sağlayabilir (Lu ve diğ. 2022; Werning ve diğ. 2022).

#### 2.1.4.2 Ekzopolisakkarit

LAB'ler çeşitli polisakkaritleri sentezleme yeteneğine sahiptir. Bu polimerler çeşitli yapılar, fonksiyonel özellikler ve biyolojik aktiviteler sergileyen, bir glikozidik bağ ile bağlanan monosakkarit birimlerinden oluşan büyük bir yüksek moleküler ağırlıklı molekül grubunu içerirler.

LAB, homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olmak üzere iki tip EPS sentezler. Homopolisakkaritler (HoPS)  $\beta$ -bağlantılı fruktoz ve  $\alpha/\beta$ -bağlantılı glikozdan oluşan fruktanlara ve glukanları oluşturur (Chen ve diğ. 2021). HoPS sentezi, spesifik bir GTaz (glukansükraz veya fruktansükraz) ve bir hücre dışı şeker donörünü (glukanların sentezi için sükroz) içeren nispeten basit bir biyokimyasal işlemdir. Heteropolisakkarit (HePS) sentezi, eps gen kümesi ve zorunlu genler (housekeeping) tarafından kodlanan çeşitli enzimlerin spesifik rolünü içeren karmaşık biyosentez sürecini kapsar (Nguyen ve diğ. 2020). HePS genellikle D-glikoz, D- galaktoz ve L-ramnozdan oluşur (De Vuyst ve De Vin 2007; Hidalgo-Cantabrana ve diğ. 2014).

LAB tarafından üretilen ekzopolisakkaritler; yüksek verimlilik, mükemmel reolojik ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle gıda sistemlerinde güvenli, besleyici ve fonksiyonel bir katkı maddesi olarak kullanılabilir (Tiwari ve diğ. 2021; Mazhar ve diğ. 2020; Lynch ve diğ. 2018). Ayrıca konakçı sağlığı üzerinde de olumlu etkileri bulunmaktadır. LAB-EPS, bağırsak bariyer fonksiyonunun ve bağırsak mukozal bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde rol oynar ve böylece konakçının bağışıklık tepkisini modüle eder (Yang ve diğ. 2023; Jurášková ve diğ. 2022).

### 2.1.5 *Limosilactobacillus reuteri*'nin Temel Özellikleri

*Limosilactobacillus reuteri* (*Liml. reuteri*) ilk kez 1962 yılında Gerhard Reuter tarafından insan bağırsak sisteminden izole edilmiştir (Jiang ve diğ. 2023). *Lactobacillaceae* ailesi içinde yer alan bu grup sınırlı oksijen varlığında gelişen, neredeyse tüm omurgalı ve memeli canlıların bağırsak sisteminde bulunan heterofermentatif türdür (Jiang ve diğ. 2023; Shi ve diğ. 2022; Mu ve diğ. 2018). İnsan gastrointestinal sistemi dışında üriner sistem, cilt ve anne sütü gibi mikrobiyotalarda da yer alabilmektedir (Abuqwider ve diğ. 2022; Alam ve diğ. 2022). Gastrointestinal sistemde asit-baz toleransı ve tutunma yeteneği ile kolonize olur ve hayatta kalır. Sahip olduğu bu mekanizma ile probiyotik özellik göstermektedir (Alam ve diğ. 2022; Mu ve diğ. 2018; Luo ve diğ. 2023). *Liml. reuteri* zorunlu heterofermentatif olup arabinoz, galaktoz, maltoz, melibiyoz, rafinoz, riboz ve sakkaroz gibi farklı birçok şekeri fermente etme yeteneğine sahiptir (Calasso ve Gobbetti 2011). Ayrıca patojen özellik göstermemesi ile Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA 2008) tarafından gastrointestinal sağlığı iyileştirmeye yönelik bir gıda takviyesi olarak kabul edilmiştir.

1980 yılından önce bu türün suşları *Liml. fermentum* Biyotip II olarak sınıflandırılmaktaydı. *Liml. reuteri*'nin bazı suşları poliketid yapıda antimikrobiyal bileşik reuterisiklin üretir. Tip suşun genom büyüklüğü 1,94 Mbp'dir. DNA'nın mol % G+C içeriği 38,6'dır. Kemirgenlerin, kuşların, domuzların ve diğer bağırsak mikrobiyotasının baskın üyeleri olarak izole edilmiştir. Ayrıca tahıl fermantasyonlarında, özellikle tip II ekşi hamurlardan da izole edilmektedir. Gıda izolatları bağırsak kökenlidir (Zheng ve diğ. 2020). *Liml. reuteri* bazı Gram pozitif bakteriler, Gram negatif bakteriler ve küflere karşı geniş spektrumlu antimikrobiyel aktivite gösteren reuterini sentezleyebilir (Shi ve diğ. 2022; Jiang ve diğ. 2023).

### 2.1.6 *Limosilactobacillus fermentum*'un Temel Özellikleri

*Liml. fermentum*, *Limosilactobacillus*'ta omurgalıların bağırsaklarına adapte olmayan tek türdür ve 1,90 Mbp büyüklüğünde genomu sahiptir. Bakterinin DNA'sının % G+C içeriği 52,4'tür. Doğal olarak fermente olmuş tahıllarda, fermente olan diğer bitki materyallerinde, bunlarla beraber süt ürünleri, gübre, kanalizasyon ve insan dışkı ve üreme organlarında yaygın olarak bulunmaktadır (Zheng ve diğ. 2020). Uluslararası sınıflandırmanın güncellenmesi ile *Limosilactobacillus fermentum* olarak yeniden adlandırılmıştır (Lv ve diğ. 2023).

Fermantasyon kabiliyeti nedeniyle bu ismi alan bakteri arabinoz, selobiyoz, galaktoz, maltoz, mannoz, melibiyoz, rafinoz, riboz, sakkaroz, trehaloz ve ksiloz gibi karbonhidratları kullanabilir ve zorunlu heterofermentattıftır. Çubuk şeklinde morfolojiye sahip olan *Liml. fermentum* 15 °C'de gelişemez fakat 45 °C'de çoğalabilmektedir (Eiteman ve diğ. 2015). İnsan ve hayvan gastrointestinal sisteminde yaşar ve safra asitlerine karşı direç gösterir (Phujumpa ve diğ. 2022; Ozen ve diğ. 2023; Sudeepa ve Bhavini 2020). Gerek gıda gerekse de yem olarak kullanım açısından GRAS olarak kabul edilmektedir ve *Liml. fermentum*'un gıdaların tekstür ve duyu özelliklerinde etkili olabilen EPS üretebildiği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (Sudeepa ve Bhavini 2020).

Probiyotik özelliği ile de bilinen bu bakteri, alkalın fosfataz, esteraz lipaz, lösin-aminopeptidaz, valin-aminopeptidaz, asit fosfataz, fosfohidrolaz,  $\alpha$ -galaktosidaz ve  $\beta$ -galaktosidaz enzim aktivitelerine ek olarak proteolitik aktivite de gösterir (Sudeepa ve Bhavini 2020; Park ve diğ. 2023).

### 2.1.7 Glukansükraz Enzimleri

Geleneksel olarak, Glikozid Hidrolaz (GH70) ailesi yalnızca glukoziltransferazlar (Gtfs) olarak da bilinen glukansükrazlar (GS), sakkarozu parçalayan ve sakkarozdan türetilmiş D-glikoz parçalarını polimerize ederek farklı boyut, kimyasal bağ ve dallanma derecelerine sahip  $\alpha$ -glukanları sentezleyen enzim grubu olarak tanımlanır. Dekstransükraz (EC 2.4.1.5), mutansükraz (EC 2.4.1.125),

alternansükraz (EC 2.4.1.-) ve reuteransükraz (EC 2.4.1.140) GS'nin bazı üyeleridir. GS'ler hücre duvarı enzimidir ve *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Streptococcus* ve *Oenococcus* dahil olmak üzere çeşitli LAB cinsleri tarafından salgılandığı bulunmuştur (Molina ve diğ. 2021; Chen ve diğ. 2021; André ve diğ. 2010). Birçok LAB, sadece tek bir glukansükraz sentezleyebilirken, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 gibi birden fazla GH70 ailesi enzimleri üreten suşlar da bulunmaktadır (Monchois ve diğ. 1998; Passerini ve diğ. 2015).

GS tarafından üretilen glukanlar esas olarak glikozidik bağlantı tiplerine göre dört kategoriye ayrılır ve bunlar;

- (i) (1 → 6) bağlı  $\alpha$ -D-glikoz birimleri içeren dekstran
- (ii) %50'den fazla (1 → 3) bağlı  $\alpha$ -D-glikoz birimleri içeren mutan
- (iii) Değişen (1 → 6) ve (1 → 3) bağlı  $\alpha$ -D-glikoz birimleri içeren alternan
- (iv) (1 → 4) bağlı  $\alpha$ -D-glikoz birimleri içeren reuterandır (Gangoiti ve diğ. 2018). Ana glukan formlarındaki değişiklikler, glukanların teknolojik ve fonksiyonel rollerini değiştirebilir (İspirli ve diğ. 2023).

CAZy sınıflandırma sistemine göre (<http://www.cazy.org>) GH70 ailesi, esas olarak nişasta üzerine etkili enzimleri içeren GH13 ve GH77 aileleriyle birlikte GH-H (alfa amilaz süper ailesi) klanını oluşturmaktadırlar (Sánchez ve diğ. 2019). Genel olarak tüm GH-H enzimleri evrimsel olarak ilişkilidir ve katalitik olarak önemli 4 korunmuş amino asit dizisi motifi ile katalitik bir  $(\beta/\alpha)_8$  kovan yapısını paylaşır (Gangoiti ve diğ. 2018).

GH70 enzimleri A, B, C, IV ve V olmak üzere beş farklı yapı halinde düzenlenmiştir. A, B ve C yapıları, GH13 ailesi enzimleriyle ilişkilidir, buna karşın IV ve V yapısal bölge, GH70'e özgü gruplardır. Bu enzimlerin katlanması özeldir ve C bölgesi dışındaki tüm yapılar, bir U dönüşü etrafında bir araya gelen bitişik olmayan dizi parçalardan oluşur (Vuillemin ve diğ. 2016).

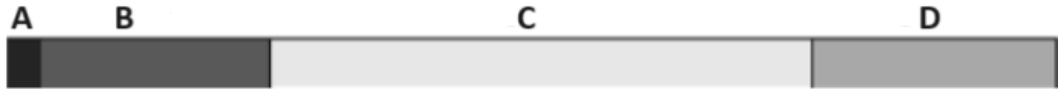
### 2.1.7.1 Glukansükraz Proteinlerinin Yapısı ve Etki Mekanizmaları

Amino asit homolojisi analizi; GS'lerin, ortalama molekül ağırlığının yaklaşık 160 kDa ve optimum pH ve sıcaklığının sırasıyla 5,0 – 6,0 ve 30 °C olmasıyla, glikozit

hidrolazların GH70 ailesi üyesi olduğunu göstermiştir. GS'ler 60 yıldan beri kapsamlı bir şekilde çalışılmasına rağmen, bu proteinlerin büyük moleküler ağırlığı yapısal karakterizasyonlarının aydınlatılmasını geciktirmiştir (Gangoiti ve diğ. 2018). Bununla birlikte, kriyoelektron mikroskobu teknolojisinin ortaya çıkışıyla birlikte, GS'nin protein yapısını yüksek çözünürlükte 3 boyutlu yapısını ve karakterizasyonunu aydınlatmaya yardımcı olmuştur (Yu ve diğ. 2022).

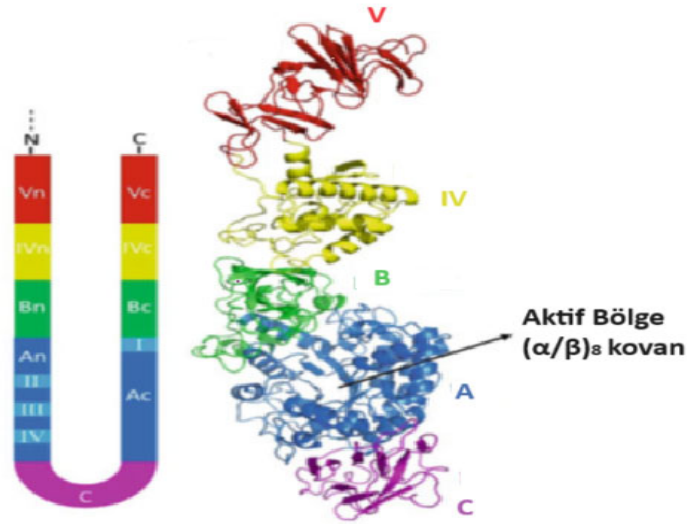
LAB'dan elde edilen GS'lerin amino asit dizi analizinin, ortak bir yapıyı işaret ettiği ve dört farklı bölgeden oluştuğunu göstermiştir (Şekil 2.3) :

- (i) A: Sinyal peptidi (SP) (36-40 amino asit)
- (ii) B: Farklı aminoasit tekrarlarını içeren N-terminal değişken bölge (200-700 amino asit)
- (iii) C: Oldukça korunmuş bir katalitik alan veya glikozidik bağ kataliz bölgesi
- (iv)D: Bir dizi tandem amino asit tekrardan oluşan bir C terminali glukan uzama kataliz bölgesi (Song ve diğ. 2016; Meng ve diğ. 2022).



**Şekil 2.3:** Glukansükrazın temel yapısı

GS'lerin kristal yapılarının keşfedilmesinden önce, katalitik mekanizmaları esasen; yapısal, evrimsel ve mekanik olarak GH70 ailesi enzimleriyle ilişkili olan GH13 enzimleriyle karşılaştırmalı çalışmalarla araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda (kristalizasyon için) N-terminal değişken bölgesi olmayan, ancak tam aktiviteyi koruyan enzimler kullanılmıştır. Bu kesilmiş GS'lerin polipeptit zincirlerinin, beş bölgeden (A, B, C, IV ve V) oluştuğu ve U şeklinde bir yol izlediğini tespit edilmiş (Şekil 2.4) ve C-A-B-IV-V bölgeleri olarak düzenlenmiştir (Yu ve diğ. 2022). A,B,IV ve V bölgelerinin her biri, hem N hem de C terminal iki süreksiz polipeptit zinciri tarafından oluşur. GH13 enzimlerinde de bulunan A, B ve C bölgeleri katalitik merkezi oluştururken, IV ve V sadece GH70 GS'lere özgüdür (Gangoiti ve diğ. 2018; Meng ve diğ. 2016).



**Şekil 2.4:** *Liml. reuteri*'den temsili GH70 dekstransukraz Gtf180-ΔN'nin kristal bölgesi ve yapısal organizasyonu (Chen ve diğ. 2021).

A bölgesi, katalitik üçlüye (nükleofil, genel asit/baz ve geçiş durumu stabilizatörü) sahip bir TIM veya  $(\beta/\alpha)_8$  kovanını içerir. A bölgesinde bulunan ve ilk olarak GH13 enzimlerinde tanımlanan korunmuş I-IV motifleri GS'lerde de mevcuttur. Bu motifler, katalitik kalıntıların yanı sıra diğer substrat bağlama kalıntılarını da içerir ve bireysel enzim spesifiklikleri için dizi parmak izleri olarak kabul edilir (van Hijum ve diğ. 2006; Janeček ve Gabriško 2016). Bu motiflerden I, A bölgesinin C terminal kısmında bulunur (Gangoiti ve diğ. 2018).

B yapısı, A'nın içinde substrat ve reseptörün bağlanma domainini oluşturmak için kullanılan bir  $Ca^{+2}$  bağlanma bölgesini oluşturur (Yu ve diğ. 2022). C bölgesi, sekiz iplikçikli beta tabakaları halinde düzenlenmiş tek bir bitişik bölümden oluşur. Bu bölgenin ailede yüksek oranda korunmuş olmasına rağmen işlevi henüz netlik kazanmamıştır (Molina ve diğ. 2021).

IV ve V ek bölgeler; IV'ün yapısı bilinen diğer proteinlerinkinden farklıdır ve yalnızca GH70 enzimlerinde bulunur. IV'ün kesin rolü belirsizdir ve V'e bağlı glukan zincirlerini katalitik bölgeye doğru veya bu bölgeden uzağa yönlendirerek glukan zincirlerinin büyümesini teşvik etmek için bir menteşe görevi gördüğü tahmin edilmektedir. V bölgesi zincirinin uzatılmasını veya dallanmasını kolaylaştırmak için polimer zincirinin yakalanmasına ve aktif bölgenin yakınında tutulmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu bölgenin kısmen veya tamamen kesilmesi, glukannın

bağlanma kapasitesini etkiler ve aynı zamanda sentezlenen polimerin boyutunu da değiştirir (Yu ve diğ. 2022). Nitekim *Liml. reuteri* 180 GTF180 glukansükraz enziminde V bölgesinin kesilmesi, katalitik olarak tamamen aktif, ancak polisakarit sentez kabiliyeti ciddi şekilde bozulmuş bir enzim üretimi ile sonuçlanmış ve büyük miktarda oligosakarit üretmiştir (Meng ve diğ. 2015).

GS'ler, bu 5 bölgeden 4'ünün (A, B, IV ve V) bitişik olmayan iki polipeptitten oluşmakta, C bölgesinin de alt kısımda "U-katlı" yapısı bulunmaktadır (Meng ve diğ. 2016; Gangoiti ve diğ. 2018). Bu özgül GS bölge organizasyonu, gen duplikasyonuna dayalı evrimsel bir yolla bir GH13 alfa-amilaz atasından ortaya çıktığı düşünülmektedir (Gangoiti ve diğ. 2018).

A ve B bölgelerinin rezidüleri, katalitik alt ünite ve alıcı substrat bağlanma alt ünitesine katkıda bulunurken, V bölgesi, polisakarit sentezi için önemli olan glukan zincirinin tutulmasında rol oynar (Li ve diğ. 2023).

GS'lerin aktif bölgesi (-1 alt bölge) cep şeklindedir ve yalnızca bir glukozil parçasını barındırabilir; bu durum her reaksiyon döngüsünde alıcı substrata yalnızca bir glukozil biriminin aktarıldığını gösterir. Glukan zincirinin tekrarlarını bağlanması ve uzaması, polisakarit ve oligosakarit senteziyle sonuçlanır (Li ve diğ. 2023).

GS'ler, amilosukrazilara benzer şekilde iki aspartik asit ve bir glutamik asitten oluşan üç amino asidin (katalitik üçlü) etkisi ile katalitik reaksiyonu gerçekleştirir (Sánchez ve diğ. 2019). Glukansükraz enzimine bağlı olarak, bağ özellikleri, boyutları ve dallanma dereceleri farklı çok çeşitli  $\alpha$ -D glukanlar üretilebilir (Li ve diğ. 2020).

### **2.1.8 Nişasta Üzerine Etkili Enzim Glukansükrazlar**

Nişasta, doğada en bol bulunan yenilebilir biyopolimerlerden biridir ve birçok yeşil bitkinin yapraklarında, tohumlarında, yumru ve köklerinde bulunur (Miao ve BeMiller 2023). İnsan diyetinde yaygın olarak kullanılan nişasta, diyet ile sağlanan enerjinin büyük bir kısmının kaynağıdır.

Nişasta bileşim olarak amilopektin (%70-80) ve amilozdan (%20-30) ayrıca düşük miktarda lipit ve protein gibi makromolekülden oluşmaktadır (Xu ve diğ. 2016). Amiloz  $\alpha$ -1,4-bağlı glikoz zincirleri ile çok az miktarda  $\alpha$ -1,6-bağlı dallanma bölgesi



içeren kısımdır. Amilopektin ise yaklaşık olarak her 22 glikoz ünitesinde bir  $\alpha$ -1,6-bağlı dallanma noktalarıyla birleştirilmiş  $\alpha$ -1,4-bağlı glikoz zincirlerine sahip oldukça dallanmış yapıdadır ve nişastadaki ana polimer olarak nişastanın yarı kristalli granül matrisinden sorumludur (Adewale ve diğ. 2022; Seung 2020). Nişastayı amilozun amilopektine oranına göre üç gruba ayırabiliriz. Bu oran %15'in altında ise düşük amiloz (mumsu), %16-35 ise normal ve %36'yı aştığında ise yüksek amiloz olarak tanımlanır (Petrova ve diğ. 2013).

Nişasta; gıda sanayinde jelleştirici, kıvam arttırıcı, emülgatör, enkapsülasyon ajanı ve bağlayıcı özellikleriyle fonksiyonel bir bileşen olarak geniş kullanım alanı bulmuştur (Bangar ve diğ. 2022). Ayrıca kağıt sanayi, tekstil, yapıştırıcı, ilaç, kimya ve kozmetik endüstrilerinde de çeşitli özellikleri ile kullanım imkanı sunmaktadır (Miao ve BeMiller 2023).

Her ne kadar doğal nişasta maliyetinin düşük olması, kolay bulunabilirliği, yenilenebilirliği, biyoparçalanabilir olması gibi olumlu özelliklere sahip olsa da suda çözünürlüğünün düşük olması, hızlı retrogradasyon, sineresis, zayıf termal özellikler, mekanik stres ve asite karşı düşük direnç gibi nitelikleri ticari alanda kullanımını sınırlandırmaktadır. Nişastanın istenen fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini kazanması, yeni fonksiyonel özellikler edinebilmesi ve endüstriyel alana uygunluğunun geliştirilmesi için modifikasyonu kaçınılmazdır (Adewale ve diğ. 2022; Bangar ve diğ. 2022; Chen ve diğ. 2023). Başlıca modifikasyon metotları arasında yer alan kimyasal, fiziksel ve biyoteknolojik yaklaşımların biri veya birkaçı kullanılarak nişastanın kusurları giderilerek yeni glukan yapıları üretilebilmektedir (Bangar ve diğ. 2022; Miao ve BeMiller 2023; Chen ve diğ. 2023; Yang ve diğ. 2021). Bu modifikasyon yöntemleri arasında özellikle tüketicilerin temiz içerikli ürün taleplerini karşılamak ve çevre sağlığını olumsuz etkileyecek atık veya yan ürün oluşumunu engellemek amacıyla biyoteknolojik yaklaşımlar dikkat çekmektedir (Chen ve diğ. 2023; Kralj ve diğ. 2011). Bu biyoteknolojik metotlardan biri de enzimlerin kullanımınıdır. Bu enzimler çeşitli bakteri, maya ve arke tarafından üretilmektedir ve GH13, 57, 70 ve 77 aileleri (<http://www.cazy.org/>) içinde yaygın olarak bulunmaktadır (Miao ve BeMiller 2023).

GH70 başlangıçta sükrozdan çeşitli tipte glukozidik bağ içeren  $\alpha$ -glukanların sentezini katalize eden ve sadece LAB'de bulunan glukansükraz (GS) enzimlerini

temsil etmekteydi. Yakın geçmişte *Liml. reuteri* 121 genomunda glukansükraz kodlayan *gtfA* geninin yukarısında, ikinci bir glukansükraz benzeri enzim kodlayan *gtfB* geni varlığı tespit edilmiştir (GtfA'ya %46 özdeşlik). GtfB sükröz varlığında aktif değildir ve substrat olarak malto-oligosakaritleri (MOS) kullanır (Kralj ve diğ. 2011). Çoğunlukla MOS substratlarındaki  $\alpha$ -(1,4) bağlantılı glikozil birimlerini hidroliz eder ve bunları doğrusal yapıda  $\alpha$ -(1,6) bağlantıları oluşturarak, alıcı MOS'un indirgeyici olmayan ucuna aktarır (Meng ve diğ. 2018). *Lactobacillus* suşlarından elde edilen bu tür iki enzim daha sonra, GtfW ve GtfML4, karakterize edilmiştir (Leemhuis ve diğ. 2013). GtfB benzeri 4,6-a-GT'ler, glukansükraz enzimleriyle yüksek homolojiyi gösterirler ve  $(\beta/\alpha)_8$  kovan yapısına ayrıca; II-III-IV-I şeklinde korunmuş motif sıralamasına sahiptirler (Meng ve diğ. 2018).

Bu enzimler lineer  $\alpha$ -1,4-glukan zincirlerini lineer izomalto/malto-oligosakaritlere veya a-1,4/a-1,6 veya a-1,3/a-1,4 bağlantılarına sahip dallanmış polimerlere dönüştürebilirler (Xiang ve diğ. 2021).

### 2.1.8.1 Glukanotransferaz Enzimlerinin Sınıflandırılması

Bakteriyel köken, reaksiyon ve ürün spesifikliği ve yapısal organizasyonu bakımından farklılık gösteren ve GH70 homoloji motifleri I-IV'deki anahtar amino asit kalıntılarının varyasyonlarını sergileyen üç alt aile tanımlanmıştır: GtfB, GtfC ve GtfD (Pijning ve diğ. 2021). Bu enzimlerin sakaroza karşı etkisiz olduğu ancak maltodekstrin/nişasta benzeri substratlar üzerinde önemli hidrolaz/transglukosilaz aktivitesi gösterdiği keşfedilmiştir (Dong ve diğ. 2024<sup>a</sup>). Alt aileler; GH70 glukan sükrazları, GH13 ve GH77 enzim aileleri ile birlikte GH-H klanında yer almışlardır. GH-H klanı oluşturan enzim gruplarının ortak özelliği  $(\beta/\alpha)_8$  kovan yapısı kullanarak  $\alpha$ -glikozidik bağı kırması, katalitik alanda bir N terminal ve/veya C-terminal içermesidir (Bai ve diğ. 2017). Nişasta üzerine etkili bu GS enzimleri yapısal olarak sükröz etkili GS enzimlerine ve işlevsel olarak da nişasta etkili  $\alpha$ -amilazlara benzer olduğundan, bunlar GH70 ailesi GS enzimleri ve GH13 ailesi a-amilazlar arasındaki evrimsel ara ürünler olarak kabul edilmiştir. Özellikle GH13'ün alt enzim ailesi 5' maltooligosakarit (GH13\_5) etkili alfa amilaz enzimleriyle yakından ilişkili olduğu ve bu enzimlerden evrimleştiğini söylenebilir (Bai ve diğ. 2017; Meng ve diğ. 2016; Gangoiti ve diğ. 2018).

*Fructilactobacillus sanfranciscensis* Gs2'den karakterize edilen GtfB tipi  $\alpha$ -glukanotransferaz; nişasta benzeri substratlardaki  $\alpha$ -(1,4) bağlarını hidrolize edebilen ve esasen dallanmış  $\alpha$ -(1-4,6) bağlantıları sentezleyebilir. Düşük moleküler kütleli, kısa kümelenmiş, dallanmış  $\alpha$ -glukanlar üreten enzim bağ spesifikliğı açısından GH13 ailesinin dallanan enzimlerine daha çok benzer yapı sergilemektedir. Bu bulgu GtfB alt ailesinin, GH13 ailesinden  $\alpha$ -amilazlar ile GH70 ailesinden glukansükrazlar arasında evrimsel ara madde olarak hizmet ettiğini destekleyebilir (Dong ve diğ. 2024<sup>b</sup>).

GtfC ve GtfD enzimleri B bölgeye IV yapısı eklenmiş GH13 tipi alan organizasyonunu gösterir (Gangoiti ve diğ. 2017<sup>a,b</sup>). GtfC ve GtfD proteinleri sırasıyla ilk defa *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 ve *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003'da tanımlanmıştır. Şimdiye kadar keşfedilen GtfC benzeri 4,6- $\alpha$ -GTazlar, üç bakteri cinsiyle sınırlıdır ve bunlar; *Bacillales* takımına ait *Exiguobacterium*, *Bacillus* ve *Geobacillus*'dur (Gangoiti ve diğ. 2017<sup>b</sup>).

*E. sibiricum* 255-15, -5 °C'den 39 °C'ye kadar gelişebilen, 3 milyon yıllık Sibiryâ permafrostundan izole edilen, spor oluşturmayan, Gram pozitif, psikrotrofik bakteridir. Bu bakteriden elde edilen enzimin korunmuş motifleri I-II-III ve IV sıralamasında taşır, dairesel olarak değişen ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> yapısına sahip değildir ve bölge V'i içermez. Bu özellikleriyle GH13 aile enzimlerine yapısal organizasyonunun benzediğı bulunmuştur. GtfC, MOS ve amiloz-V üzerinde etki ederek  $\alpha$ -(1,4)'ün yanı sıra  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağları da içeren linear yapıda glikooligomerler sentezlemiştir. GtfC enzimleri, LAB dışında GH70 enzim ailesindeki ilk örneğini temsil eder (Gangoiti ve diğ. 2016<sup>a</sup>).

Pijning ve diğ. tarafından (2022) *Geobacillus* 12AMOR1 tarafından üretilen GtfC (GbGtfC)'nin kristal yapısı bulunmuştur. Daha önceki GtfC'den farklı olarak değişen  $\alpha$ -(1,4)/ $\alpha$ -(1,6) bağlantılarını oluşturduğu tespit edilmiş ve nişasta sanayinde kullanılabileceğı düşünülmüştür.

Gram negatif bir bakteri olan *A. chroococcum* NCIMB 8003'den elde edilen enzim, GtfD olarak adlandırılmıştır ve substrat olarak maltodekstrinler ve nişasta kullanılması açısından 4,6  $\alpha$ -glukanotransferazlara benzediğı tespit edilmiştir. Bu enzim amilozdan alternatif  $\alpha$ -(1,4) ve  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağlara sahip, yüksek moleküler kütleli ve nispeten yüksek oranda dallanmış  $\alpha$ -glukan sentezini katalizler.

Sentezlenen bu ürün ardışık  $\alpha$ -(1,6) bağlantılar içermez bu yönüyle *Liml. reuteri* 121 GtfB tarafından sentezlenen IMMP ve *E. sibiricum* GtfC tarafından sentezlenen IMMO'dan oldukça farklıdır (Gangoiti ve diğ. 2016<sup>a,b</sup>).

GtfD enzim alt grubu sadece Gram negatif bakterilerde değil aynı zamanda Gram pozitif bakterilerde de tespit edilmiştir. Bu durum da GtfD'yi kodlayan genlerin yatay transfer yoluyla elde edildiğini düşündürmektedir. Örneğin; Gram pozitif *Paenibacillus beijingensis* GtfD'nin alan organizasyonu, GH13 ve GH70 aileleri arasında yapısal anlamda evrimsel ara ürünler olarak kabul edilen *E. sibiricum* GtfC ve *A. chroococcum* GtfD enzimlerine benzemektedir. *P. beijingensis* DSM 24997 GtfD tarafından yüksek moleküler kütleli (27 MDa) ve düşük moleküler kütleli (19 kDa) olan iki tane reuteran benzeri polimer sentezi gerçekleştirilmiştir (Gangoiti ve diğ. 2017<sup>b</sup>).

Yalnızca LAB'de bulunan GtfB tipi  $\alpha$ -glukanotransferazlar, GS'lerle %45–50 dizi benzerliğine sahiptir (Pijning ve diğ. 2021). Biyokimyasal olarak her ne kadar GtfB ve GtfC enzimleri birbiriyle ilişkili olsa da, filogenetik olarak sadece %30 dizi özdeşliği sergileyen farklı GH70 alt ailelerini oluştururlar. GtfB tipi enzimler büyük ölçüde GS enzimleri ile aynı yapısal organizasyona sahip olmasına rağmen (alfa-amilaz alanları A, B ve C ile ilave bölgeler IV ve V), GtfC tipi enzim bu bölgelerin sırasına göre farklılık gösterir ve bölge V'i de içermezler. Ayrıca; GtfC'de, GH-H klanının I'den IV'e kadar korunmuş bölgelerinin sırası, GH13'teki (I-II-III-IV) ile aynıdır; ancak  $(\beta/\alpha)_8$  kovanın dairesel bir permütasyon olmaması nedeniyle GH70'dekinden (II-III-IV-I) farklıdır (Gangoiti ve diğ. 2016<sup>a,b</sup>).

GtfB tip enzimlerden ilk karakterize edilen enzim *Liml. reuteri* 121'den (Lr121 GtfB) GtfB'dir. Doğrusal izomalto-/malto-polisakaritlerin (IMMP) sentezlenmesinden sorumlu bu enzim, amilopektin üzerinde çok aktif değildir (Leemhuis ve diğ. 2013). Daha sonra farklı suşlardan GtfB enzimi karakterize edilmiştir. Bunlar *Liml. reuteri*'den Lr GtfW, Lr GtfML1 (Leemhuis ve diğ. 2013), Lr2613 GtfB (Gangoiti ve diğ. 2017<sup>c</sup>) ve LrE81 GtfB (İspirli ve diğ. 2019), *Ligilactobacillus aviarius* subsp. *aviarius* DSM 20655'den La GtfX ve La GtfY (Meng ve diğ. 2018), *S. thermophilus*'tan St GtfB (Li ve diğ. 2018) ve *Liml. fermentum*'dan Lf2970 GtfB (Gangoiti ve diğ. 2017<sup>a</sup>) ve LfNCC 3057 GtfB'dir (Rao ve diğ. 2023).

Tablo 2.1’de görüldüğü üzere GtfB enzimleri tarafından oluşturulan ürünleri 3 gruba ayırabiliriz.

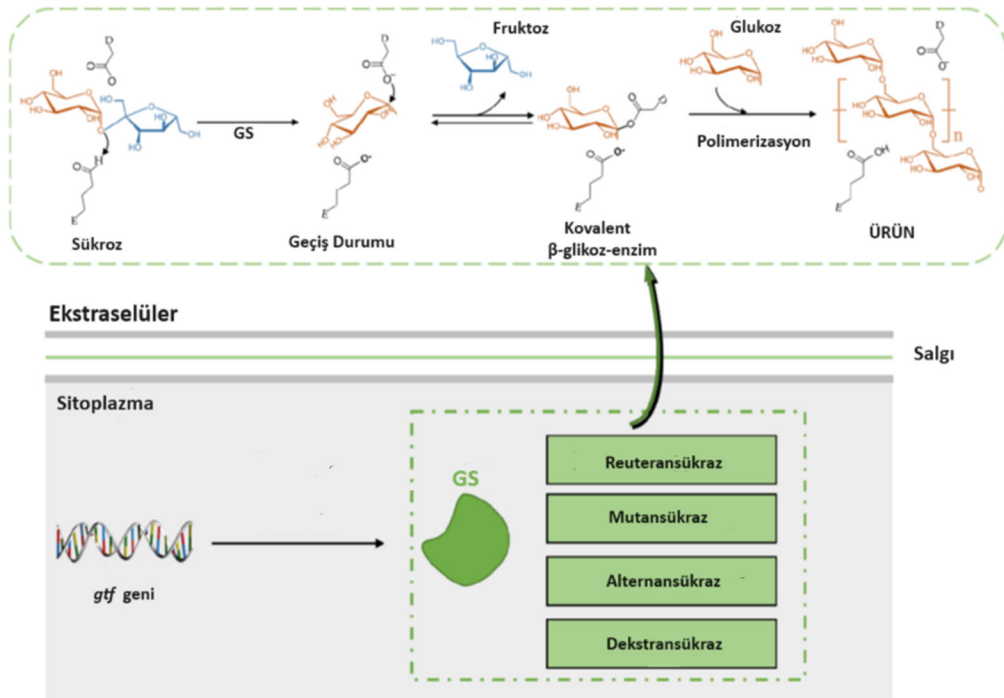
Son zamanlarda MOS/nişasta substratları üzerinde, ardışık linear  $\alpha$ -(1,6) bağları sentezlemek için  $\alpha$ -(1,4) bağları hidroliz eden 4,6- $\alpha$ -glukanotransferaz aktivitesi sergileyen *Frul. sanfranciscensis* TMW11304 karakterize edilmiştir (Dong ve diğ 2024<sup>b</sup>). *Weissella confusa* MBF8-1 tarafından sentezlenen WcMBF8-1 GtfB nişasta benzeri substratlardaki  $\alpha$ -(1,4) bağlantılarını kırarak linear  $\alpha$ -(1,6) bağlarını ve  $\alpha$ -(1- 4,6) dallanma noktalarının sentezini katalize etme yeteneğine sahip atipik glikoziltransferazlardandır (Dong ve diğ 2024<sup>c</sup>).

**Tablo 2.1:** GtfB enziminin son ürün çeşidine göre gruplandırılması (Dong ve diğ.2024<sup>c</sup>)

GtfB Çeşitleri	Enzim Adı	Ürün
1.Tip GtfB Enzimleri	Lr121 GtfB	Farklı yüzdelerde a-
Doğrusal $\alpha$ -(1,4) dizilerin	Lr GtfW	(1,6) bağlara ve
indirgeyici olmayan ucu üzerine	Lr GtfM	moleküler kütlelere
doğrusal ardışık $\alpha$ -(1,6) bağları	La GtfY	sahip doğrusal
sentezler	LrE81 GtfB	IMMP'ler
	LfNCC 3057GtfB	
		Amilozu, $\alpha$ -(1- 4,6)
		dallanma noktalarına
	La GtfX	sahip değişen $\alpha$ -
2.Tip GtfB Enzimleri	Lr2613 GtfB	(1,4)/ $\alpha$ -(1,6) bağlardan
		oluşan orta moleküler
		kütleli reuteran benzeri
		polimerler sentezler.
	St GtfB	$\alpha$ -(1-4,6) dallanmış bağ
3.Tip GtfB Enzimleri	Lf2970 GtfB	$\alpha$ -(1,3) bağ ve $\alpha$ -(1-4,3)
(4,3- $\alpha$ -glukanotransferaz)		dallar ile doğrusal $\alpha$ -
		(1,4) dizileri

### 2.1.8.2 Glukanotransferazların Katalitik Özellikleri

GH ailesi enzimlerinin ortak özelliği, substrat moleküldeki alfa-glikozidik bağları kırmak için katalitik ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> kovan yapısını kullanmalarıdır. Katalitik reaksiyonda nükleofil görevi bulunan Asp, genel asit/baz stabilizatörü olan Glu ve geçiş durumu stabilizatörü Asp ile  $\alpha$ -tutucu çift yer değiştirme mekanizmasını gösterir. Bu mekanizma, ilk basamakta kısaca GS enzimlerinde sükröz (Şekil 2.5) veya GT'lerde nişasta/maltodekstrin (Şekil 2.6) varlığında glikoz donör substratlarının  $\alpha$ -glikozidik bağının hidrolizi ve kovalent bir enzim-glikozil ara ürününün oluşumuyla başlar (Gangoiti ve diğ. 2018; Vuillemin ve diğ. 2016). İkinci aşama ise zincir ve enzim ara ürünlerinden oluşur ve ara ürün bir su molekülü (hidroliz reaksiyonu) veya bir alıcının hidroksil grubu (transglikozilasyon) tarafından yakalanabilir.



**Şekil 2.5:** Glukansükraz reaksiyonlarıyla glikozil birimlerinin büyüyen alfa-glukan zincirinin indirgeyici olmayan ucuna ardışık transferi (Vuillemin ve diğ. 2016).

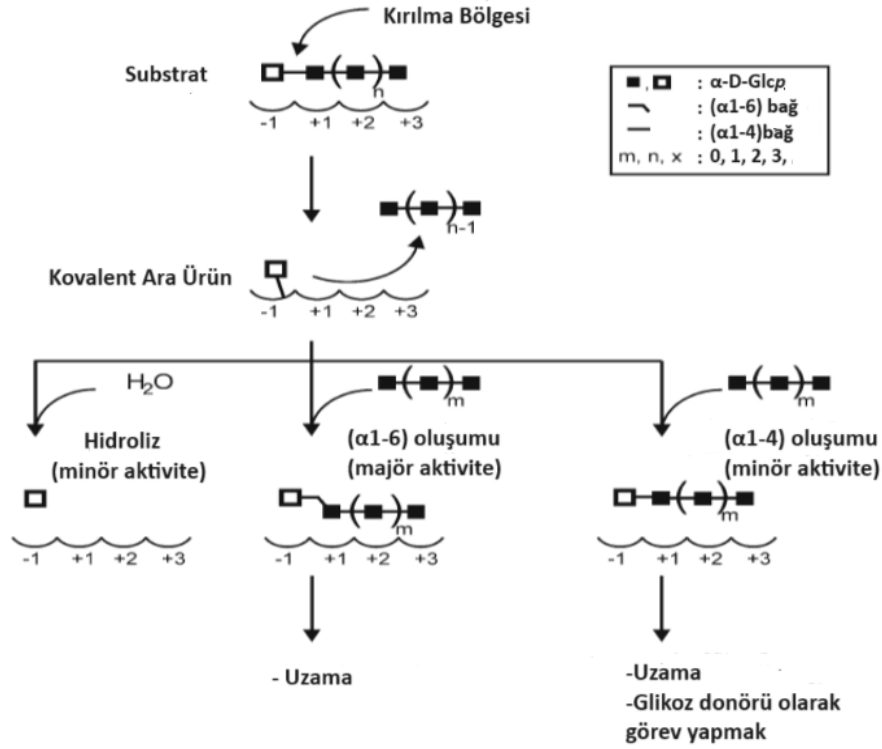
GS katalitik bölgesinin (aktif bölge) -1 alt ünitesinin ilerisi bloke edilerek, nişasta üzerine etkili GH70 enzimlerinin birden fazla donör substrat bağlanma alt ünitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu durumda polimerin uzama işleminin nişastadan

türetilen MOS birimlerinin ardışık transferi ile gerçekleşmesine olanak sağlar (Gangoiti ve diğ. 2017<sup>b,c</sup>).

Substrat bağlanma bölgesinin erişilebilirliği ve alıcı substrat bağlanma alt bölgelerinin mimarisi, substrat tercihinin yanı sıra transglukosilasyon reaksiyonunun verimliliği ve özgülüğünün (örneğin,  $\alpha$ -4,6'ya karşı  $\alpha$ -4,3) belirlenmesinde anahtar faktörlerdir. Örneğin; *Liml. reuteri* 121'den üretilen kısmi GtfB enziminin aktif bölgesinde yer alan A1 ve B halkaları, donörün alt bölgelerinin -2 ve -3. şeker birimlerini kapsamakta ve sonuçta ortaya çıkan tünel benzeri yapı, enzimin dallanmış nişasta substratlarına etki etme konusundaki sınırlı yeteneğinin ana belirleyicisi olduğu görüşüne neden olmuştur. Lr2613 GtfB ve Lf2970 GtfB'de bu halkalar çok daha kısadır; dolayısıyla bu enzimlerin homoloji modelleri çok daha açık bir bağlanma oluşunu öngörmüştür (Pijning ve diğ. 2021). Yine *Frul. sanfranciscensis* TMW11304'den elde edilen GtfB'nin daha açık aktif merkezinin, dallanmış substratların daha iyi yerleşmesine ve işlenmesine izin verdiği düşünülmektedir (Dong ve diğ 2024<sup>b</sup>).

GS'ler ve GtfB enzimleri üzerinde yapılan mutajenez çalışmaları, +1/+2 alt bölgelerindeki kalıntıların büyük ölçüde bağlantı spesifikliğini kontrol ettiğini göstermiştir (Kralj ve diğ. 2006; Meng ve diğ. 2015).

Dong ve diğ. (2024<sup>a</sup>) yaptıkları çalışmada GtfB benzeri enzimlerin yalnızca *Lactobacillus* türlerinde değil aynı zamanda diğer laktik asit bakterilerinde de mevcut olduğunu göstermiştir. Çalışmada GtfB enzimleriyle karakterize edilen dört korunmuş bölgede yüksek sekans benzerlikleri sergileyen ancak aynı zamanda +1/+2 alt bölgelerindeki kalıntılarda farklı özelliklere sahip olan 27 muhtemel GtfB proteini belirlenmiştir. Bu proteinlerden 14'ü *Lacp. plantarum*'a, 8'i *Frul. sanfranciscensis*'e, 3'ü *W. confusa*'a ve son ikisi ise sırasıyla *Liml. fermentum* ve *Liml. reuteri*'e aittir.



**Şekil 2.6:** 4,6 AGT enzimlerinin katalitik mekanizması (Leemhuis ve diğ. 2013)

4,6  $\alpha$ -GT'lerin kristal yapı çözümü ve moleküler ağırlık, substrat spesifitesi gibi enzimin karakterizasyonu içeren çalışmalar araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Örneğin; substrat konsantrasyonunun GTFB'nin işlevselliği üzerindeki etkilerini araştırmak için enzim çeşitli Paselli MD6 (dekstroz eşdeğeri %5-7 arasında ve %2,9  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağları olan patates nişastasının kısmi hidroliz ürünü) ve maltodekstrin konsantrasyonlarında inkübe edilerek substrat-enzim oranı kütle bazında 1.000:1'de tutulmuştur. Çalışma enzimin en verimli şekilde %5-%30 Paselli MD6 arasındaki konsantrasyonlarda yüksek aktiviteye sahip olduğunu ve %30 konsantrasyonda maksimum %42,2  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağlar oluşturduğunu göstermiştir (Bai ve diğ. 2015).

Doğal patates nişastası üzerinde modifiye etki gösteren GtfB-E81'in son ürünündeki  $\alpha$ -(1,4): $\alpha$ -(1,6) oranı 63:37 olduğu enzimin etkili bir transferaz aktivitesine sahip olduğunu doğrulamıştır (Hassanein ve diğ 2023).

WPS (waxy patates nişastası) ve ATPS'nin (amilomaltazla işlenmiş patates nişastası) izomaltaz ile muamele edildikten sonra IMMP sentezi için 0,3 mg GTFB- $\Delta$ N/g substrat eklenerek ve 37 °C'de çeşitli sürelerde inkübe edildiği çalışmada 70



saatlik GTFB- $\Delta$ N inkübasyonundan sonra  $\alpha$ -(1,6) bağlı glikozidik bağlarının yüzdesi sırasıyla dWPS (dalları ayrılmış) için %63 ve dATPS için %69'a ulaşmıştır (Klostermann ve diğ 2021). Yine *Liml. fermentum* NCC 3057'den elde edilen 4,6- $\alpha$ -GT (GtfB $\Delta$ N) substrat olarak amilozV kullanarak %72  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağa sahip bir IMMP ürünü sentezlediği bulunmuştur (Yang ve diğ. 2022).

Tüm bu çalışmalar ışığında enzimler tarafından sentezlenen ürünlerin fizikokimyasal özellikleri ve sağlık üzerine muhtemel etkileri ile ilgili çalışmalar daha sınırlı kalmıştır. Oysaki bu alanda yapılan çalışmaların arttırılması hem gıda sektörü hem de teröpatik açıdan umut verici olabilir. Nitekim; *Liml. reuteri* 121 GtfB ve *Liml. fermentum* NCC 3057 GtfB tarafından nişastadan sentezlenen izomaltomaltopolisakkaritler (IMMP'ler) benzeri  $\alpha$ -glukan ürünleri, *in vitro* sindirim deneylerinde ince bağırsağın sindiriminden kaçabilen yeni diyet lifleri olarak kabul edilmiştir (Leemhuis ve diğ. 2014; Yang ve diğ. 2022) ve özellikle probiyotik *Bifidobacterium* suşlarının büyümesini teşvik edebilmektedirler (Bai ve diğ. 2016).

## 2.2 Ekşi Hamurun Üretimi ve Fermantasyon Özellikleri

### 2.2.1 Ekşi Hamur Fermantasyon Özellikleri ve Tipleri

Fermantasyon; gıdalara daha uzun raf ömrü yanında fonksiyonel ve duyuşal özellikler kazandıran çok eski çağlardan beri kullanılan ekonomik ve çevre dostu biyoteknolojik süreçtir (Rastogi ve diğ. 2022; Liu ve diğ. 2023). Ekşi hamur kullanılarak gerçekleştirilen ekmek üretimi de eski ve geleneksel bir fermantasyon sürecinin tipik örneklerinden birisidir (De Vuyst ve diğ. 2023).

Başta Avrupa Birliği olmak üzere sadece birkaç ülke ekşi hamurun yasal bir tanımını oluşturmuştur ve ekşi hamurun tanımına yaklaşım, farklı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Nitekim Fransa, İspanya ve Hollanda, ekşi hamuru; maksimum düzeyde ekmek mayası ilavesi ve pH, toplam titre edilebilir aktivite veya asetik asit konsantrasyonu ile tanımlanan minimum asitlik düzeyini belirterek tanımlarken Avusturya, Çek Cumhuriyeti ve Almanya ekşi hamuru metabolik olarak aktif LAB içeren bir hamur olarak tanımlamaktadır (D'Amico ve diğ. 2023).

Geçtiğimiz yıllarda ekşi hamur, su ve tahıl unlarının, özellikle de buğday ve çavdarın fermente edilmiş bir karışımı olarak tanımlanmışken (Sevgili ve diğ. 2023); artık tahıl unları yerine kepek, tohum gibi tahıl yan ürünleri ile baklagiller, pseudo-tahıllar ve çimlendirilmiş tohumların ayrıca su yerine de bitki ekstraktlarının kullanılabileceği ürün olarak literatürde yer almaktadır (Sadeghi ve diğ. 2023). Ekşi hamur LAB ve mayaların yer aldığı kompleks bir mikrofloraya sahiptir ve bu mikroorganizmaların birbirine oranı genel olarak 100:1 oranında olmakla beraber 10:1-1000:1 oranları arasında değişmektedir (Lima ve diğ. 2023; Fu ve diğ. 2024). LAB'ler ürettiği laktik asit ve/veya asetik asit etkisi ile ekşi tat ve aroma oluşumu sağlarken mayalar uzun süreli aroma oluşumundan ve heterofermentatif LAB ile birlikte mayalanmadan sorumludurlar (Oshiro ve diğ. 2021; De Vuyst ve diğ. 2023; Pérez-Alvarado ve diğ. 2022). Laktik asit/asetik asit molar oranı fermentasyon katsayısını (FQ)(oranını) verir. Bu değer lezzet ve raf ömrü gibi temel kalite parametre göstergesi olarak kullanılır. Ekşi hamurun tipik olarak 15-150 mM laktik asit (ortalama: 75 mM) ve 1-50 mM asetik asit (ortalama: 20 mM) içerdiği rapor edilmiştir ve ekşi hamur için tipik fermentasyon oranı aralığı 0,25-20'dir (ortalama: 4,4). İyi bir ekme aroması elde etmek için ise FQ'nun 2,0 ila 2,7 arasında olması gerekmektedir (Arora ve diğ. 2021; Hernández-Parada ve diğ. 2022).

Ekşi hamur mikrobiyatasının değişen karbonhidrat ve besin içeriğine, düşük pH, değişken oksijen içeriği ve redüksiyon potansiyeli adaptasyonuna göre karakterize edilen oldukça stresli bir ekosistemdir (Van Kerrebroeck ve diğ. 2017).

Bugüne kadar rapor edilen ekşi hamurlardan en az 111 farklı LAB türü ve 59 maya türü izole edilmiştir (De Vuyst ve diğ. 2023; González-Alonso ve diğ. 2024).

### **2.2.1.1 Ekşi Hamur Tipleri**

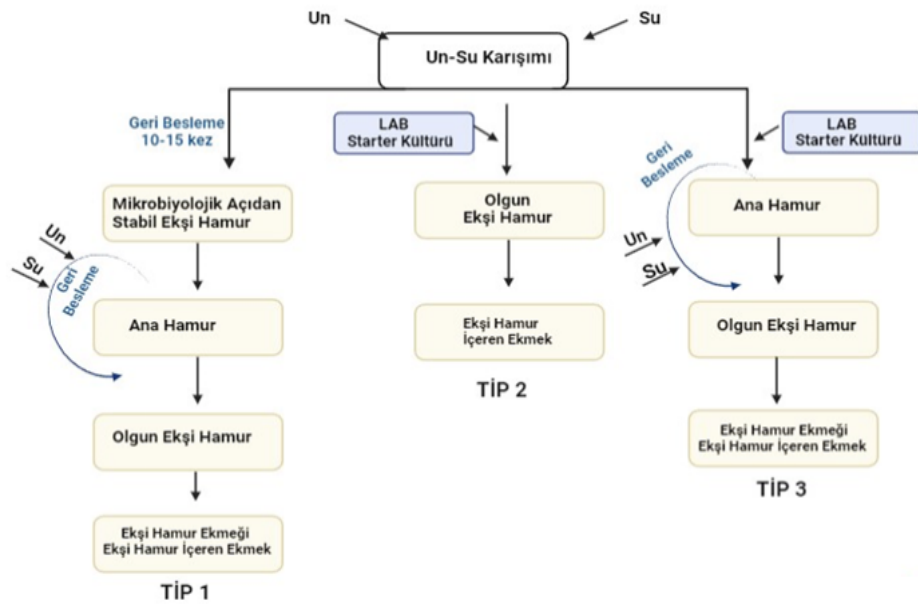
Üretim metodu her ne kadar dünya üzerinde farklılıklar içerse de ekşi hamur elde edilmesi temelde kendiliğinden un-su karışımının fermente edildiği veya bu karışıma uygun starter ilavesi ile gerçekleştirilen üretimdir. Bu bağlamda bazı araştırmacılar ekşi hamur eldesini aşağıdaki şekilde gruplandırmışlardır:

## İnokülasyon Temelli Sınıflandırma

İnokülasyon durumuna göre; elde edilen olgun ekşi hamurun mikrobiyasını etkileyen üç tip ekşi hamur üretim prosesinden (Tip 1, 2 ve 3) bahsedilebilir ve Şekil 2.7’de özetlenmiştir (De Vuyst ve diğ. 2023; De Vuyst ve diğ. 2017).

Tip 1 ekşi hamur; tekrarlayan geri besleme basamakları ile üretilen, LAB ve mayaların metabolik olarak aktif tutulduğu ekşi hamur üretim prosesidir (De Vuyst ve diğ. 2023, Comasio ve diğ. 2021). Burada ana hamurdan elde edilmiş bir önceki fermantasyondan üretilen hamur %5-20 oranında taze hazırlanmış un-su karışımına ilave edilir. Oda sıcaklığında (20-30 °C’de) gerçekleştirilen bu işlemden 6-24 saatlik periyotlarda geri besleme yapılmaktadır (González-Alonso ve diğ. 2024; De Vuyst ve diğ. 2023, De Vuyst ve diğ. 2017). Daha çok fırıncılık ve ev tipi fırın ürünlerinin üretimi için uygundur (Akamine ve diğ. 2023).

Tip 2 ekşi hamur; un-su karışımının asit toleranslı LAB kullanılarak 30 °C sıcaklıkta 1-3 gün süre zarfında fermente edildiği ve geri besleme basamağı olmayan üretim şeklidir (De Vuyst ve diğ. 2023; González-Alonso ve diğ. 2024). Endüstriyel üretimlere uygun kullanılabilir prostestir (Akamine ve diğ. 2023). Tip 3 ekşi hamur ise; starter kültür tarafından başlatılan (Tip2) ve geri besleme basamakları içeren (Tip 1) prostestir (De Vuyst ve diğ. 2023).



**Şekil 2.7:** Ekşi hamurun inokülasyon temelli sınıflandırılması (De Vuyst ve diğ. (2017) ve (2023)’ten uyarlanmış ve BioRender.com kullanılarak yeniden oluşturulmuştur)

## Uygulanan Proses Teknolojisi Temelli Sınıflandırma

Uygulanan prosese göre Tip 0, I, II ve III (De Vuyst ve diğ. 2023; De Vuyst ve diğ. 2017; Akamine ve diğ. 2023) veya Tip I, II, III ve IV (De Marco ve diğ. 2022; Ma ve diğ. 2021) olmak üzere dört tip ekşi hamur vardır ve Şekil 2.8'de şematize edilmiştir.

Tip 0 ekşi hamur; sadece un-su karışımı ile fermente edilen ön hamurları (sponge) temsil eder. LAB'ların sınırlı gelişiminden dolayı bu hamurların asit içeriği ve aroma özelliği düşüktür. Bu tip fermantasyonda, pH'ı (pH~4) düşüren laktik ve asetik asit gibi organik asitler üretilir (Akamine ve diğ. 2023). Örnek olarak İtalya'dan biga ve Fransa'dan pâte fermentée gibi katı ön fermentler ve Kuzey Avrupa'dan levain levure ve Polonya'dan poolish gibi hidratlı ön fermentler gösterilebilir (Ramos ve diğ. 2021).

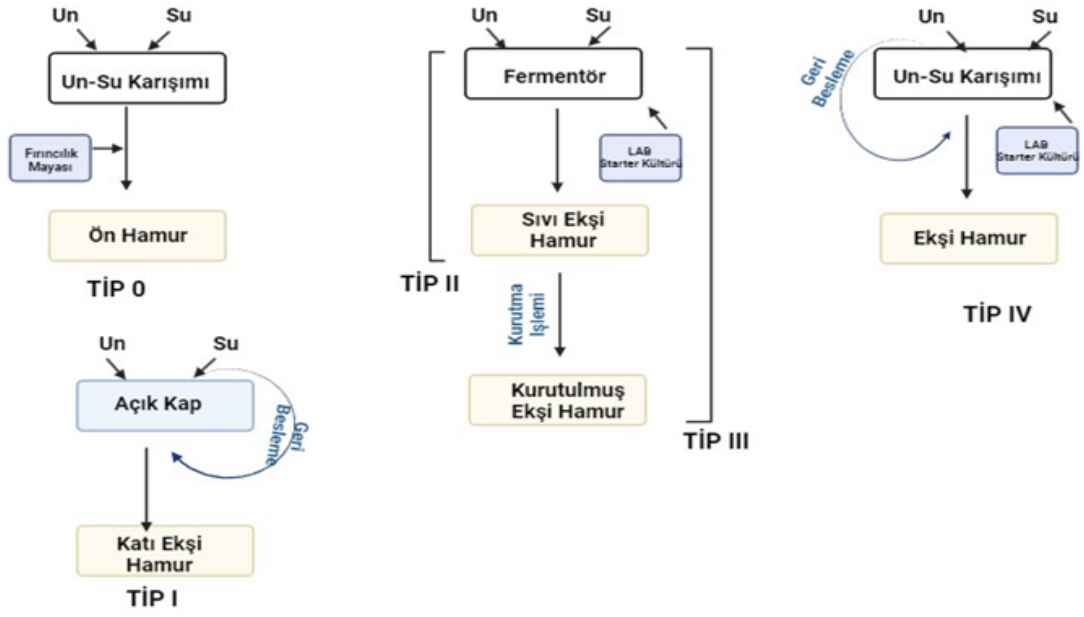
Tip I ekşi hamur; geleneksel tip ekşi hamur olup üretimi ilk (ana) hamur ile düşük sıcaklık (<30 °C) ve hamur veriminde (DY<200) geri besleme basamakları (3-10 defa) ile gerçekleştirilir (Chavan ve Chavan 2011; Wang ve diğ. 2020; Pérez-Alvarado ve diğ. 2022; Siepmann ve diğ. 2018). İlk hamur genellikle sadece un ve su kullanılarak veya mikroorganizmalar açısından doğal olarak zengin olan başka bir hammaddenin (meyve, yoğurt, işkembe ve gübre gibi) eklenmesiyle hazırlanabilir (Sevgili ve diğ. 2023). Kullanılan ekşi hamur çok farklı tür ve çeşitlilikte bakteri ve maya suşu içerebilir (Pérez-Alvarado ve diğ. 2022). Her ne kadar bu tip ekşi hamur ile üretilen fırın ürünleri kalitesi yüksek olsa da endüstriyel boyutta kullanılamaması, zaman alması, eğitimli personel gerektirmesi ve kontrolünün zor olması gibi zorlayıcı yönleri mevcuttur (Akamine ve diğ. 2023; Pérez-Alvarado ve diğ. 2022). Tipik bir örneği; esasen *Frul. sanfranciscensis* ve *Kazachstania humilis* ile fermente edilen San Francisco'daki ekşi hamurdur. *Frul. sanfranciscensis* maltoz ve *K. humilis* glikoz kullandığından bu iki mikroorganizma arasındaki karbon kaynağı için rekabet bulunmaz ve hatta aralarındaki sinbiyotik ve mutualistik ilişki bulunmaktadır (Ramos ve diğ. 2021).

Tip II ekşi hamur; endüstriyel tip ekşi hamur olarak da bilinir. Un-su karışımına özellikle aside dayanıklı LAB ilavesi ile fermantasyon başlatılır. Hamur veriminin >200 olduğu ve fermantasyon sıcaklığının >30 °C olduğu 1-3 gün sürebilen tek basamakta gerçekleştirilen ekşi hamur üretim şeklidir. Yüksek oranda starter kültür

ilavesi ile başlatılan fermantasyon kısa sürede otoktan (yerli) mikroflora üzerinde baskılayıcı veya inhibisyon etki gösterir ve geleneksel yöntemle hazırlanan ekşi hamura göre hamurun daha hızlı asitlenmesini sağlar (Siepmann ve diğ. 2018 ). Bu tip hamurlarda *Limosilactobacillus pontis*, *Liml. fermentum*, *Liml. reuteri*, *Limosilactobacillus frumenti*, *Limosilactobacillus panis*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lb. acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lb. delbrueckii* gibi asit toleranlı mikroorganizmalar starter olarak kullanılmaktadır (Gänzle ve Zheng 2019; Van Kerrebroeck ve diğ. 2017).

Tip III ekşi hamur; stabil tip II ekşi hamurunun dehidrasyonu ile elde edilir (Siepmann ve diğ. 2018; Lima ve diğ. 2023). Bu amaçla sıcak havayla kurutma, püskürtmeli kurutma, dondurarak kurutma veya akışkan yatakla kurutma gibi metodlar seçilebilir (De Marco ve diğ. 2022). Bu ekşi hamurun stabilitesi yüksek olduğundan endüstriyel fırınlar kullanılabilir (Akamine ve diğ. 2023).

Tip IV ekşi hamur; birleşik bir üretim sürecidir. Başlangıç kültürü gerektirmesi (tip II) ve geri besleme basamağı (tip I) içermektedir (Ma ve diğ. 2021; Alvarado ve diğ. 2023). Bu proseslerden tip II ve Tip III'de mayalar hızlı ve yoğun asitlendirme (tipII) veya kurutulma işlemi (tip III) nedeniyle inaktif olabileceğinden hamurun hazırlanması sırasında mayalanmak üzere bir mayanın eklenmesi gerekir (De Vuyst ve diğ. 2023).



**Şekil 2.8:** Ekşi hamur sisteminin proses temelli sınıflandırılması (De Vuyst ve diğ. (2017) ve (2023)'ten uyarlanmış ve BioRender.com kullanılarak yeniden oluşturulmuştur)

### 2.2.2 Ekşi Hamur Fermantasyon Mikrobioatası

Ekşi hamur mikrobiyal ekosistemi; un ve su karışımını fermente eden LAB ve mayalar tarafından oluşur. Genel olarak ekşi hamur mikroorganizma bileşimi mayalar (*Ascomycota*), LAB (*Firmicutes*, esas olarak *Lactobacillaceae*) ve bazen asetik asit bakterileri ( $\alpha$  proteobakteriler) ile sınırlıdır (De Vuyst ve diğ. 2023).

Mikrobiyolojik açıdan bakıldığında ekşi hamur, düşük pH, yüksek karbonhidrat konsantrasyonları, oksijen sınırlaması ve mayalara kıyasla daha yüksek LAB hücre sayısı ile tanımlanan spesifik ve stresli bir ekosistemdir (De Vuyst ve diğ. 2014). Uygulanan fermantasyon koşullarına (sıcaklık, geri besleme vb.) yüksek tahıl çeşitliliği de eklenince ekşi hamurlarda bulunan LAB'lerinin çeşitliliği genişlemektedir (Reale ve diğ. 2019).

Ekşi hamurun mikrobiyal popülasyonu spontan oluşabildiği gibi başlangıç kültürü eklenerek de oluşturulabilir (Calvert ve diğ. 2021). Un türü ve mikrobiyal kontaminasyon, geriye beslemenin süresi-sayısı ve sıcaklığı ve ekmek yapımının teknolojik parametreleri (tuz, ekşi hamur ilavesi) gibi etmenler ekşi hamur mikrobiyotasının oluşumunu ve bileşimini etkileyebilir (Reale ve diğ. 2019). Spontan fermantasyonun başında hamurdaki mikrobiyota anaerobik, aerobik, spor oluşturan ve

enterik bakteri ve mayalar gibi ekmek yapımına uygun olmayan birçok türü de içerebilir (Calvert ve diğ. 2021).

Ekşi hamurların çoğunda *Fructilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Limosilactobacillus* ve *Lactiplantibacillus* cinsleri baskındır (D'Amico ve diğ. 2023). Buğday ve çavdar hamurlarında sakkaroz ve maltoz baskın karbonhidrat kaynaklarıdır ve fermantasyonun başlangıç aşamalarında heterofermentatif laktobasiller tarafından elektron alıcısı olarak kullanılan oksijen ve fruktoz da bol miktarda bulunur. Bu koşullarda, heterofermentatif metabolizmanın enerji verimi daha yüksektir ve bunun sonucu olarak da ekşi hamurda heterofermentatif laktobasiller homofermentatif laktobasillere kıyasla daha yüksek sayıda bulunur (Gänzle ve diğ. 2023).

Ekşi hamur fermantasyonundan zorunlu ve fakültatif heterofermentatif ile bazı zorunlu homofermentatif olanlar da dahil olmak üzere 90'dan fazla *Lactobacillus* türü izole edilmiştir. *Levl. brevis*, *Liml. fermentum*, *Lacp. plantarum*, *Companilactobacillus paralimentarius* ve *Frul. sanfranciscensis* türleri ekşi hamur mikrobiyotasının tipik temsilcileridir (Lima ve diğ. 2023; De Vuyst ve diğ. 2017). Bunun yanı sıra zorunlu ve fakültatif heterofermentatif *Weissella*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* da ekşi hamur florasında bulunurken homofermentatif *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus*'un bazı türleri genellikle ekşi hamurlarda daha az yoğunluktadır (De Vuyst ve diğ. 2017).

LAB'nin ekşi hamurda varlığı, un ve ekşi hamurun diğer bileşenlerinin kontamine olmasından ya da ekşi hamur hazırlama ortamından kaynaklanmaktadır (Fekri ve diğ. 2023). Ekşi hamurların çoğu buğday ve çavdar unundan hazırlanır. Bununla beraber darı, yulaf ve pirinç gibi tahıllar ve kinoa, karabuğday gibi tahıl benzeri ürünlerin de kullanıldığı ekşi hamur sistemleri rapor edilmiştir (De Vuyst ve diğ. 2014). Farklı un çeşitlerinin kullanılması ekşi hamurlarda *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Enterobacter*, *Erwinia* ve *Sphingomonas* gibi mikrobiyal çeşitliliklerin flora dönüştürür ve bunlar ekşi hamur fermantasyonunun birinci günü sonunda *Enterobacter* hariç inhibe edilir (De Angelis ve diğ. 2019).

Hamurun diğer ana maddesi olan su, bakteri inokulumunun kaynağı olarak düşünülme de, kimyasal bileşimi ile ekşi hamur mikrobiyotası arasında bir ilişki kurmak amacıyla araştırılmıştır (Gobbetti ve diğ. 2016). Bu çalışmalarda suyun

mikrobiyolojik katkıdan çok, sertlik yapısına bağılı olarak mikrobiyota çeşitliliğini etkilediği ortaya konmuştur.

Pasajlama sayısı, ekşi hamur mikrobiyotasının dinamiklerini etkileyen faktörlerden biridir. Pasajlama; ekşi hamur prosesinde LAB ve kullanılan un türünü dikkate almaksızın birbirini takip eden üç aşamalı bir geçiş sürecini izlemektedir ve bunlar sırasıyla;

- (i) *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* cinsleri
- (ii) *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Weissella* cinsleri
- (iii) *Levl. brevis*, *Liml. fermentum* ve *Lacc. plantarum* gibi spesifik LAB türlerini içeren basamaklardır (Oshiro ve diğ. 2019).

Fermantasyon sırasındaki sıcaklık, hamurun asitleşme oranını etkilediğinden önemli bir parametredir. Ayrıca ekşi hamurun mikrobiyal bileşimini de etkiler. Sıcaklık genellikle 28 – 44 °C arasında tutulur (Chawla ve Nagal 2015). Fermantasyon sıcaklığı ekşi hamur mikrobiyal çeşitliliğini sınıflandırmak için önemli bir parametredir. Ancak aynı tür ekşi hamur içinde sıcaklığın da belirleyici bir faktör olabildiği göz ardı edilmemelidir. Örneğin; tip I ekşi hamurda fermantasyon sıcaklığının 20 °C veya 35 °C olması durumunda mikrobiyota bileşiminin farklı olduğu rapor edilmiştir (Ramos ve diğ. 2021).

Her ne kadar aksini iddia eden görüşler olsa da (D'Amico ve diğ. 2023) coğrafi konum da nihai mikrobiyotanın oluşumunda etkilidir. Tip I ekşi hamurun önemli bir türü olan *Fru. sanfranciscensis* soğuk-ılıman havalara adapte olmuş mezofilik bir tür olduğundan tropik iklimlerde izole edilmez. Çevre sıcaklığı yüksek olduğunda, *Liml. fermentum*, *Lacc. casei/Lacc. paracasei* ve *Liml. reuteri* gibi termofilik *Lactobacillus* türleri gelişmektedir (Ramos ve diğ. 2021).

Ekşi hamur mikrobiyota bileşimini etkileyen bir diğer faktör hamur verimidir. Hamur verimi (HV), unla karıştırılan su miktarını, yani 100 g un kullanıldığında unun suya oranını ifade eder ve Denklem 1 ile hesaplanır. HV değeri 150-160 arasında ise ekşi hamur sert kabul edilirken; 200-300 arasında olduğunda ekşi hamur yarı sıvı, 300'ün üzerinde olduğunda ise ekşi hamur sıvıdır. Hamur verim endeksi aşağıdaki ifade kullanılarak elde edilir (Hernández-Parada ve diğ. 2022):



$$HV = \frac{\text{Kullanılan su miktarı} + \text{Kullanılan un miktarı}}{\text{Kullanılan Un Miktarı}} \times 100 \quad (1)$$

Mayalara ilişkin olarak, *Saccharomyces cerevisiae*, *K. humilis*, *Kazachstania unispora* ve *Wickerhamomyces anomalus*'un ağırlıklı olduğu 30'dan fazla tür tespit edilmiştir (Lima ve diğ. 2023). *Torulaspota* ve *Pichia* cinslerine ait mayalar da izole edilmiştir (Carbonetto ve diğ. 2020) ve ekşi hamur ortamından izole edilen mikroorganizma grupları Tablo 2.2'de listelenmiştir.

**Tablo 2.2:** Ekşi hamurlardan izole edilen LAB ve mayalar (Sakandar ve diğ. 2019; Catzeddu 2019; Chavan ve diğ. 2011; Corsetti ve Settanni 2007)

<b>Zorunlu heterofermentatif LAB</b>	<b>Fakültatif Heterofermentatif LAB</b>	<b>Homofermentatif LAB</b>	<b>Maya</b>
<i>Frul. sanfranciscensis</i>	<i>Lacp. plantarum</i>	<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Levl. brevis</i>	<i>Lacc. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>S.cerevisiae</i>
<i>Liml. fermentum</i>	<i>Lacc. rhamnosus</i>	<i>Coml. farciminis</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Liml. reuteri</i>	<i>Coml.alimentarius</i>	<i>Lc. Lactis</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Liml. panis, Liml. pontis</i>	<i>Lacp. pentosus</i>	<i>Coml. mindensis</i>	<i>Kazachstania humilis</i>
<i>Furl. rossiae</i>	<i>Coml. paralimentarius</i>	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Candida milleri</i>
<i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	<i>Latl. curvatus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
<i>W.confusa, W.cibaria</i>		<i>Lb. crispatus</i>	
<i>Furfurilactobacillus siliginis</i>		<i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	
<i>Leuc. citreum</i>		<i>Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	
<i>Levl. spicheri</i>			
<i>Levl. zymae</i>			
<i>Leuc. mesenteroides</i>		<i>Lb. helveticus</i>	
<i>Levilactobacillus acidifarinae</i>			
<i>Lentilactobacillus buchneri</i>			
<i>Liml. frumenti</i>			
<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>			

### **2.2.3 Ekşi Hamurun Ekmekçilik Açısından Önemi ve Sağlık Üzerine Potansiyel Etkileri**

Ekşi hamur, ekmek üretiminde 14.000 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır (Arranz-Otaegui ve diğ. 2018) ve geleneksel uygulamalarda mayalama maddesi olarak kullanılırken günümüzde artık organoleptik özellikleri geliştirmek ve katkı maddelerine olan ihtiyacı azaltmak için giderek daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Fernández-Peláez ve diğ. 2020).

Hamur ortamında LAB ve mayaların faaliyetiyle nişasta hidrolize edilir, hamurda daha fazla asit birikir ve gluten parçalanır; bunların tümü hamurun dokusunun, uçucu bileşenlerin konsantrasyonunun, yapısının ve mikrobiyolojik raf ömrünün iyileştirilmesine katkıda bulunur (Siepmann ve diğ. 2018).

#### **2.2.3.1 Tekstürel Özellikler Üzerine Ekşi Hamurun Etkisi**

Buğday ve çavdar unu proteinlerinin hidrolizi ekmeğin tadı, hacmi ve dokusu açısından oldukça önemli bir prostestir. Buğday ununun temel bileşeni olan gluten gliadin ve gluteninden oluşan bir depo proteindir (Bi ve diğ. 2023). Fermentasyon sırasında ekşi hamurda, LAB tarafından asetik asit ve laktik asit üretimine ve unun içerdiği enzimlerine bağlı olarak glutenin proteolizi ve nişastanın orta derecede hidrolizi meydana gelir ve bunun sonucunda pH düşer (Siepmann ve diğ. 2018). Artan asitlik gluten proteinlerinin çözünmesine yol açar (Arendt ve diğ. 2007), nişastanın hidrolizini hafifletir ve arabinoksilanları parçalayan ksilanaz aktivitesini artırır (Fekri ve diğ. 2023) böylelikle hamur sisteminin viskoelastik yapısını değiştirir (Nutter ve diğ. 2019). pH'nın düşmesiyle birlikte proteinler pozitif yüklenir ve molekül içi bağ artar, gluten açılır ve hidrofobik kümeler açığa çıkar; dolayısıyla hamurun stabilitesi ve karıştırma süresi azalır. Gluten ağındaki bu değişiklikler aynı zamanda hamurun elastikiyetini ve sıklığını da azaltır. Düşük pH seviyelerinde nişasta granüllerinin su bağlama kapasitesi artar ve bu da ekmek hacminin artmasına neden olur (Chen ve diğ. 2016).

Asitlenmenin ikincil etkisi ise unun enzim aktivitesinde meydana gelen değişikliklerdir. LAB, glutenin çeşitli prolin kalıntılarını hidrolize edebilen ve daha

fazla uzayabilirliğe sahip, daha stabil ve daha az elastik bir emülsiyon oluşturabilen karmaşık bir proteaz sistemine sahiptir. Un proteaz enzim aktivitesi için optimum pH, fermantasyon sırasında organik asitlerin üretimiyle ulaşılır. Proteaz aktivitesine ek olarak pH'nın düşmesi, pirinç bazlı ürünlerde önemli olan amilazın deaktivasyonuna neden olur çünkü pirinçteki  $\alpha$ -amilazın aktivitesi, kırıntıyı yapışkan hale getirir ve ürünün hacmini azaltır. Bununla birlikte, ekşi hamurun asitliğindeki daha fazla artış olumsuz bir etkiye sahiptir ve gliadin ve glutenin hidrolizinin yanı sıra glutenin parçalanması nedeniyle son ürünün gaz içeriğini ve hacmini koruma yeteneği azalır (Fekri ve diğ. 2023).

Hamurun viskoelastik özellikleri; karıştırma toleransına direnç, elastikiyet, uzayabilirlik ve gaz tutma kapasitesi anlamına gelir (De Vuyst ve diğ. 2017). Sonuç olarak, proteolize uğrayan gluten daha fazla uzayabilirliğe sahip, daha stabil ve elastik bir emülsiyon üretir. Glutenin tamamen parçalanması sağlanırsa elde edilen ürünler çölyak hastaları için güvenli olabilecektir (Fernández-Peláez ve diğ. 2020).

Gluten üzerindeki etkisine ek olarak LAB'ler (*Leuc. mesenteroides*) ekşi hamurda dekstran üretimi ile ekmeğin dokusunun gelişmesine katkı sağlar (Calvert ve diğ. 2021). Ayrıca hamur ortamında mayalar da, gluten ağının bütünlüğünü ve gücünü önemli bir şekilde artıran glutatyon, gliserol ve piruvik asit gibi bileşikler üreterek ekmeğin dokusuna katkıda bulunurlar (Hernández-Parada ve diğ. 2022).

Ekşi hamurun fermantasyonunda LAB tarafından üretilen EPS, çeşitli fonksiyonel aktivitelere sahip olmasının yanı sıra hidrokolloid olarak da hamurun reolojik özellikleri ve ürünlerin doku özelliklerinde de olumlu rol oynamaktadır (Zhang ve diğ. 2019). Yapılan bir çalışmada EPS üreticisi *Weissella cibaria* NC516.11 suşunun karabuğday ekşi hamur ekmeğinde kontrol grup ile karşılaştırıldığında pişirme kaybını azalttığı, spesifik hacmi arttırdığı ve 72 saatlik depolamanın ardından ekmek için önemli bir kalite parametresi olan sertliği %25,53 azalttığı tespit edilmiştir. Burada EPS hamur aşamasında suya ve diğer hamur bileşenlerine sıkı bir şekilde bağlanarak nemi korumakta ve nihai ürünün sertliğinin azalmasına yardımcı olmaktadır (Zhang ve diğ. 2023).

### 2.2.3.2 Aroma Gelişimine Ekşi Hamurun Etkisi

Proteinlerin parçalanması ekmeğin lezzet gelişiminde önemli bir adımdır. Proteoliz sonucu aroma bileşiklerinin öncüsü olan amino asitler üretilir. Tüketiciler ekmeğin görünümüne, hacmine, rengine, tadına ve aromasına özellikle dikkat etmektedir. Bununla birlikte ekmeğin aroması, tüketici kabul edilebilirliği ve ürünün tanınması açısından en önemli özellik olarak kabul edilmektedir.

Farklı ekmek türlerinin 500'e kadar aroma bileşiğine sahip olabileceği rapor edilmiştir. Ekmeğin lezzetini oluşturan niceliksel olarak en önemli kimyasal gruplar; aldehitler, alkoller, ketonlar, esterler, asitler, pirazinler ve pirolinlerin yanı sıra hidrokarbonlar, furanlar ve laktonlar gibi diğer bileşiklerdir. Bu uçucu bileşikler ekmek içinden, kabuktan veya her ikisinden de kaynaklanabilir. Ekmek içindeki uçucu fraksiyon, hamurun yoğurulması sırasında ve esas olarak hamur şekerlerinin mayalar ve LAB'leri tarafından fermentasyonu sırasında enzimatik reaksiyonlarla oluşturulur (Galoburda ve diğ. 2020; Pico ve diğ. 2015).

Aldehitler, ketonlar ve alkoller de lipid oksidasyonu ile oluşurken kabukta uçucu bileşen, enzimatik olmayan Maillard reaksiyonları (karbonil bileşiklerinin Strecker bozunması dahil) ve şekerlerin karamelizasyonu gibi pişirme sırasında meydana gelen termal reaksiyonlarla oluşturulur. Ayrıca, kabuk oluşumu sırasında kırıntıdan kabuğa ve bunun tersi yönde koku aktarımı gerçekleşebilmektedir (Pico ve diğ. 2015).

Laktik asit ve asetik asit oranı, ekmeğin aromasını etkileyen önemli bir faktördür ve fermentasyonda rol alan mikroorganizma, fermentasyon sıcaklığı ve unun türünden etkilenir (Moroni ve diğ. 2009).

Xu ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada iki çeşit maya (*Meyerozyma guilliermondii* EH1 ve *Pichia kudriavzevii* EP1 ile *Frul. sanfranciscensis* DSM20451 starter olarak ekşi hamur yapımında kullanılmıştır. Elde edilen ekşi hamurlar ekmek yapımında yer almış ve üretilen ekmeklerin aroma profilleri değerlendirilmiştir. Her iki karışık kültürle hazırlanan ekmekler de *Frul. sanfranciscensis* ile hazırlanan ekmeğe göre etil-asetat (tatlı, çiçeksi), etil-heksanoat (meyveli, likör), izoamil asetat (muz), propil laktat (meyveli, likör), fenil etil asetat (çiçek) gibi spesifik bileşikler içermektedir. Ancak *P. kudriavzevii* EP1 ile izoamil laktat (krem ve ceviz) ve *M.*

*guilliermondii* EH1 ile (E, Z)-2,6-nonadienal (salatalık) ve etil dekanolat (meyveli) bileşikleri elde edilmiştir ve bu durum farklı starter kültürlerin ekmeğin tadı üzerinde türe özgü bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

### 2.2.3.3 Raf Ömrünün Arttırılmasında Ekşi Hamurun Etkisi

Ekmeklerin saklama süresini sınırlayan temel faktör bayatlamadır. Esas olarak ekmekte ve diğer nişasta içeren gıdalarda meydana gelen ve bunların lezzetini azaltan faktör olan bayatlama aynı zamanda ekonomik kayıplara da sebep olmaktadır (Mihhalevski ve diğ. 2012).

Bayatlama mekanizması tam olarak belirlenmemiş olmasına rağmen, değişimden sorumlu olan en önemli nedenler amilopektin retrogradasyonu, nişasta-gluten etkileşimleri ve ekmeğin mikro yapısındaki nemin taşınması ile ilgili olduğu bilinmektedir (Fadda ve diğ. 2014; Barros ve diğ. 2018). Bu olaylar, somunlarda kabukta gevreklik kaybı, su tutma kapasitesinde kayıp, ekmeğin sertliğinde artış ve organoleptik özelliklerde kayıpla sonuçlanır (Barros ve diğ. 2018).

Pişirme sırasında ekmeğin iç sıcaklığı yaklaşık olarak 99 °C'ye ulaşır, bu sırada nişasta granülleri şişer, jelatinleşir ve kısmen sıvılaşır. Soğuduktan sonra, depolama sırasında nişastanın kristal yapısı yavaş yavaş eski haline döner ve bu olaya nişasta retrogradasyonu denir (Mihhalevski ve diğ. 2012). Nişasta ekmeğin ve diğer nişasta açısından zengin gıdaların bayatlamasına olan katkısı nedeniyle genellikle istenmeyen etkilere sahiptir. Bununla birlikte kahvaltılık tahıllar, yarı haşlanmış pirinç ve kurutulmuş patates püresi üretimi gibi bazı uygulamalarda yapısal, mekanik duyu özelliklerin modifikasyonu ve ayrıca retrograde nişastanın daha yavaş enzimatik sindirimi ve glikozun kan akışına orta düzeyde salınmasını sağlayıcı rolü ile besinsel önem açısından arzu edilebilir özellikler gösterebilmektedir (Wang ve diğ. 2015).

Ekşi hamur kullanımı üründe; pH'yı düşürerek mikrobiyal gelişimi sınırlandırmakta ve laktik asit fermantasyonu sırasında nişastanın parçalanması ile bayatlamayı geciktirerek raf ömrünü arttırmaktadır (Fernández-Peláez ve diğ. 2020). Yunan peynirinden izole edilen *Lacc. paracasei* K5 suşunun inoküle edilmesiyle hazırlanan ön hamur 30 °C'de fermente edilip yeniden tazelenerek fermentasyona bırakılmıştır. Elde edilen ekşi hamur sırasıyla %20 ve 30 olmak üzere kullanılarak L1

ve L2 ekmekleri üretiminde kullanılmıştır. Bu ekmeklerin makroskobik incelemesi sonucu rop bozunması 15 ve 16. günlerde tespit edilmiştir. Yerel bir fırından sağlanan yabani mikrofloralı ekşi hamurun %20 ve %30 oranında kullanıldığı kontrol ekmeklerinde ise bozunma 10 ve 11. günde meydana gelmiştir. L1 ve L2 ekmeklerinin daha uzun raf ömrü laktik ve asetik asitin yüksek konsantrasyonları ile ilişkili olup antimikrobiyal aktivite göstererek rop bozunmasını geciktirmiştir (Mantzourani ve diğ. 2019).

Yapılan bir diğer çalışmada kontrol ekmeğinde NaCl azaltımına dayalı iki günlük raf ömrü kaybı, düşük tuzlu ekmeğe *Lb. amylovorus* DSM19280 antifungal suşu içeren %6 oranında ekşi hamurun eklenmesiyle telafi edilebilmiştir (Belz ve diğ. 2019).

#### **2.2.3.4 Beslenme ve Sindirim Üzerine Ekşi Hamurun Etkisi**

##### **FODMAP Azaltılması**

Bilindiği üzere buğday insan tüketimi için önemli bir temel gıdadır ve buğday gıda ürünlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla beraber buğday ve önemli bir proteini olan gluten içeren ürünler cilt sorunları, yorgunluk, migren, obezite, otizm ve gastrointestinal rahatsızlıklar gibi çok çeşitli durumlarla ilişkilendirilmiştir (Graça ve diğ. 2021; Muir ve diğ. 2019). Bu durum dünya çapında bunların tüketimini azalmış ve glutensiz ürünlere olan talebin önemli ölçüde artmasına yol açmıştır (Graça ve diğ. 2021).

Çölyak hastalığında (ÇH) görülen gluten intoleransı önemli rahatsızlıkların başında gelmektedir ve popülasyonun %1'ini etkilemektedir. İnce bağırsak mukozasında ishal, kabızlık, şişkinlik, bulantı ve kusma gibi akut yan etkilere ve uzun vadede kullanıma bağlı olarak vitamin, mineral gibi maddelerin malabsorbsiyonuna sebep olur (Aljada ve diğ. 2021). Mevcut tedavi buğday başta olmak üzere çavdar, arpa gibi gluten içeren ürünlerin tüketilmediği diyet uygulanmasıdır ( Foschia ve diğ. 2016).

Yapılan çalışmalar gastrointestinal bozuklukları tetikleyen tek suçlunun gluten olmadığını ortaya koymuştur (Graça ve diğ. 2021). Buğdayda ve gluten içeren

gıdalarda gluten ile birlikte birçok bileşen bulunur. Bu bileşenler fermente edilebilir oligosakkaritler, disakkaritler, monosakkaritler ve polioller (FODMAP'ler) adı verilen kısa zincirli karbonhidrat grubunun üyeleridir (Garnweidner-Holme ve diğ. 2022). Bu gruba ait bileşiklerin belirli miktarları sindirim sistemi üzerinde olumlu etkiye sahiptir. İnce bağırsakta sindirimi gerçekleşmeyen FODMAP'lerin fazlası bağırsak mikrobiyotasında değişiklik ve beraberinde irritabl bağırsak sendromunu getirmiştir (Dimidi ve diğ. 2019; Pejcz ve diğ. 2023). Bu problem çölyak olmayan gluten hassasiyetininin muzdarip bireylerin en çok sahip olduğu gastrointestinal rahatsızlıktır. Dünya çapında kadınların yaklaşık %12'sinde erkeklerin ise %8,6'sı IBS'den muzdariptir ve semptomlar kadınlarda erkeklere kıyasla daha şiddetli seyretmektedir (Arora ve Chandel 2023). FODMAP'ler iki mekanizma ile semptomları arttırdığı düşünülmektedir;

- i) Bağırsak lümeninde ozmotik olarak aktif olan fruktoz gibi düşük moleküler kütleli FODMAP'lerin varlığında suyun ince bağırsağa çekilmesi ile ortaya çıkar. Sonuçta bağırsağa giren sıvının hacmi artar ve şişkinliğe neden olur. Bu durum sağlıklı kişilerde doğal bir müshil etkisi sağlarken; IBS hastalarında ishale sebep olabilir.
- ii) FODMAP'lerin bağırsak bakterilerince hızlı fermantasyonu kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) ve gaz üretimine (karbondioksit, hidrojen ve metan gibi) dolayısıyla da kolonu genişletip şişkinliğe ve rahatsızlığa neden olabilir (Menezes ve diğ. 2018).

Her ne kadar IBS hastalarında yüksek FODMAP içeren gıdaların tüketimi rahatsızlığa sebep olsa da tamamen elimine edilmesi diyet liflerinin ve çeşitli fitokimyasalların düşük alımına neden olabilir. Üstelik FODMAP'ler prebiyotik olarak işlev görürler ve bunların tamamen ortadan kaldırılması bağırsak mikrobiyotasında disbiyozla sonuçlanabilir. Tüm bunların ışığında FODMAP'lerin diyetten katı bir şekilde çıkarılması yerine esas olarak IBS semptomlarının hafifletilmesi için düşük FODMAP diyeti uygulanabilir (Arora ve Chandel 2023; Gobbetti ve diğ. 2019). %1,5-3,7 oranlarında bulunan fruktanlar temel tahıl FODMAP'leridir ve bunları fruktoz (%1,1-3,8), sorbitol (iz miktarda), mannitol (iz miktardan %1,6'ya kadar) ve rafinoz (%1,4-3,8) takip eder (Gobbetti ve diğ. 2019).



Ekşi hamurun FODMAP seviyesini azaltmanın ardındaki temel mekanizma, ekşi hamur kültürünün (özellikle mayaların) fermantasyon işlemi sırasında fruktanları parçalayabilmesidir (Muir ve diğ. 2019). Fruktanların hidrolizi, aynı zamanda sakkaroz ve rafinozu da hidrolize eden aynı enzim olan maya invertazı tarafından katalize edilir (Laurent ve diğ. 2020). Buğday ve çavdarın ekşi hamur fermantasyonu sırasında nişasta, un  $\alpha$ -amilazı tarafından maltodekstrinlere bunlar da daha sonra un  $\beta$ -amilazı tarafından fermente edilebilir karbonhidrat olan maltoza dönüştürülür (Oshiro ve diğ. 2021; Menezes ve diğ. 2018). Hamur aşamasında mikrobiyal invertaz, undaki sakkarozu hızla glikoz ve fruktoza ayırır. Glikoz enerji kaynağı olarak kullanılırken, fruktoz heterofermentatif LAB tarafından mannitole indirgenebilir. Genel olarak, sakkaroz, maltoz, glikoz ve fruktoz gibi tüm fermente edilebilir karbonhidratlar hamur fermentasyonunun ilk saatlerinde hızla tükenirken, daha yüksek derecede polimerizasyona sahip karbonhidratlar (fruktanlar gibi) daha sonra kullanılır. Uzun süreli fermantasyon, FODMAP'lerin daha belirgin bir bozunmasını sağlayabilir (Menezes ve diğ. 2018).

Boakye ve diğ. (2022) 22 farklı buğday çeşidinin yer aldığı 4 ve 12 saat süreli tip 1 ekşi hamur fermentasyonunda uzun süreli fermantasyonun fruktan ve rafinoz oranını %69'a varan oranlarda azalttığını tespit etmiştir. Ancak çalışmada mannitol artışı gözlenmiş olup laktobasillerin mannitol tüketmesi ve uygun hammadde seçimi ile mannitol içeriğinin azaltılabileceği öne sürülmüştür.

### **GI'nın Düşürülmesi**

Ekşi hamur fermantasyonu, ekmeğin GI değerini azaltabildiği için ekşi hamur buğday ekmeği, düşük glisemik indeksli (GI) bir gıda olarak kabul edilmektedir (Fang ve diğ. 2023). Ekşi hamur fermentasyonunda gıdaların glisemik indeksinin düşürülmesinde rol oynayabilecek iki potansiyel mekanizma vardır:

(i) Asitlik düzenlemesi: Ekşi hamur fermentasyonu sırasında üretilen organik asit, gıdanın pH'ını düşürür, bu da gıdalarda bulunan karbonhidratların sindirimi ve emilimini yavaşlatır (Wang ve Wang 2024). Burada esasen nişastanın sindirilebilirliğini azaltan laktik asit ve gastrik boşalma süresini uzatabilen asetik ve propiyonik asit gibi organik asitlerdir (Fang ve diğ. 2023).

(ii) Sakkarifikasyonun engellenmesi: Ekşi hamur fermantasyonu sırasında üretilen organik asitler, gıdadaki şekerlenme reaksiyonlarını inhibe edebilir. Böylece glikasyon (karbonhidratların proteinler veya yağlarla birleşmesi) sürecindeki hiperglisemik reaktif maddeler oluşumu azalır (Wang ve Wang 2024).

### **Mineral Biyoyararlılığının Arttırılması**

Tahıl bazlı gıdalar K, P, Mg ve Zn gibi mineralleri içerebilirken aynı zamanda mineral emilimini azaltabilen fitik asit de içerirler. Fitik asit, kalsiyum, demir, potasyum, magnezyum, manganez ve çinko gibi minerallerle fitatlar oluşturarak onları çözünmez hale getirir (Feizollahi ve diğ. 2021). Ayrıca fitik asit, trypsin, pepsin,  $\alpha$ -amilaz ve  $\beta$ -galaktosidaz gibi enzimlerin aktivitesini de azaltır (Anastasio ve diğ. 2010).

Fitaz gibi fitik asit parçalayıcı enzimler, fitik asidin fosfomonoester bağlarını kırarak onu düşük inositol fosfat esterlerine ve inorganik fosfata dönüştürebilir. Bu enzim; tahıllarda, baklagillerde ve LAB'de dahil olmak üzere mikroorganizmalarda endojen olarak bulunur (Mohammadi-Kouchesfahani ve diğ. 2019).

Fitat içeriğini azaltmak amacıyla gıda işleme sırasında eksojen fitik asit parçalayıcı enzimlerin eklenmesi veya fitaz aktif maya, LAB veya diğer mikroorganizmaların eklenmesi düşünülebilir. Her ne kadar buğday ve çavdarda fitaz bulunsada da, aktiviteleri tam tahıllı ekmekteki mineral biyoyararlılığını arttırmak için yetersizdir (Yıldırım ve Arıcı, 2019). Ekşi hamur fermantasyonunun kullanılması fitik asit içeriğini; mikrobiyal metabolizma tarafından fitaz üretilmesiyle ve fermentasyon neticesiyle tahılın endojen enzim sistemini aktive eden pH azalışıyla etkili bir şekilde azaltabilir (Fang ve diğ. 2023). Çeşitli çalışmalar, tam buğday ekmeğindeki fitat içeriğini azaltmada ekşi hamur fermantasyonunun (%62) maya fermantasyonundan (%38) daha etkili olduğunu göstermiştir (Sakandar ve diğ. 2019).

Ekmek yapımında hücre dışı fitaz aktivitesine sahip LAB'nin bir starter kültür olarak kullanılması, hücre içi fitaz aktivitesine sahip LAB'den fitik aside kolayca erişebilirliği nedeniyle önemlidir. Buğday unu-baklagil ile hazırlanan Tip I ekşi hamurdan izole edilen *W. confusa* mk.zh95, *Pediococcus pentosaceus* mk.zh95 ve *P. pentosaceus* mk.zh96 suşlarının extraselüler fitaz aktivite gösterdiği tespit edilmiştir

(Mohammadi-Kouchesfahani ve diğ. 2019). Yapılan bir başka çalışmada ise ekşi hamur örneklerinden elde edilen LAB izolatları arasında fitaz aktivitesi en yüksek olan *Levl. brevis* HEB33 ve *Lacc. plantarum* ELB78 suşları tespit edilmiştir (Yıldırım ve Arıcı 2019).

Ayrıca LAB ve maya türlerinin kombinasyonunun fitik asit içeriğinde azalmaya neden olabileceği çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir ve bu duruma ekşi hamur mikroflorasında yer alan LAB ve maya tarafından üretilen ekstraselüler fitazların sinerjik etkisinin neden olabileceği düşünülmüştür (Alkay ve diğ. 2024). Örneğin; *S.cerevisiae* J2815, *S.cerevisiae* J2808, *Lacc. paracasei* LG0260, *Lacc. plantarum* LG1034 ve *Lc. lactis* LG0827 suşlarının tek tek veya bir maya-bir LAB suşu starter olarak kullanıldığı TipII ekşi hamurda fitik asit azalışı rapor edilmiştir. Tek tür içeren fermente ekşi hamurun fitik asit bozunma hızı, karışık kültür içeren fermente ekşi hamurun fitik asit bozunma hızından daha düşük bulunmuştur (Fang ve diğ. 2023).

Ekşi hamur prosesinde hücre dışı fitaz aktivitesi gösteren suşların kullanımı mineral biyoyararlılığı için tercih edilebilecek bir yol olabilir.

### **Tuz Azaltımı**

Tuz, hamur ve ekmeğin özelliklerinde önemli bir role sahip olan bileşendir. Mayaların aktivitesini kontrol edilmesi, gluten ağını güçlendirmesi, lezzeti iyileştiriciliği ve su aktivitesini azaltarak koruyucu olarak rol oynar. NaCl, buğday ekmeğinin duyuşal özelliklerinde etkili bir faktördür (Mollakhalili ve diğ. 2023).

Diyetteki yüksek Na tüketimi (yaklaşık 10 g/gün), felç, mide kanseri, böbrek hastalığı ve kemik demineralizasyonu riskleriyle bağlantısı olan kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyonun en önemli nedenlerindedir (Alkay ve diğ. 2024). Bu sorunların üstesinden gelebilmek amacıyla tuz tüketiminin azaltılması en önemli basamaktır. Araştırmacılar bu bağlamda farklı metot önermiştir;

- I. Monosodyum glutamat, amino asit gibi tat arttırıcılar
- II. KCl gibi tuz ikame maddesi kullanmak
- III. Tat kontrastı yoluyla NaCl algısının arttırılması

#### IV. Ekşi hamur kullanımı

Bu yöntemlerden ekşi hamur prosesi; tuz içeriğindeki azalmanın maskelenmesi ve fırınlanmış ürünleri fonksiyonel anti-hipertansif bileşiklerle zenginleştirebilmesi nedeniyle uygun bir yaklaşım olabilir (Belz 2016).

Fermantasyon sırasında aroma verici sebest amino asitler ve amino asit türevlerinin sentezi nedeniyle, LAB türüne ve suşa bağlı olarak da ekşi hamurun tuz azaltımı üzerinde telafi edici etkileri vardır (Sakandar ve diğ. 2019).

Belz ve diğ. (2019) tarafından yapılan araştırmada *Lb. amylovorus* DSM19280 ve *W. cibaria* MG1 suşlarının starter olarak kullanıldığı ekşi hamurun çeşitli oranlarda eklenmesiyle hazırlanan düşük tuz içeren ekmeklerin; raf ömrünün arttığı, daha yumuşak iç yapısı ve daha yüksek ekmek hacmine sahip olduğu ve ayrıca iyi bir duyusal profil sergilediği belirtilmiştir.

Ayrıca LAB'ler tahılların fermentasyonu sırasında fenolik asit redüktaz, fenolik asit dehidrojenaz ve glukozidaz vb. dahil olmak üzere bazı enzimleri aktive ederek hamurun toplam fenolik içeriğinin artmasına böylece hamurun antioksidan kapasitesinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Fang ve diğ. 2023).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Kullanılan Suşlar ve Gelişme Ortamları

Tez çalışması kapsamında Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Kültür Koleksiyonundan (PUFECC) 4,6 ve 4,3 alfa glukano transferaz enzimi üretici genini taşıyan ve taşımayan laktik asit bakterileri kullanılmıştır. Koleksiyondan iki basamakta nihai suş seçimi yapılmıştır. İlk olarak -80°C’de muhafaza edilen suşlar MRS veya M17 agar besiyeri ortamına (Merck, Almanya) çizilip ve 30 ve 37 °C’de inkübe edilmiştir. Gelişen tipik kolonilere 4,3 ve 4,6 alfa glukano transferaz genlerine özgü primerler çiftleri ile koloni PZR uygulanarak *gtfB* geninin varlığı kontrol edilmiştir. Uygulanan koloni PZR içeriği ve basamakları sırasıyla Tablo 3.3 ve 3.4’te özetlenmiştir.

**Tablo 3.3:** *gtfB* geni tespiti için kullanılan PZR bileşimi

PZR Bileşenleri	Miktar (µl)
5X One Taq Reaction Buffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM Forward Primer	1 µl
10 µM Reverse Primer	1 µl
Template DNA	Koloni
5X One Taq DNA Polymerase	0.5 µl
ddH <sub>2</sub> O	
<b>Toplam reaksiyon hacmi</b>	<b>50 µl</b>

**Tablo 3.4:** *gtfB* geni tespiti için kullanılan PZR döngüsü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94	1.5 dk	X 1
Denatürasyon	95	30 s	
Bağlanma	T <sub>m</sub> -5	1 dk	X 30
Uzama	68	60 s/kb	
Son Uzama	68	5 dk	X 1

Kullanılan primerler 4,3 ve 4,6 AGT enzimi genine özgü olup özellikleri Tablo 3.5’te belirtilmiştir. Elde edilen koloni PZR ürünleri %1 agaroz jelde yürütülmüş ve

jel grüntüleme sisteminde (Labourma, Fransa) görüntülenmiştir. Geni içeren suşlar pozitif [AGT (+)] içermeyenler ise negatif [AGT (-)] olarak tanımlanmıştır. Seçilen bakteri suşları ve özellikleri Tablo 3.6'da verilmiştir.

**Tablo 3.5:** PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler

	Primer	Sekans 5' - 3'	Tm (°C)
<i>Liml. reuteri</i>	GTFB1-M-ECORI-F1	ACA AGC CAG ATG GTA AGA C	52,26
	GTFB2-M-KPNI-R1	CGG TTA ACA ATA CTA	50,63
<i>Liml. fermentum</i>	GTFB1-F	ACA AGC CCA RGA TGG TAA	56,40
	GTB-B2-R	TCG CCA TTA GST AAT TT	45,20

**Tablo 3.6:** Çalışmada kullanılan bakteriyel suşlar ve özellikleri

Suş Adı	Gelişme Ortamı	Sıcaklık (°C)	Özellik
<i>Liml. reuteri</i> PFC 338	MRS Agar/Broth	37	4,6 AGT (+)
<i>Liml. reuteri</i> PSC 73	MRS Agar/Broth	37	4,6 AGT (-)
<i>Liml. fermentum</i> PFC 282	MRS Agar/Broth	30	4,3 AGT (+)
<i>Liml. fermentum</i> PFC 268	MRS Agar/Broth	30	4,3 AGT (-)

## 3.2 Ekşi Hamur Ortamı Analizleri

### 3.2.1 Ekşi Hamur Üretim Deseni ve Örnekleme

Ekşi hamur ortamında starter kültür olarak kullanılacak 4,6 ve 4,3 AGT (+) ve (-) suşlar -80°C'den MRS ortamına inoküle edilmiş ve *Liml. fermentum* için 30 °C, *Liml. reuteri* için 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu basamak iki defa tekrarlanmıştır. Gelişen suşlar 30 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücre pelleti PBS tamponu

ile tekrar çözüldürülerek yıkanmış ve santrifüj edilmiştir. Bu basamak 2 defa tekrarlanmış ve son olarak pellet PBS’de çözülmüştür. Hücrenin yoğunluğu OD<sub>600 nm</sub>’de 1 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Hamur ortamı oluşturmak amacıyla hamur verimi 200 olacak şekilde Carrefoursa marka özel amaçlı katkısız un (2023) ve musluk suyu kullanılarak master hamur oluşturulmuştur. Ardından bu hamur eşit ağırlıkta parçalara ayrılmıştır. Her hamur bir adet suş ile inoküle edilmiştir. Diğer yandan kontrol olarak ise mikroorganizma ilavesi olmayan hamur kullanılmıştır. Hamurlara bakteri inokülasyon oranları ve fermantasyon sıcaklıkları aşağıda Tablo 3.7’de verilmiştir.

**Tablo 3.7:** Ekşi hamur deneme deseni

Kontrol	Hamura İnoküle Edilen Mikroorganizma Sayısı (kob/ml)				Fermantasyon Sıcaklığı (°C)
	4,6 AGT(+)	4,6 AGT(-)	4,3 AGT(+)	4,3 AGT(-)	
-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	25
-	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	25
-	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	25
-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	30
-	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	30
-	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	30

Hamurların pH 4,5±0,1 olduğu noktada fermentasyon sonlandırılmış ve bu hamur %10 oranında yeniden hazırlanmış hamura pasajlanmıştır. Pasajlama basamağı 3 defa tekrarlanmıştır. Her pasajlama noktasında fermente hamurlardan aseptik şartlarda örnekler alınmış ve daha sonraki analizler için -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2 Ekşi Hamurların pH ve Toplam Titrasyon Asitliği Analizi

Fermantasyon sırasında hamurların pH değerinin takibi amacıyla 10 g hamur örneği 100 mL distile su içinde homojenize edilmiş ve daha sonra dijital pH metre (Isolab, 040443) ile pH değeri ölçülmüştür.

Hamurların toplam asitlik değişimi fermantasyon boyunca pH:4,5 olduğu her noktada ölçülmüştür. Kısaca 10 g örnek 100 ml distile su içerisinde çözüldürülüp kaba

filtre kağıdından geçirilmiştir. Süzüntüden 10 ml erlene alınıp üzerine 1-2 damla % 1 fenol fitaleyn damlatılıp 0,1 N NaOH ile rengi hafif uçuk pembeye dönene kadar titre edilmiştir (Lefebvre ve diğ. 2002). Örneklerin toplam titre edilebilir asitlik oranları %laktik asit olarak aşağıdaki Denklem 2'ye göre hesaplanmıştır:

$$\%Toplam Asitlik = \frac{N \times V \times F \times mEq \times 100}{G} \quad (2)$$

N: NaOH normalitesi

V: Harcanan NaOH miktarı (ml)

F: NaOH faktörü

mEq: Örnekteki organik asitin mili ekivalen ağırlığı (g) (LA: 0,090 mEq)

G: Örnek ağırlığı (g)

### 3.2.3 Ekşi Hamur Mikrobiyal Analizleri

Hamurlarda mikrobiyolojik sayımlar fermentasyonun pasajlama basamaklarında fermente hamurdan 10 g örnek alınarak gerçekleştirilmiştir. Alınan hamur 90 ml peptonlu fizyolojik tuzlu su ile homojenizatörde (Seward Medical, London, UK) homojenize edilmiş ve uygun dilüsyon oranlarına seyreltilmiştir. %0,01 sikloheksimid katkılı MRS (Merck, Almanya) ve GM17 (% 0,5 glikoz) agar ile LAB sayımı (ISO 15214 1998), Plate Count Agar (PCA) ortamında da Toplam Aerofilik Mezofilik Bakteri (TAMB) sayımı 30 °C'de 72 saat inkübasyon sonunda tespit edilmiştir (APHA 2001). Hamurdaki maya sayımı ise Dichloran Rose Bengal Chlortetracycline Agarda (DRBC agar) 25 °C'de 3-5 gün inkübasyon sonunda belirlenmiştir (Meroth ve diğ. 2003; Özel 2012).

### 3.2.4 Ekşi Hamur Denature Gradient Jel Elektrofrezisi

Fermentasyon boyunca toplanan hamurlardaki LAB çeşitliliği tespiti için kültürden bağımsız denatüre gradiyan jel elektrofrezisi (DGGE) kullanılmıştır. Bunun için hamurlardan ilk aşamada mikrobiyal genomik DNA izolasyonu



gerçekleştirilmiştir. Kısaca; 10 g hamur örneği 90 ml peptonlu fizyolojik suda homojenize edilmiştir. Bu homojenizattan 50 ml alınarak bakteri DNA'sı izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ortamdan hamuru uzaklaştırmak için 50 ml' lik homojenizat 1000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant steril falkona alınmış ve 5000 g'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulanarak üst faz uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre pelletleri PBS tamponu ile iki kez yıkanarak DNA izolasyon basamağına geçilmiştir. LAB'ların genomik DNA'sı izolasyonunda Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (Gdansk, Polonya) kullanılmıştır (Pitcher ve diğ. 1989).

PZR-DGGE analizinde, LAB için literatürde yaygın olarak yer alan %25-50 oranın aksine %30-60 oranlarında üre-formamid içeren gradiyent poliakrilamid jel kullanılmıştır. Bu oranlardaki poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılan temel bileşenlerin 100 ml için kullanılan miktarları Tablo 3.8' verilmiştir:

**Tablo 3.8:** PZR-DGGE analizinde %25, %30, %50 ve %60'luk denatüre çözeltinin hazırlanmasında kullanılan temel bileşenler ve oranları (Fischer ve Lerman 1983).

Materyal	Denatüre Çözeltinin Bileşimi			
	%25	%30	%50	%60
%40 Akrilamid/Bis (37.5:1) (ml)	20	20	20	20
50*TAE tampon (ml)	2	2	2	2
Formadid (ml)	10	12	20	24
Üre (g)	10,5	12,6	21	25,2
Steril saf su (ml)	57,5	53,4	37	28,8
Toplam hacim (ml)	100	100	100	100

Yukarıda verilen bileşenler kullanılarak 15'er ml olarak çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden ikişer ml ependorflara alınmıştır. Ayrılan çözeltilerin 1 ml'lik bir tanesine jelleşme ajanı olarak 4 µl tetrametilendiamin (temed ) (Merck, Almanya) ve 20 µl amonyum persülfat (APS) (Sigma, ABD) (0,1 g/ml) ilave edilip hızlıca cam plakaların arasına dökülerek koruyucu bir alt jel tabakası oluşturulmuştur. Kalan 13 ml'lik jellere 8 µl temed ve 106 µl APS ilave edilmiş ve karışım hızlıca gradiyent poliakrilamid jel hazırlama sisteminin (Gradient Former Bio Rad) haznesine konulmuştur ve cam plakalara arasına dolun yapılarak gradiyent jel hazırlanmıştır.

Polimerleşen jeller +4 °C’de bir gece bekletildikten sonra sıcaklık kontrollü dikey elektroforez (Thermo) sisteminde kullanılmıştır.

Genomik DNA izolasyonunun ardından bakterilerin 16S rDNA V3 bölgesi, 3’ terminal ucunda GC takılı P338 ön primer (5’-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3’) ve P518 geri primer (5’-ATTACCGCGGCTGCTGG-3’) primerleri ile çoğaltılmıştır (Van der Meulen ve diğ. 2007). PZR içeriği olarak 8 µl master mix (5\*FIREPolR Master Mix/ SOLIS Bio Dyne, Tartu, Estonya), 1µl F338 primer, 1µl 518R primer ve 2µl genomik DNA ile hazırlanmıştır ve toplam hacim steril ultra saf su ile 40 µl ‘ye tamamlanmıştır. Başlangıç denatürasyonunun 95 °C 12 dakikada gerçekleştiği ve ardından 95 °C’de 20 saniye denatürasyon, 55 °C’de 45 saniye annealing ve 72 °C’de 1 dakika uzatma içeren 30 döngü ve son uzatma 72 °C’de 5 dakika olduğu PZR programı uygulanmıştır. PZR ürünleri 60 °C sabit sıcaklıkta 15 dakika 50 V ve 4 saat 150 V olacak şekilde %30-60 aralığında denatürant (7M üre ve %40 formamid) içeren poliakrilamid jelde yürütülerek ayrılmaları sağlanmıştır. Daha sonra jeller SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, ABD) ile boyanarak jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Miambi ve diğ. 2003; Van der Meulen ve diğ. 2007; Oguntoyinbo ve Dodd 2010).

### 3.2.5 Ekşi Hamur Metagenom Analizi

Biy çeşitliliğin tür düzeyinde tanımlanması için üçüncü pasajlamadan sonra pH 4,5’a ulaştığında alınan hamur örneklerinden kütüphane oluşturmak amacıyla DNA izolasyonu yapılmış ve genomik DNA kalite kontrolü yapılmıştır. Kütüphane oluşturmak için, 16S rRNA geni spesifik primerler ile çoğaltırılıp sonra saflaştırma yapılmıştır. İndex PZR aşamasında, illumina ikili indeksler ve adaptörler Nextera XT index kiti kullanılarak eklenmiş ve sonra saflaştırma yapılmıştır. Real time PCR ile oluşturulan kütüphanelerin konsantrasyonu ölçülüp 4 nM’a seyreltilerek normalizasyonu yapılmıştır. Normalizasyonu yapılmış olan örnekler havuzlama (pooling) yöntemi ile birleştirilmiştir. Kütüphane hazırlandıktan sonra sequencing by synthesis yöntemi ile her yeni dNTP eklendiğinde, eklenen bazın floresan ışınması optik olarak gözlemlenip kaydedilmiştir. Sekanslama sonrasında üretilmiş olan veri, analiz için ham veri FASTQ formatına dönüştürülmüştür. Ham verilerin elde edilmesinden sonraki tüm analizler QIIME 2 ile gerçekleştirilmiştir. Taksonomik analizler için

SILVA database kullanılmıştır. Verilerin kalite kontrolünün ardından kimerik okumalar belirlenmiş, phred skorları 20'den küçük olan okumaların, primer ve barkodların kimerik okumaların filtrelenmesi ile OTU'lar elde edilmiştir. Elde edilen OTU'ların taksonomik sınıflandırılması SILVA veri tabanı aracılığıyla yapılmıştır. QIIME 2 bünyesinde yer alan pipelineler kullanılarak alpha ve beta seyreltme analizleri yapılmıştır (Bolyen ve diğ. 2018).

### 3.3 Ekşi Hamur Örnekleri ile Ekmek Üretimi

Ekşi hamur ekmeği üretimi; starter olarak kullanılacak ekşi hamurun üretilmesi ve bu hamurun da bir bileşen olarak kullanılıp ekmek üretiminin yapıldığı iki temel basamağı içermektedir. İlk olarak hamur verimi 200 olacak şekilde un ve sudan oluşan master hamurun hazırlanması ve kontrol hamuru hariç diğer hamurların gramında  $10^6$  kob bakteri olan süspansiyonun inokülasyonu ile yapılmıştır. Burada her bir hamur bir adet starter bakteri içermektedir. 30 °C'de fermentasyona bırakılan hamurlar 12 saatlik zaman periyotlarında yeni hazırlanan hamur ortamına %10 oranında pasajlanmıştır. Üçüncü pasajlamayı takip eden 12 saat sonra ekmek üretimi basamağına geçilmiştir. Ayrıca pasajlama basamaklarında preferment hamurdan örnekler alınmıştır.

Ekmek hamuru da Carrefoursa marka özel amaçlı katkısız un ile hazırlanmıştır. %14 nem esasına göre un tartılmış ve karıştırıcının (Kitchen Aid, ABD) yoğurma kabına konulmuştur. Üzerine %2 yaş maya (Pakmaya, İzmit) ve %1,5 tuz (Billur Tuz, İzmir) eklenerek düşük hızda 1 dakika kadar karıştırılmıştır. Katı faz karıştırıldıktan sonra %15 ekşi hamur ve su konularak 5 dakika yoğrulmuştur. Hamur %80'in üzerindeki nişpi rutubetteki fermantasyon dolabında ve kitle fermantasyonuna tabi tutulmuştur. Ardından 160 g'lık bezelere ayrılıp elle katlanarak havalandırılıp 10 dk daha fermantasyon dolabında bekletilmiştir. Şekil verme işlemi uygulanıp özel kalıplara alınan hamurlar 30 °C'de 45 dakika son fermantasyonun ardından 220 °C'de 17 dakika pişirilmiştir (Elgün ve diğ. 2012; Plessas ve diğ. 2011).

### **3.3.1 Preferment Hamurda Vizkozite Tayini**

Hamurda viskozite tayini 0. gün ve ekmek hamuruna inoküle edilecek preferment hamurlarda viskozimetre cihazı kullanılarak (Brookfield Model No: RVDV-II, İngiltere ) gerçekleştirilmiştir. 25 °C’de yapılan ölçümler için SC 14 nolu prob kullanılmıştır (Dan ve diğ. 2022; Coda ve diğ. 2018)

### **3.4 Ekşi Hamur Ekmek Analizleri**

Ticari mayaya ilaveten preferment hamur kullanılarak üretilen ekmekler 220 °C’de 15-17 dakika pişirildikten sonra polietilen poşetler içinde 25 °C sıcaklıkta ve %65 nem oranına ayarlı iklimlendirme kabininde (Nüve-TK-120, Türkiye) depolanmıştır. Sadece retrograde amilopektinin termal özelliklerini belirlemek için ekmekler 4 °C sıcaklıkta tutulmuştur.

#### **3.4.1 Ekşi Hamur Ekmeklerinin Tekstür Analizi**

Ekmeklerin doku profili analizi 0., 3., 5. ve 7. günlerinde tekstür analiz cihazı (Brookfield Model No: CT3-4500, İngiltere) ile TA3/1000 silindirik prop kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekmeklerden 1,8 mm kalınlığında dilimler kesilmiş ve ölçümler 0,07 N’luk bir tetik yükü ve 1 mm/s’lik bir test hızı kullanılarak iki döngü olarak uygulanmıştır. Kaydedilen doku parametreleri sertlik, çiğnenebilirlik, yapışkanlık ve sakızimsılıktır (Demirkesen-Bicak ve diğ. 2021; Sun ve diğ. 2022).

#### **3.4.2 Ekşi Hamur Ekmeklerinin Spesifik Hacimleri**

Ekşi hamur ekmekleri oda sıcaklığına geldikten sonra ağırlık ve hacmi kolza tohumu ile yer değiştirme esasına göre ölçülmüştür. Hacim değeri ağırlığa bölünerek spesifik hacim değeri elde edilmiştir (Elgün ve diğ. 2012).

### 3.4.3 Ekşi Hamur Ekmeklerinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Retrograde amilopektinin erime noktası ekmeklerin 0. gün ile, 3., 5. ve 7. gün sürelerinde +4 °C'de yüksek yoğunluklu polietilen poşette depolanan ekmek numunelerinde tespit edilmiştir. Analiz dakikada 5°C artış olacak şekilde 25-135 °C aralığında argon gazı atmosferinde 3,2 mg ekmek içi kullanılarak Pelkin Elmer DSC cihazı (Seteram DSC131 EVO, Fransa) ile gerçekleştirilmiştir (Kotsiou ve diğ. 2022).

### 3.4.4 Ekşi Hamur Ekmeklerinin Glisemik İndeks Değerinin Belirlenmesi

Ekmeklerin tahmini glisemik indeksi (eGI), Englyst ve diğ. (1992) ve Yaman ve diğ. (2019) tarafından belirtilen yöntemlere göre belirlenmiştir. Glisemik indeksi *in vitro* belirlemek için 1 g homojenize ekmek örneği 5 ml deiyonize su ile karıştırılmıştır. Daha sonra numuneye 10 ml pepsin-guar gum çözeltisi ilave edilmiş ve 37 °C'de çalkalayıcı su banyosunda (175 rpm) 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, 0,5 M sodyum asetat solüsyonu (5,0 ml) ilave edilmiş ve pH 5 ile 5,25 arasına ayarlanmıştır. Pankreatin ve amiloglikozidaz (13,4 U/ml) içeren bir enzim solüsyonu eklenmiş ve hacim deiyonize su ile 50 ml'ye ayarlanmıştır. Daha sonra örnek çalkalamalı su banyosunda 180 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında 20, 30, 60, 90, 120 ve 180. dakikalarda 0,5 ml numuneler alınarak ayrı test tüplerine yerleştirilmiştir. Test tüpleri, enzimlerin denatürasyonunu sağlamak için 5 dakika kaynar su banyosuna yerleştirilmiştir. Daha sonra son hacim deiyonize su kullanılarak 5 ml'ye ayarlanmış ve örnekler 4000 xg'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Bundan sonra, süpernatantın glikoz içeriği, 510 nm dalga boyunda bir spektrofotometre (Shimadzu UV-1800, Japonya) ile GOPOD-formatlı K-GLUC (Megazyme International Ireland Ltd.) test kiti kullanılarak belirlenmiştir.

eGI, her örneğin hidroliz indeksi (HI) değerinden hesaplanmıştır. Yerel piyasadan temin edilen beyaz ekmek alanının hidroliz eğrisi altında kalan alanın bölünmesiyle HI değeri elde edilmiştir. eGI, Goñi ve diğ. (1997) tarafından tarif edildiği gibi aşağıdaki Denklem 3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$GI = 39,71 + 0,549 \times HI \quad (3)$$

### 3.4.5 Ekşi Hamur Ekmeklerinin Duyusal Analiz

Ekmeklerin duyusal özellikleri 7 skala hedonik test kullanılarak yaşları 18-60 aralığında değişen eğitimsiz panelistlerin eşliğinde gerçekleştirilmiştir. Pişirilip soğutulan ekmekler plastik tabaklarda 1,8 mm kalınlığında dilimler halinde kesilip panelistlere sunulmuştur. Bu amaçla kullanılan form Ek A'da verilmiştir.

### 3.5 4,6 ve 4,3 $\alpha$ -Glukanotransferazların Fıncılık Ürünlerinde Kullanılması ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada daha önceden rekombinat *Lc. lactis* suşu tarafından üretilen iki farklı 4,6 ve 4,3  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimlerinin fıncılık ürünlerinde bayatlamının geciktirilmesi ve/veya glisemik indeksin düşürülmesi yönünde etkili olup olmadığı, fıncılık ürünleri içerisinde oldukça önemli oranda tüketimi olan roll ekmek ve poğaçaya üretimleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 4 U /g un aktiviteye sahip olacak şekilde liyofilize enzim örneği (Bu oran Li ve diğ. (2018)'nin yaptığı çalışmada g nişasta olarak kullanılmıştır) kullanılmış iki deney örneği (4,6 Gtaz+ ve 4,3 Gtaz+) ile enzim içermeyen kontrol örneğinin (C) üretimi gerçekleştirilmiştir. Her bir üretim en az 3 kez tekrarlanmıştır.

#### 3.5.1 Roll Ekmek Üretimi

Üretimde kullanılan su miktarı Farinograf analiz sonucunda belirlenen su kaldırma kapasitesi dikkate alınarak %2 eksisine denk gelen miktar yer verilmiştir. Sıvı faz dengesinin bozulmaması için deneme deseni gereğince ilave edilmiş sıvı enzim miktarı (ml) kadar su miktarından düşülmüştür. Un esaslı olarak Tablo 3.9'da belirtilen bileşenler direkt hamur metoduyla mikserde (KitchenAid, Amerika) 10 dakika yoğrulmuştur. Elde edilen hamur  $50 \pm 2$  gram kesilerek yuvarlak haline getirilmiştir. Hamurlar %80'in üzerindeki nisbi rutubetteki fermantasyon dolabında ve  $30^\circ\text{C}$  sıcaklıkta 30 dakika fermantasyona bırakılmıştır. Daha sonra elde katlanmak

suretiyle gaz uzaklaştırma ve havalandırılarak roll şekil verme işleminden sonra tavalara yerleştirilmiş ve son fermantasyona bırakılmıştır. Hamur yüksekliğinden 1,5 cm yukarıda oluncaya kadar bekletilerek (%90 NR) son fermantasyon süreleri tespit edilmiştir. 200 °C’de 15 dakika hava sirkülasyonlu fırında (ASL, APF-50 Model, Konya) pişirilmiştir.

### 3.5.2 Poğaçı Üretimi

Poğaçı üretiminde Tablo 3.9’da belirtilen bileşenlere yer verilmiştir. Un, katı yağ (susuz bitkisel kat yağ), şeker ve tuz mikserde karışım pütürlü olana değin mikserde karıştırılmıştır. Yumurta, maya ve su ilavesi ile 4 dakika yoğurularak tam özleşmemiş halde hamur elde edilmiştir. 15 dakika kitle fermantasyona (30 °C %85 NR) bırakılmıştır. 50±2 g halinde kesilip yuvarlak haline getirilmiştir. 5 dakika fermantasyon sonrasında poğaçı şekil verilerek tava tepsilere dizilmiştir. 90 dakika son fermantasyon sonrası yüzeyi fırça ile yumurta sarısı sürüldükten sonra 200 °C’de ısıtılmış fırında 20 dakika pişirilmiştir.

**Tablo 3.9:** Ekmek ve poğaçı üretiminde un esasına göre kullanılmış formülasyon

Bileşenler	Roll Ekmek %	Poğaçı %
Un	100	100
Su	x-2	40
Tuz	1	2
Maya	2	5
Katı yağ	-	50
Şeker	-	5
Yumurta	-	20

X: Farinografta belirlenen su miktarı

### 3.5.3 Ekmek ve Poğaçı Örneklerinin Spesifik Hacminin Belirlenmesi

Roll ekmek ve poğaçı oda sıcaklığına geldikten sonra spesifik hacimleri bölüm 3.4.2’de belirtildiği şekilde ölçülmüştür.

### **3.5.4 Ekmek ve Poğaçanın Örneklerinin Tekstür Özelliklerinin Belirlenmesi**

Roll ekmeklerde tekstür profil analizi, tekstür analiz cihazı (Brookfield Model No: CT3-4500, İngiltere) ile AACC 30 silindir prob kullanılarak tayin edilmiştir. Ekmeklerden 30 mm'lik dilimler kesilerek 5 mm/sn hız, 10 mm dalma derinliği (yaklaşık %33 deformasyon) ve 5 g ilk algılama kuvveti kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Roll ekmeklerin sertlik, adhezif ve kohezif yapışkanlık, esneklik, elastikiyet ve çiğnenebilirlik özellikleri belirlenmiştir (Certel ve diğ. 2009).

Poğaçada sertlik (g) adhezif ve kohezif yapışkanlık, esneklik, elastikiyet ve çiğnenebilirlik özellikleri Standart Metot 74-09'e göre belirlenmiştir (AACC 2000). 1,25 cm kalınlık olacak şekilde yatay kesit alındıktan sonra merkezden ölçüm yapılmıştır. AACC 30 silindir prob kullanılmıştır. 1,7 mm/sn hız 10 mm dalma derinliği ve 5 g ilk algılama kuvveti kullanılarak ölçümler yapılmıştır (Serin ve Sayar 2016).

### **3.5.5 Ekmek ve Poğaçanın Örneklerinin Glisemik İndeks Değerlerinin Belirlenmesi**

Roll ekmek ve poğaçanın örneklerinin GI hesaplaması bölüm 3.4.4'de ifade edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **3.5.6 Ekmek ve Poğaçanın Örneklerinin Kalorimetrik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Kullanılan enzimlerin bayatlama üzerine geciktirici özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla ekmek ve poğaçanın örneklerinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik (DSC) analiz ile entalpi değerleri ölçülmüştür. 4 °C'de depolanan roll ekmek ve poğaçanın örnekleri 0, 3, ve 7. günlerde DSC analizi (Perkin Elmer Pyris 6 DSC) gerçekleştirilmiştir. Kap sıcaklığı 20'den 130 °C'ye kadar 5 °C/dk artış şeklinde ısıya maruz bırakılmış 40 ve 80 °C arasındaki alanlar hesaplanarak entalpi değerleri hesaplanmıştır (Sereti ve diğ. 2021; Kotsiou ve diğ. 2022).



### 3.5.7 Ekmek ve Poğaçanın Duyusal Analizi

Duyusal analiz, eğitilmiş panelistlerle gerçekleştirilmiştir. Panelistler Gıda Mühendisliği Bölümü akademik çalışanları ve öğrencileri arasından altı temel tada (tatlı-sakkaroz, tuzlu-NaCl, ekşi-sitrik asit, acı- kristalize kafein, metalik- demir II sülfat heptahidrat ve umami- monosodyumglutamat) dayalı ön panel sonrası seçilmiştir. Seçilen 10 panelist roll ekmek ve poğaçanın ürünlerinde duyusal özellikler açısından değerlendirme yetisinin geliştirilmesi için ürünler üzerinde uygulamalı eğitime alınmıştır.

Duyusal değerlendirme denemelerinde roll ekmekler dilimlenerek (kalınlık 15 mm), poğaçalar ise 4 eşite bölünerek üç rakamla rastgele sayılarla kodlanarak panelistlere sunulmuştur. Ekmeklerin baş ve son kısımları kullanılmamıştır.

Duyusal analiz için panelistlerden roll ekmeğin rengi, asit kokusu, gözenek yapısı, iç yapışkanlık tekstürü, çiğnenebilirliği, lezzeti ve genel beğeni özellikleri bakımından değerlendirmeleri istenmiştir. Poğaçanın için duyusal özelliklerin belirlenmesinde ise lezzeti, asit kokusu, yumuşaklığı, ıslaklık-kuruluğu, yutulabilirliği ve genel beğeni 1 (Çok kötü) – 5 (Çok iyi) kutucuklardan oluşan doğrusal unipolar skala ile panelistlerden değerlendirilmesi istenmiştir (Altuğ Onoğur ve Elmacı 2011).

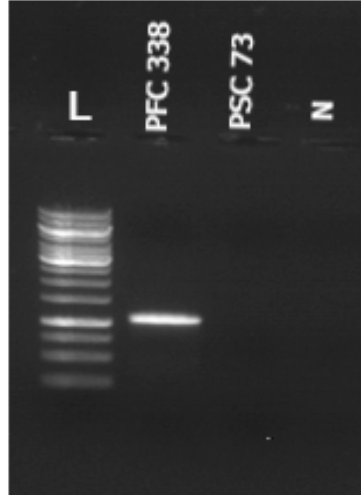
### 3.6 İstatistiksel Analiz

4,3 ve 4,6  $\alpha$ -GT üretici olan ve olmayan suşların kullanıldığı ekşi hamur örnekleri ve hücre dışı olarak üretilen 4,6 ve 4,3  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimlerinin roll ekmek ve poğaçanın üretiminde kullanılması sonucu üretilen örneklerin spesifik hacim, renk ve tekstürel özellikler ile glisemik indeks ve entalpi değerleri bakımından istatistiksel farklılık ( $p \leq 0,05$ ) hazır paket program (Minitab 18) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmış ve gruplar arasındaki farklılıklar Tukey's çoklu karşılaştırma metodu ile belirlenmiştir.

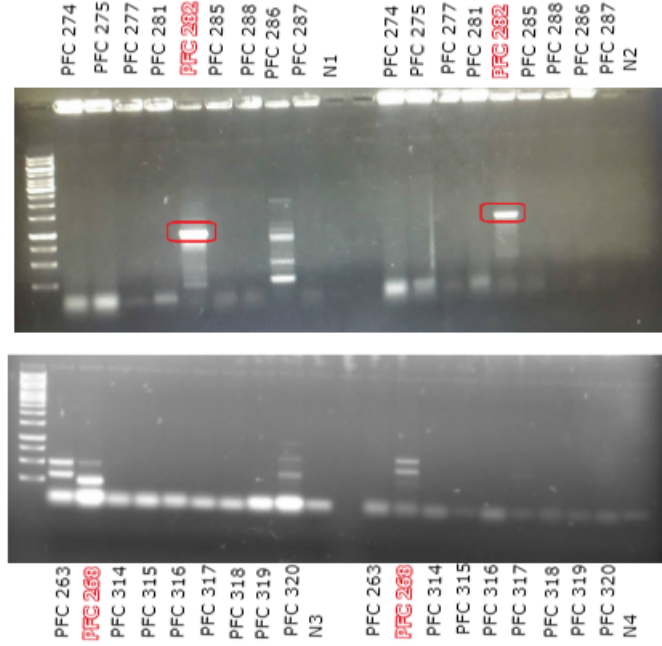
## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1 Bakteriyel Suşların 4,6 ve 4,3 $\alpha$ -Glukanotransferaz Fenotip Özellikleri

PUFECC'den temin edilen suşların 4,6 ve 4,3  $\alpha$ -glukanotransferaz gen varlığı (+) ve yokluğu (-) sırasıyla Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir. PZR temelli yapılan bu ön çalışmada 4,6 AGT enzimi için koleksiyondan pozitif ve negatif olarak sırasıyla PFC 338 ve PSC 73 nolu *Limosilactobacillus reuteri* suşları ve 4,3 AGT enzimi için ise PFC 282 ve PFC 268 nolu *Limosilactobacillus fermentum* suşları seçilmiştir.



Şekil 4.9: 4,6 *gtfB* geninin PZR amplifiye edilmesi sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü



**Şekil 4.10:** 4,3 *gtfB* geninin PZR amplifiye edilmesi sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü

Bu sonuçlar *Limosilactobacillus reuteri* PFC 338'in 4,6 AGT ve *Limosilactobacillus fermentum* PFC 282'nin de 4,3 AGT enzimlerini üretebildiğine ve *Limosilactobacillus reuteri* PSC 73 ile *Limosilactobacillus fermentum* PFC 268 suşlarının ise ilgili genleri taşımadığından söz konusu enzimleri üretmediğine işaret etmiştir.

## 4.2 Laktobasil Suşları ile Üretilen Ekşi Hamurların Özellikleri

### 4.2.1 Ekşi Hamurların Toplam Asitlik Özellikleri

4,6 ve 4,3 AGT geni içeren ve içermeyen laktobasiller ile  $10^2$ ,  $10^4$  ve  $10^6$  kob/g aşılıp 25 ve 30 °C'de fermantasyona tabi tutulan hamurların pH  $4,5 \pm 0,1$  noktasındaki toplam titre edilebilir asit (TTA) miktarı sırasıyla Tablo 4.10 ve 4.11'de % laktik asit cinsinden verilmiştir. Fermentasyonun başlangıcında hamurların pH'sı 6,28-6,30 aralığında olup bu esnadaki TTA henüz asit gelişimi olmadığından %0,18-0,20 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.10'da verildiği üzere 25 °C sıcaklıkta fermente edilen hamurların asitlik değişimi incelendiğinde  $10^2$  kob/g 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil inokülasyonu ile fermente edilen hamurların kontrol hamuru ile benzer asitlik gelişimi gösterdiği ve bu durumun 2. pasaj sonuna kadar devam ettiği görülmektedir. Fermentasyonun tamamlandığı son pasajlama basamağında ise 4,6 AGT (-) ile hazırlanan hamurun kontrol hamuru ve 4,6 AGT (+) suş ile hazırlanan hamurdan daha yüksek asitliğe sahip olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasillerin artan inokülasyon oranı ( $10^4$ ) 0. pasajın sonunda kontrole göre daha yüksek bir TTA ile sonuçlanmış olsa da fermentasyon tamamlandığında kontrol hamuru ve 4,6 AGT (+) suş ile fermente edilen hamurların asitliğinin sırasıyla % 0,44 ve % 0,42 olarak benzer olduğu görülmüştür. Bir diğer inokülasyon  $10^6$  kob/g olduğunda ise hamurlarda beklendiği üzere 0. pasajda kontrole göre yüksek asitlikler 4,6 AGT (+) ve (-) suşlar ile aşıl原因an hamurlarda gözlenmiş olup, hamurların fermentasyonu sonlandırıldığında ise asitlik her iki laktobasil ilavesinde kontrol hamuru ile istatistiksel açıdan anlamlı bir farka sahip olmayıp diğer iki inokülasyon oranlarına göre daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak 25 °C'de fermente edilen hamurlar arasında kontrol hamuru asitliği %0,44 ile 4,6 AGT (-) laktobasillerin farklı oranları inoküle edilerek hazırlanan fermentasyonunu tamamlamış hamurlardan daha düşük olmuştur. 4,6 AGT (+) suşun inokülasyon oranı artışı asitlik üzerinde daha az etkili iken, 4,6 AGT (-) suşu içeren hamurlarda aksine asitlik üzerinde daha yüksek etki göstermiştir.

25 °C sıcaklıkta 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasillerin ilavesi ile gerçekleştirilen deneme deseninde ise;  $10^2$  kob/g inokülasyonun 4,3 AGT (+) suşunun ilave edildiği hamurun tüm pasajlarında kontrol hamuru ile benzer asitlik gelişimine sahip olduğu görülmüştür. Bununla beraber 4,3 AGT (-) suşun ilave edildiği hamurda ise 2. pasaj sonu hariç tüm pasajlarda kontrol hamuru ile istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Her iki laktobasilin  $10^4$  kob/g inokülasyonunda ise hamurların kendi pasajları arasında düşük düzeyde dalgalanmalar söz konusu olmuştur. En yüksek asitlik 4,3 AGT (+) suşu ile hazırlanan hamurlarda % 0,71 ile  $10^6$  kob/g inokülasyonda ölçülürken bu durumun tersi 4,3 AGT (-) suşu içeren hamurlar için görülmüştür. Genel olarak inokülasyon oranı artışı 4,3 AGT (+) suşu içeren hamurlarda asitliğin yükselmesine, 4,3 AGT(-) suşu içeren hamurlarda ise düşmesine neden olmuştur (Tablo 4.11).

**Tablo 4.10:** 25°C’de 4,6 AGT (+) ve (-) suşları ile fermente edilen ve kontrol hamurlarının TTA değerleri (% Laktik Asit cinsinden)

10 <sup>2</sup> İNOKÜLASYON				
25 °C	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	0,65+0,02 <sup>Aa</sup>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,65+0,04 <sup>Aa</sup>	0,44+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,6 AGT(+)</b>	0,62+0,03 <sup>Aa</sup>	0,60+0,06 <sup>Aa</sup>	0,44+0,01 <sup>Ba</sup>	0,42+0,00 <sup>Ba</sup>
<b>4,6 AGT(-)</b>	0,55+0,02 <sup>Aa</sup>	0,56+0,02 <sup>Aa</sup>	0,45+0,03 <sup>Ba</sup>	0,45+0,03 <sup>Bb</sup>
10 <sup>4</sup> İNOKÜLASYON				
25 °C	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	0,65+0,02 <sup>Aa</sup>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,65+0,04 <sup>Aa</sup>	0,44+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,6 AGT(+)</b>	0,80+0,05 <sup>Ab</sup>	0,76+0,06 <sup>Ab</sup>	0,50+0,01 <sup>Ba</sup>	0,42+0,01 <sup>Bab</sup>
<b>4,6 AGT(-)</b>	0,85+0,01 <sup>Ab</sup>	0,67+0,03 <sup>Bab</sup>	0,63+0,01 <sup>Ba</sup>	0,59+0,03 <sup>Cb</sup>
10 <sup>6</sup> İNOKÜLASYON				
25 °C	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	0,65+0,02 <sup>Aa</sup>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,65+0,04 <sup>Aa</sup>	0,44+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,6 AGT(+)</b>	1,02+0,04 <sup>Ab</sup>	1,00+0,03 <sup>ABb</sup>	0,73+0,12 <sup>Ba</sup>	0,70+0,01 <sup>Cb</sup>
<b>4,6 AGT(-)</b>	1,06+0,07 <sup>Ab</sup>	1,03+0,04 <sup>Ab</sup>	0,90+0,03 <sup>Aa</sup>	0,85+0,04 <sup>Bb</sup>

\*Her inokülasyon oranında aynı sütündeki küçük harfler örneklerin kendi arasında ve her satırda büyük harfler örneğin kendi pasajları arasında istatistiksel açıdan farklılığını ifade eder (p<0,05).

\*\*Sonaçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

**Tablo 4.11:** 25 °C’de 4,3 AGT (+) ve (-) suşları ile fermente edilen ve kontrol hamurlarının TTA değerleri (% Laktik Asit cinsinden)

10 <sup>2</sup> İNOKÜLASYON				
25 °C	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	0,65+0,02 <sup>Aa</sup>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,65+0,04 <sup>Aa</sup>	0,44+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,3 AGT(+)</b>	0,64+0,03 <sup>Aa</sup>	0,65+0,11 <sup>BAa</sup>	0,66+0,09 <sup>Aa</sup>	0,59+0,01 <sup>Aa</sup>
<b>4,3 AGT(-)</b>	0,94+0,02 <sup>Ab</sup>	0,84+0,04 <sup>ABb</sup>	0,52+0,03 <sup>Ca</sup>	0,59+0,09 <sup>BCb</sup>
10 <sup>4</sup> İNOKÜLASYON				
25 °C	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	0,65+0,02 <sup>Aa</sup>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,65+0,04 <sup>Aa</sup>	0,44+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,3 AGT(+)</b>	0,65+0,03 <sup>BAa</sup>	0,66+0,05 <sup>Aa</sup>	0,56+0,01 <sup>Aa</sup>	0,63+0,08 <sup>Ab</sup>
<b>4,3 AGT(-)</b>	0,52+0,01 <sup>Ab</sup>	0,56+0,05 <sup>Aa</sup>	0,52+0,01 <sup>Aa</sup>	0,58+0,05 <sup>Aab</sup>
10 <sup>6</sup> İNOKÜLASYON				
25 °C	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	0,65+0,02 <sup>Aa</sup>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,65+0,04 <sup>Aa</sup>	0,44+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,3 AGT(+)</b>	0,43+0,01 <sup>Ab</sup>	0,50+0,03 <sup>ABa</sup>	0,53+0,04 <sup>ABab</sup>	0,71+0,13 <sup>Bb</sup>
<b>4,3 AGT(-)</b>	0,46+0,05 <sup>Ab</sup>	0,48+0,03 <sup>Aa</sup>	0,45+0,00 <sup>Ab</sup>	0,40+0,04 <sup>Aa</sup>

\*Her inokülasyon oranında aynı sütündeki küçük harfler örneklerin kendi arasında ve her satırda büyük harfler örneğin kendi pasajları arasında istatistiksel açıdan farklılığını ifade eder (p<0,05).

\*\*Sonaçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

30 °C’de fermente edilen hamurlarda 10<sup>2</sup> kob/g laktobasil inokülasyon oranının 4,6 AGT (+) suşu ile hazırlanan hamurda 1. pasaj sonu hariç 4,6 AGT (-) suşu ilave edilen hamurda ise tüm pasaj sonlarında kontrol hamuruyla benzer asitliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu durumda 30 °C’de bu inokülasyon oranında 4,6 AGT (+) suş %0,48 ile en düşük, 4,6 AGT (-) suş ise %0,69 ile en yüksek TTA’ya sahiptir.

Fermentasyon sonlandırıldığında yüksek sıcaklıkta fermente edilen 4,6 AGT (+) hamur için başlangıç laktobasil inokülasyonu arttıkça asitliğin %0,56'dan ( $10^4$ ) %0,71'e ( $10^6$ ) yükseldiği görülmüş, 4,6 AGT (-) suşu içeren hamur için her iki durumda da TTA %0,53 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmasa da 30 °C'de fermente edilen hamurlarda; 4,6 AGT (+) suşun inokülasyon oranı arttıkça hamurlarda asitlik artmış, 4,6 AGT (-) suşun bulunduğu hamurlarda ise tam tersi durum söz konusu olmuştur (Tablo 4.12).

4,3 AGT enzimlerini içeren örnekleme modelinde ise; 30 °C'de fermente edilen hamurların tüm inokülasyon oranlarında pasajlamalar arasında TTA açısından düşük seviyede dalgalanmalar olmuştur.  $10^2$  kob/g inokülasyonda 4,3 AGT (+) suşu içeren hamurun %0,63 olan TTA'sı  $10^4$  ve  $10^6$  kob/g inokülasyon oranlarında sırasıyla % 0,58 ve % 0,56 olarak ölçülmüştür. Benzer durum 4,3 AGT (-) suşu içeren hamurlarda da ortaya çıkmıştır ve asitliğin  $10^2$  kob/g inokülasyon oranında %0,61'den,  $10^6$  kob/g inokülasyonda TTA'nın 0,54'e düştüğü görülmüştür. Sonuç olarak 4,3 AGT(+) ve (-) suşlarının aşılandığı hamurlarda inokülasyon oranı artışı daha düşük asitlik gelişimi ile sonuçlanmıştır (Tablo 4.13).

Kullanılan un tipi ve uygulanan yöntemle göre ekşi hamur pH değeri ve dolayısıyla TTA değeri değişebilmektedir. 2016 yılında yürütülen ekşi hamur sistemi çalışmasında TTA 24. saatin sonunda % 0,13-0,60 olarak tespit edilmiştir (Ekinci ve diğ. 2016). 2021 yılında yapılan bir çalışmada ise Isparta ilinden temin edilen ekşi hamurların pH değeri 3,57-3,74 arasında olup TTA % laktik asit cinsinden 1,26-0,76 olarak tespit edilmiştir (Sümbül 2021).

**Tablo 4.12:** 30 °C’de 4,6 AGT (+) ve (-) suşları ile fermente edilen ve kontrol hamurlarının TTA değerleri (% Laktik Asit cinsinden)

<b>10<sup>2</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>30 °C</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,62+0,02 <sup>Aa</sup>	0,48+0,01 <sup>Ba</sup>	0,48+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,6 AGT(+)</b>	0,59+0,03 <sup>Aa</sup>	0,49+0,03 <sup>Ab</sup>	0,49+0,00 <sup>Aa</sup>	0,48+0,06 <sup>Aa</sup>
<b>4,6 AGT(-)</b>	0,70+0,09 <sup>Aa</sup>	0,60+0,01 <sup>Aa</sup>	0,53+0,02 <sup>Aa</sup>	0,69+0,13 <sup>Aa</sup>
<b>10<sup>4</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>30 °C</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,62+0,02 <sup>Aa</sup>	0,48+0,01 <sup>Ba</sup>	0,48+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,6 AGT(+)</b>	0,61+0,04 <sup>Aa</sup>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,56+0,01 <sup>Aa</sup>	0,56+0,00 <sup>Aa</sup>
<b>4,6 AGT(-)</b>	0,59+0,03 <sup>Aa</sup>	0,53+0,08 <sup>Aa</sup>	0,51+0,02 <sup>Aa</sup>	0,53+0,01 <sup>Aa</sup>
<b>10<sup>6</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>30 °C</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,62+0,02 <sup>Aa</sup>	0,48+0,01 <sup>Ba</sup>	0,48+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,6 AGT(+)</b>	0,68+0,09 <sup>Aa</sup>	0,72+0,01 <sup>Aa</sup>	0,72+0,03 <sup>Ab</sup>	0,71+0,06 <sup>Aa</sup>
<b>4,6 AGT(-)</b>	0,59+0,02 <sup>Aa</sup>	0,57+0,10 <sup>Aa</sup>	0,49+0,02 <sup>Aa</sup>	0,53+0,05 <sup>Aa</sup>

\*Her inokülasyon oranında aynı sütundaki küçük harfler örneklerin kendi arasında ve her satırda büyük harfler örneğin kendi pasajları arasında istatistiksel açıdan farklılığını ifade eder (p<0,05).

\*\*Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

**Tablo 4.13:** 30 °C’de 4,3 AGT (+) ve (-) suşları ile fermente edilen ve kontrol hamurlarının TTA değerleri (% Laktik Asit cinsinden)

<b>10<sup>2</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>30 °C</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,62+0,02 <sup>Aa</sup>	0,48+0,01 <sup>Ba</sup>	0,48+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,3 AGT(+)</b>	0,59+0,03 <sup>Aa</sup>	0,54+0,05 <sup>Aa</sup>	0,59+0,04 <sup>Ab</sup>	0,63+0,08 <sup>Aa</sup>
<b>4,3 AGT(-)</b>	0,58+0,04 <sup>Aa</sup>	0,51+0,02 <sup>Aa</sup>	0,50+0,04 <sup>Aab</sup>	0,61+0,05 <sup>Aa</sup>
<b>10<sup>4</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>30 °C</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,62+0,02 <sup>Aa</sup>	0,48+0,01 <sup>Ba</sup>	0,48+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,3 AGT(+)</b>	0,58+0,02 <sup>Aa</sup>	0,57+0,04 <sup>Aa</sup>	0,57+0,02 <sup>BAa</sup>	0,58+0,01 <sup>Aa</sup>
<b>4,3 AGT(-)</b>	0,66+0,03 <sup>Aa</sup>	0,72+0,02 <sup>Aa</sup>	0,63+0,09 <sup>Ab</sup>	0,60+0,05 <sup>Aa</sup>
<b>10<sup>6</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>30 °C</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	0,60+0,02 <sup>Aa</sup>	0,62+0,02 <sup>Aa</sup>	0,48+0,01 <sup>Ba</sup>	0,48+0,02 <sup>Ba</sup>
<b>4,3 AGT(+)</b>	0,40+0,03 <sup>Ab</sup>	0,64+0,02 <sup>Ba</sup>	0,57+0,01 <sup>BCb</sup>	0,56+0,04 <sup>ACa</sup>
<b>4,3 AGT(-)</b>	0,66+0,01 <sup>Aa</sup>	0,52+0,04 <sup>Aba</sup>	0,43+0,02 <sup>BCa</sup>	0,54+0,04 <sup>ACa</sup>

\*Her inokülasyon oranında aynı sütundaki küçük harfler örneklerin kendi arasında ve her satırda büyük harfler örneğin kendi pasajları arasında istatistiksel açıdan farklılığını ifade eder (p<0,05).

\*\*Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

Yılmaz (2019)’ın yaptığı bir çalışmada ekşi hamur örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin %0,79-1,48 arasında değişmekte olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde Syrokou ve diğ. (2020) tarafından Yunanistan’ın farklı bölgelerinden toplanan 13 ev tipi buğday unu ekşi hamurlarının pH değeri 3,64–5,05 olup % LA cinsinden

TTA 0,50–1,59 olarak rapor edilmiştir. Literatürdeki titrasyon asitliği analizi sonuçlarının ise %0,93 ile 1,48 arasında değiştiği bildirilmiştir (Gül 2019).

Görüldüğü üzere bu çalışmada laktobasil ilavesi yapılan ve kontrol ekşi hamurların toplam titrasyon asitliğinin daha önce rapor edilen çalışmaların çoğunluğu ile uyumlu olduğu ama bazılarında kısmen düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada dikkat çeken hususun 1. pasaj sonrası hamur fermantasyonları sonunda bir miktar azaldığı fakat 3. pasajın sonuna kadar benzer seviyede kaldığı görülmektedir. Bu durum ileri pasajlarda mikrobiotasının stabilitesinin sabitlendiğine işaret etmektedir. Kontrol hamurda ileri pasaj sayılarında asitlik miktarı düşerken, laktobasil inoküle edilen (inokülasyon oranından bağımsız) hamurlarda asitlik benzer seviye ölçülmüştür.

#### 4.2.2 Ekşi Hamurların Mikrobiyal Yüğü

Farklı inokülasyon oranlarında 4,6 ve 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasillerin kullanıldığı, farklı sıcaklıkta fermente edilen ekşi hamurların laktobasil mikrobiyal yükü Tablo 4.14, 4.15'te ve laktokok mikrobiyal yükü Tablo 4.16 ve 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.14'te görüldüğü üzere; 25 °C'de fermente edilen hamurların laktobasil yükü başlangıç inokülasyon oranı fark etmeksizin 3. pasajın sonunda hem 4,6 AGT (+) ve (-) hem de 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil aşılama oranlarında kontrol örneği ile benzer olduğu tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ). Bu durum 30°C'de fermente edilmiş hamur örneklerinde de görülmüştür (Tablo 4.15). Uygulanan her iki fermantasyon sıcaklığı ve tüm inokülasyon oranlarında olgun ekşi hamurlardaki laktobasil sayısı yaklaşık 8,5-9,5 log kob/g'a ulaşmıştır. Kontrol hamurunda ise 25 °C'de 8,71; 30 °C'de 8,83 log kob/g belirlenmiştir.

M17 agarda yapılan sayım sonuçlarına göre (Tablo 4.16) 25 °C sıcaklıkta fermente edilen hamurların  $10^2$  ve  $10^4$  kob/g 4,6 AGT (+) suşunun inokülasyon oranlarında 0. pasaj sonunda kontrol hamuruna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlemlenmiş olup ( $p<0,05$ ) bu fark en yüksek aşılama oranlarında görülmemiştir. Yine bu sıcaklıkta fermentasyonun tamamlandığı 3. pasaj sonunda tüm



başlangıç inokülasyon oranlarında kontrol hamuru ile diğer hamurlar arasında istatistiksel açıdan bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ).ve aynı durum yüksek sıcaklıkta fermente edilen tüm hamurların son pasajı tamamlandığında da görülmüştür (Tablo 4.17).

**Tablo 4.14:** 25 °C’ de fermente edilen hamurların farklı pasajlar sonunda laktobasil yükü (log kob/g)

MRS -25 °C				
10 <sup>2</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	9,3±0,00 <sup>a1</sup>	9,00±0,00 <sup>a1</sup>	8,83±0,03 <sup>a1</sup>	8,71±0,24 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	8,68±0,08 <sup>b</sup>	8,90±0,10 <sup>a</sup>	9,11±0,09 <sup>a</sup>	9,17±0,15 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	8,58±0,15 <sup>b</sup>	8,74±0,02 <sup>a</sup>	8,89±0,10 <sup>a</sup>	8,78±0,06 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	8,89±0,03 <sup>1</sup>	8,93±0,12 <sup>1</sup>	8,88±0,14 <sup>1</sup>	8,61±0,15 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	8,86±0,08 <sup>1</sup>	9,18±0,11 <sup>1</sup>	8,77±0,10 <sup>1</sup>	8,48±0,11 <sup>1</sup>
10 <sup>4</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	9,30±0,00 <sup>a1</sup>	9,00±0,01 <sup>a1</sup>	8,83±0,03 <sup>a1</sup>	8,71±0,24 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	9,10±0,10 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	8,70±0,10 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	8,90±0,40 <sup>a</sup>	8,63±0,03 <sup>a</sup>	8,89±0,13 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	8,89±0,10 <sup>1</sup>	9,20±0,10 <sup>1</sup>	9,08±0,10 <sup>1</sup>	8,86±0,09 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	8,40±0,10 <sup>2</sup>	8,73±0,13 <sup>1</sup>	8,80±0,16 <sup>1</sup>	8,98±0,01 <sup>1</sup>
10 <sup>6</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	9,30±0,00 <sup>a1</sup>	9,00±0,00 <sup>a1</sup>	8,83±0,03 <sup>a1</sup>	8,71±0,24 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	8,89±0,05 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	8,86±0,17 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	9,00±0,00 <sup>ab</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	8,99±0,04 <sup>a</sup>	8,65±0,18 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	8,76±0,08 <sup>2</sup>	8,63±0,16 <sup>1</sup>	8,63±0,03 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	8,59±0,06 <sup>2</sup>	8,76±0,06 <sup>1</sup>	8,51±0,25 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>

\*Harf gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda, kontrol hamuru, 4,6 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder ( $p<0,05$ ).

\*\*Rakam gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda kontrol hamuru, 4,3 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder ( $p<0,05$ ).

\*\*\*Sonnular ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

**Tablo 4.15:** 30 °C’de fermente edilen hamurların farklı pasajlar sonunda laktobasil yükü (log kob/g)

MRS-30 °C				
10 <sup>2</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
Kontrol	8,47±0,01 <sup>a12</sup>	8,80±0,03 <sup>a1</sup>	8,80±0,03 <sup>a1</sup>	8,83±0,06 <sup>a1</sup>
4,6 AGT (+)	8,45±0,15 <sup>a</sup>	8,60±0,30 <sup>a</sup>	9,23±0,23 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>
4,6 AGT (-)	9,15±0,15 <sup>a</sup>	9,00±0,10 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>	8,83±0,06 <sup>a</sup>
4,3 AGT (+)	8,15±0,15 <sup>1</sup>	8,29±0,01 <sup>1</sup>	9,25±0,05 <sup>1</sup>	8,64±0,04 <sup>1</sup>
4,3 AGT (-)	9,00±0,10 <sup>2</sup>	8,57±0,27 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>	9,20±0,20 <sup>1</sup>
10 <sup>4</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
Kontrol	8,47±0,01 <sup>a1</sup>	8,80±0,03 <sup>a1</sup>	8,80±0,03 <sup>a1</sup>	8,83±0,06 <sup>a1</sup>
4,6 AGT (+)	8,49±0,19 <sup>a</sup>	9,38±0,08 <sup>b</sup>	8,62±0,15 <sup>a</sup>	8,99±0,04 <sup>a</sup>
4,6 AGT (-)	8,45±0,15 <sup>a</sup>	9,00±0,10 <sup>ab</sup>	9,47±0,01 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>
4,3 AGT (+)	9,00±0,10 <sup>1</sup>	9,00±0,10 <sup>1</sup>	8,47±0,37 <sup>1</sup>	9,29±0,01 <sup>1</sup>
4,3 AGT (-)	9,00±0,10 <sup>1</sup>	9,05±0,05 <sup>1</sup>	9,00±0,10 <sup>1</sup>	9,30±0,30 <sup>1</sup>
10 <sup>6</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
Kontrol	8,47±0,01 <sup>a1</sup>	8,80±0,03 <sup>a1</sup>	8,80±0,03 <sup>a1</sup>	8,83±0,06 <sup>a1</sup>
4,6 AGT (+)	8,00±0,10 <sup>a</sup>	8,45±0,15 <sup>a</sup>	9,23±0,23 <sup>a</sup>	9,30±0,10 <sup>a</sup>
4,6 AGT (-)	8,30±0,00 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>	8,77±0,30 <sup>a</sup>	8,83±0,06 <sup>a</sup>
4,3 AGT (+)	8,76±0,07 <sup>1</sup>	8,23±0,23 <sup>1</sup>	8,38±0,08 <sup>1</sup>	9,00±0,10 <sup>1</sup>
4,3 AGT (-)	9,00±0,10 <sup>1</sup>	8,58±0,11 <sup>1</sup>	8,62±0,15 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>

\*Harf gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda, kontrol hamuru, 4,6 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05).

\*\*Rakam gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda kontrol hamuru, 4,3 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05)

\*\*\*Sonsuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

25 °C’de fermente edilen ekşi hamurların birçoğunda LAB sayısı 30 °C’dekilere göre daha düşük bulunmuştur. Benzer bir sonuç Siepmann ve diğ. (2019) tarafından çeşitli LAB suşları ile 28 °C’de fermente edilen 9 adet Tip II ekşi hamurun sıcaklığı 35 °C’ye çıkartıldığında 6 tanesinde LAB sayısında artış tespit edilmiştir. Ekşi hamur ortamında LAB, 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> kob/g’a ulaşarak baskın mikroorganizma grubunu oluşturmakla birlikte ortamın asitlendirilmesinden sorumludur. Nitekim bizim sonuçlarımızda bunu destekler niteliktedir ve literatürle uyumludur.

Cardinali ve diğ. (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 20 gün boyunca pasajlama ile hazırlanan Tip I ekşi hamur 4 °C’de depolanmış ve haftalık olarak tazelenmiştir. Bu hamurun LAB sayısı 9,23 log kob/g olarak bulunmuştur. Tip I olgun ekşi hamurun starter olarak kullanıldığı Tip II ekşi hamurun ise başlangıç LAB sayısı 8,72 log kob/g iken 96 saatlik fermentasyon sonucu 9,06 log kob/g’a ulaşmıştır.

**Tablo 4.16:** 25 °C’ de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda laktokok yükü (log kob/g)

<b>M17 -25 °C</b>				
<b>10<sup>2</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>Örnekler</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	9,53±0,06 <sup>a1</sup>	9,00±0,10 <sup>a1</sup>	9,23±0,23 <sup>a1</sup>	8,72±0,12 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	8,31±0,15 <sup>b</sup>	8,68±0,08 <sup>a</sup>	8,94±0,02 <sup>a</sup>	9,02±0,15 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	9,06±0,23 <sup>ab</sup>	8,59±0,12 <sup>a</sup>	8,98±0,01 <sup>a</sup>	9,20±0,10 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	9,43±0,21 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>	8,79±0,10 <sup>1</sup>	8,61±0,08 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	9,20±0,10 <sup>1</sup>	8,94±0,05 <sup>1</sup>	8,81±0,04 <sup>1</sup>	8,48±0,11 <sup>1</sup>
<b>10<sup>4</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>Örnekler</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	9,53±0,06 <sup>a1</sup>	9,00±0,10 <sup>a1</sup>	9,23±0,23 <sup>a1</sup>	8,72±0,12 <sup>ab1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	8,45±0,08 <sup>b</sup>	9,10±0,10 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	9,20±0,10 <sup>a</sup>	8,81±0,02 <sup>a</sup>	9,30±0,00 <sup>a</sup>	8,66±0,03 <sup>b</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	8,74±0,05 <sup>2</sup>	9,01±0,01 <sup>1</sup>	8,87±0,06 <sup>1</sup>	8,94±0,05 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	8,10±0,10 <sup>3</sup>	8,61±0,08 <sup>2</sup>	8,89±0,10 <sup>1</sup>	8,89±0,10 <sup>1</sup>
<b>10<sup>6</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>Örnekler</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	9,53±0,06 <sup>a1</sup>	9,00±0,10 <sup>a1</sup>	9,23±0,23 <sup>a1</sup>	8,72±0,12 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	8,97±0,13 <sup>a</sup>	8,83±0,06 <sup>a</sup>	8,90±0,00 <sup>a</sup>	8,38±0,08 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	8,84±0,15 <sup>a</sup>	9,23±0,23 <sup>a</sup>	9,06±0,02 <sup>a</sup>	8,92±0,08 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	8,61±0,08 <sup>2</sup>	9,00±0,00 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	8,50±0,20 <sup>2</sup>	8,71±0,06 <sup>1</sup>	9,00±0,00 <sup>1</sup>	8,64±0,09 <sup>1</sup>

\*Harf gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda, kontrol hamuru, 4,6 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05).

\*\*Rakam gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda kontrol hamuru, 4,3 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05)

\*\*\*Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

**Tablo 4.17:** 30 °C’ de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda laktokok yükü (log kob/g)

M17 -30 °C				
10 <sup>2</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	8,73±0,04 <sup>a1</sup>	8,60±0,01 <sup>a1</sup>	8,60±0,01 <sup>a1</sup>	9,04±0,05 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	9,15±0,15 <sup>a</sup>	8,73±0,04 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	8,83±0,23 <sup>a</sup>	9,00±0,10 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>	9,00±0,10 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	8,64±0,01 <sup>12</sup>	9,00±0,10 <sup>1</sup>	9,00±0,10 <sup>1</sup>	9,00±0,10 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	9,20±0,05 <sup>2</sup>	9,00±0,10 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>	9,30±0,10 <sup>1</sup>
10 <sup>4</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	8,73±0,04 <sup>a1</sup>	8,60±0,01 <sup>a1</sup>	8,60±0,01 <sup>a1</sup>	9,04±0,05 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	8,49±0,19 <sup>a</sup>	8,87±0,03 <sup>a</sup>	8,68±0,08 <sup>a</sup>	8,64±0,04 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	9,15±0,15 <sup>a</sup>	8,76±0,07 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>	8,53±0,06 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	9,00±0,20 <sup>1</sup>	8,46±0,01 <sup>1</sup>	8,43±0,33 <sup>1</sup>	9,00±0,20 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	8,53±0,06 <sup>1</sup>	8,82±0,13 <sup>1</sup>	9,00±0,10 <sup>1</sup>	9,29±0,04 <sup>1</sup>
10 <sup>6</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	8,73±0,04 <sup>a1</sup>	8,60±0,01 <sup>a1</sup>	8,60±0,01 <sup>a1</sup>	9,04±0,05 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	8,10±0,10 <sup>b</sup>	8,60±0,00 <sup>a</sup>	9,23±0,23 <sup>a</sup>	9,30±0,10 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	8,30±0,00 <sup>ab</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	8,72±0,12 <sup>a</sup>	9,00±0,10 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	8,90±0,10 <sup>1</sup>	8,29±0,01 <sup>12</sup>	8,80±0,03 <sup>1</sup>	8,53±0,23 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	9,00±0,10 <sup>1</sup>	8,15±0,15 <sup>2</sup>	8,23±0,23 <sup>1</sup>	8,54±0,24 <sup>1</sup>

\*Harf gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda, kontrol hamuru, 4,6 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05).

\*\*Rakam gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda kontrol hamuru, 4,3 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05)

\*\*\*Sunuşlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

Toplam Aerobik Mezofilik Bakterilerin sayıldığı PCA ortamında her iki sıcaklıkta da fermente edilen hamurlarda tüm inokülasyon oranlarında tıpkı LAB sayımlarında olduğu gibi fermentasyon tamamlandığında kontrol örneği ile laktobasil içeren hamurlar arasında bir fark gözlenmemiştir (p>0,05). Düşük sıcaklıkta; sadece fermentasyonu 10<sup>4</sup> kob/g inokülasyon oranı ile başlatılan 4,6 AGT (+) ve (-) suşları ile fermente edilen hamurlar arasında istatistiksel açıdan fark bulunmuştur ve mikrobiyal yükleri sırasıyla 9,15 ve 8,53 log kob/g’dir (Tablo 4.18). Daha yüksek sıcaklıkta fermente edilen hamurlarda ise 10<sup>2</sup> kob/g inokülasyon oranında son durumda toplam canlı sayısı kontrol hamuru dışında diğer tüm hamurlarda 25 °C’ye göre bir artış görülmüşken, 10<sup>4</sup> kob/g inokülasyonda ise 4,6 ve 4,3 AGT (-) laktobasil içeren hamurlarda artış olmuştur. 10<sup>6</sup> log kob/g aşılama oranında ise 4,6 ve 4,3 hem AGT (+) hem de AGT(-) suşları içeren hamurlarda mikrobiyal yük 25°C’ye göre daha düşük bulunmuştur (Tablo 4.19).

**Tablo 4.18:** 25 °C’ de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda TAMB sayısı (log kob/g)

PCA -25 °C				
10 <sup>2</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
Kontrol	8,82±0,07 <sup>a1</sup>	9,10±0,10 <sup>a1</sup>	9,04±0,04 <sup>a1</sup>	9,00±0,00 <sup>a1</sup>
4,6 AGT (+)	8,54±0,07 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>	8,95±0,02 <sup>a</sup>	9,11±0,09 <sup>a</sup>
4,6 AGT (-)	8,82±0,17 <sup>a</sup>	9,04±0,13 <sup>a</sup>	8,98±0,01 <sup>a</sup>	8,79±0,02 <sup>a</sup>
4,3 AGT (+)	8,98±0,01 <sup>1</sup>	9,20±0,10 <sup>1</sup>	8,96±0,03 <sup>1</sup>	8,71±0,12 <sup>1</sup>
4,3 AGT (-)	8,67±0,14 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>	8,73±0,08 <sup>2</sup>	8,71±0,12 <sup>1</sup>
10 <sup>4</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
Kontrol	8,82±0,13 <sup>a1</sup>	9,15±0,15 <sup>a1</sup>	9,07±0,07 <sup>a1</sup>	9,00±0,00 <sup>ab1</sup>
4,6 AGT (+)	9,25±0,13 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a1</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>
4,6 AGT (-)	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,08±0,20 <sup>a</sup>	8,66±0,03 <sup>a</sup>	8,53±0,11 <sup>b</sup>
4,3 AGT (+)	8,82±0,24 <sup>1</sup>	9,00±0,03 <sup>1</sup>	9,23±0,23 <sup>1</sup>	9,06±0,12 <sup>1</sup>
4,3 AGT (-)	9,06±0,12 <sup>1</sup>	8,83±0,03 <sup>1</sup>	9,12±0,17 <sup>1</sup>	8,89±0,05 <sup>1</sup>
10 <sup>6</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
Kontrol	8,82±0,13 <sup>a1</sup>	9,15±0,15 <sup>a1</sup>	9,07±0,07 <sup>a1</sup>	9,00±0,00 <sup>a1</sup>
4,6 AGT (+)	8,76±0,07 <sup>a</sup>	9,23±0,23 <sup>a</sup>	8,73±0,26 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>
4,6 AGT (-)	8,86±0,09 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
4,3 AGT (+)	8,77±0,00 <sup>12</sup>	8,30±0,30 <sup>1</sup>	8,33±0,20 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>
4,3 AGT (-)	8,41±0,05 <sup>2</sup>	9,00±0,00 <sup>1</sup>	9,00±0,00 <sup>1</sup>	9,15±0,15 <sup>1</sup>

\*Harf gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda, kontrol hamuru, 4,6 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05).

\*\*Rakam gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda kontrol hamuru, 4,3 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05)

\*\*\*Sonnuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

**Tablo 4.19:** 30 °C’de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda TAMB sayısı (log kob/g)

PCA- 30 °C				
10 <sup>2</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	8,58±0,11 <sup>a1</sup>	9,00±0,10 <sup>a1</sup>	9,23±0,23 <sup>a1</sup>	8,75±0,15 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	8,45±0,15 <sup>a</sup>	9,00±0,10 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	9,30±0,10 <sup>b</sup>	8,38±0,38 <sup>a</sup>	8,83±0,06 <sup>a</sup>	8,80±0,20 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	9,00±0,10 <sup>1</sup>	8,15±0,15 <sup>1</sup>	9,00±0,10 <sup>1</sup>	9,00±0,20 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	8,69±0,00 <sup>1</sup>	8,86±0,09 <sup>1</sup>	8,92±0,08 <sup>1</sup>	8,79±0,10 <sup>1</sup>
10 <sup>4</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	8,58±0,11 <sup>a1</sup>	9,00±0,10 <sup>a1</sup>	9,23±0,23 <sup>a1</sup>	8,75±0,15 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	8,30±0,08 <sup>a</sup>	8,83±0,06 <sup>a</sup>	8,99±0,04 <sup>a</sup>	8,64±0,04 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	8,53±0,06 <sup>a</sup>	8,79±0,10 <sup>a</sup>	9,00±0,10 <sup>a</sup>	8,80±0,03 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	9,00±0,20 <sup>1</sup>	8,46±0,01 <sup>2</sup>	8,64±0,04 <sup>12</sup>	9,00±0,20 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	8,62±0,15 <sup>1</sup>	9,00±0,10 <sup>1</sup>	8,15±0,15 <sup>2</sup>	9,38±0,08 <sup>1</sup>
10 <sup>6</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
<b>Kontrol</b>	8,58±0,11 <sup>a1</sup>	9,00±0,10 <sup>a1</sup>	9,23±0,23 <sup>a1</sup>	8,75±0,15 <sup>a1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	8,00±0,00 <sup>a</sup>	8,60±0,10 <sup>a</sup>	9,00±0,10 <sup>a</sup>	8,60±0,30 <sup>a</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	8,15±0,15 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,15±0,15 <sup>a</sup>	8,77±0,17 <sup>a</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	9,25±0,05 <sup>2</sup>	8,29±0,01 <sup>2</sup>	8,23±0,23 <sup>1</sup>	9,10±0,10 <sup>1</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	9,15±0,15 <sup>12</sup>	8,23±0,23 <sup>2</sup>	8,23±0,23 <sup>1</sup>	8,38±0,08 <sup>1</sup>

\*Harf gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda, kontrol hamuru, 4,6 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05).

\*\*Rakam gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda kontrol hamuru, 4,3 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05)

\*\*\*Sunuşlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

Yağmur ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada Türkiye’nin çeşitli illerinden toplanan ve *Triticum aestivum* unu ile üretilmiş olan ekşi hamurların TAMB sayısı 5,51-8,10 log kob/ml olarak tespit edilmiştir.

Sicilya bölgesinden toplanan 4 adet ekşi hamur örneği herhangi bir mikroorganizma ilave edilmeden günlük geri besleme metoduyla bir önceki hamurla beslenmiştir. Olgun ekşi hamurların PCA besiyerindeki TAMB sayısı 6,17-9,42 log kob/g olarak tespit edilmiştir (Pino ve diğ. 2022).

Yapılan farklı bir çalışmada ise ekşi hamurdan izole edilen *Lacp. plantarum* XL23 ve *Frul. sanfranciscensis* RL976 suşlarının starter olarak kullanıldığı Tip1 ekşi hamur örneklerinin fermentasyonu 3 gün boyunca takip edilmiştir. Başlangıçta fermente edilmemiş hamurlarda TAMB 3,7 log kob/g olarak belirlenmiş ve ilk günde tüm hamurlarda artış göstermiş olup fermantasyon tamamlandığında 9,18-9,70 log kob/g aralığında tespit edilmiştir (Gündüz ve diğ. 2022).

25 °C’de 4,6 AGT(+) ve (-) suş ile ermente edilen hamurlarda 0. pasajda tespit edilen maya-küf başlangıç inokülasyon oranı artmasını takiben 3. pasaj sonunda gözlenmemiştir (Tablo 4.20). Benzer durum 30°C’de fermente edilen hamurlarda da tespit edilmiştir (Tablo 4.21). Bu ileri pasajlarda kitle fermantasyonuna bağlı olarak maya stabilitesinin kaybolduğunu düşündürmektedir.

**Tablo 4.20:** 25 °C’de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda maya-küf sayısı (log kob/g)

DRBC -25 °C				
10 <sup>2</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
Kontrol	3,92±0,02 <sup>a12</sup>	< 1	< 1	< 1
4,6 AGT (+)	4,02±0,00 <sup>b</sup>	3,17±0,03 <sup>a</sup>	3,24±0,01 <sup>a</sup>	3,25±0,02 <sup>a</sup>
4,6 AGT (-)	4,54±0,00 <sup>a</sup>	3,09±0,05 <sup>a</sup>	3,25±0,05 <sup>a</sup>	3,18±0,11 <sup>a</sup>
4,3 AGT (+)	4,11±0,04 <sup>1</sup>	3,09±0,02 <sup>1</sup>	< 1	< 1
4,3 AGT (-)	3,81±0,12 <sup>2</sup>	2,95±0,11 <sup>1</sup>	3,07±0,00	< 1
10 <sup>4</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
Kontrol	3,92±0,02 <sup>a1</sup>	< 1	< 1	< 1
4,6 AGT (+)	4,42±0,01 <sup>a</sup>	2,88±0,19 <sup>a</sup>	< 1	< 1
4,6 AGT (-)	4,21±0,08 <sup>a</sup>	3,03±0,08 <sup>a</sup>	< 1	< 1
4,3 AGT (+)	4,11±0,07 <sup>1</sup>	3,15±0,01 <sup>1</sup>	< 1	< 1
4,3 AGT (-)	3,25±0,18 <sup>2</sup>	3,57±0,06 <sup>1</sup>	< 1	< 1
10 <sup>6</sup> İNOKÜLASYON				
Örnekler	0.PASAJ	1.PASAJ	2.PASAJ	3.PASAJ
Kontrol	3,92±0,02 <sup>a1</sup>	< 1	< 1	< 1
4,6 AGT (+)	3,97±0,09 <sup>a</sup>	< 1	< 1	< 1
4,6 AGT (-)	4,26±0,10 <sup>a</sup>	3,17±0,22	< 1	< 1
4,3 AGT (+)	3,35±0,17 <sup>12</sup>	3,38±0,00 <sup>a</sup>	< 1	< 1
4,3 AGT (-)	3,10±0,20 <sup>2</sup>	3,34±0,07 <sup>a</sup>	< 1	< 1

\*Harf gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda, kontrol hamuru, 4,6 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05).

\*\*Rakam gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda kontrol hamuru, 4,3 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05)

\*\*\*Sonnular ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

**Tablo 4.21:** 30 °C’de fermente edilen ekşi hamurların farklı pasajlar sonunda maya-küf sayısı (log kob/g)

<b>DRBC- 30 °C</b>				
<b>10<sup>2</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>Örnekler</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	3,67±0,20 <sup>a1</sup>	3,25±0,08 <sup>a1</sup>	3,29±0,01 <sup>a1</sup>	3,32±0,04
<b>4,6 AGT (+)</b>	3,16±0,09 <sup>b</sup>	3,29±0,02 <sup>a</sup>	3,09±0,05 <sup>a</sup>	< 1
<b>4,6 AGT (-)</b>	3,19±0,05 <sup>ab</sup>	2,83±0,06 <sup>b</sup>	3,11±0,00 <sup>a</sup>	< 1
<b>4,3 AGT (+)</b>	4,54±0,02 <sup>2</sup>	3,32±0,05 <sup>1</sup>	3,07±0,00 <sup>2</sup>	< 1
<b>4,3 AGT (-)</b>	4,48±0,00 <sup>2</sup>	3,18±0,04 <sup>1</sup>	3,13±0,06 <sup>12</sup>	< 1
<b>10<sup>4</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>Örnekler</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	3,67±0,20 <sup>a</sup>	3,25±0,08 <sup>a</sup>	3,29±0,01 <sup>a</sup>	3,32±0,04
<b>4,6 AGT (+)</b>	3,63±0,17 <sup>a</sup>	3,05±0,01 <sup>a</sup>	< 1	< 1
<b>4,6 AGT (-)</b>	3,23±0,12 <sup>a</sup>	3,18±0,04 <sup>a</sup>	3,32±0,00 <sup>a</sup>	< 1
<b>4,3 AGT (+)</b>	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>4,3 AGT (-)</b>	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>10<sup>6</sup> İNOKÜLASYON</b>				
<b>Örnekler</b>	<b>0.PASAJ</b>	<b>1.PASAJ</b>	<b>2.PASAJ</b>	<b>3.PASAJ</b>
<b>Kontrol</b>	3,67±0,20 <sup>a</sup>	3,25±0,08 <sup>a</sup>	3,29±0,01 <sup>a1</sup>	3,32±0,04 <sup>1</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	3,46±0,00 <sup>a</sup>	< 1	< 1	< 1
<b>4,6 AGT (-)</b>	3,62±0,26 <sup>a</sup>	< 1	< 1	< 1
<b>4,3 AGT (+)</b>	< 1	< 1	4,04±0,02 <sup>2</sup>	4,01±0,05 <sup>2</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	< 1	< 1	3,50±0,04 <sup>1</sup>	3,84±0,05 <sup>12</sup>

\*Harf gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda, kontrol hamuru, 4,6 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05).

\*\*Rakam gösterimi: Her inokülasyon oranında aynı sütunda kontrol hamuru, 4,3 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan hamurların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05)

\*\*\*Sonnuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

Yapılan bir çalışmada ekşi hamurda fermentasyon sıcaklığının 28 °C’den 35 °C’ ye yükseltilmesinin maya-küf sayısında bir düşüşe neden olduğunu göstermiştir (Siepmann ve diğ. 2019). Benzer durum 4,6 α-GT (+) ve (-) bakteriler ile hazırlanan hamurlarda da görülmüştür. Fermentasyon sırasında maya-küf sayımında gözlemlenen azalma, fermentasyon boyunca hamura eşlik eden birçok LAB türünün bilinen antifungal aktivitesinden (Korcari ve diğ. 2020) ve yüksek asiditeden kaynaklanabilir (Reale ve diğ. 2019).

4,3 α-GT (+) ve (-) suşları ile hazırlanan hamurlarda ise 10<sup>2</sup> ve 10<sup>4</sup> kob/g inokülasyonda maya –küf tespit edilememiş olup 10<sup>6</sup> kob/g inokülasyonda 4,3 AGT (+) ve (-) suşu içeren hamurlarda sırasıyla 4,01 ve 3,84 log kob/g olarak bulunmuştur (Tablo 4.21). Bu durum Ercolini ve diğ. (2013)’nin yaptığı çalışmada da gözlenmiştir. Çalışmada ekşi hamur üretiminin başlangıcında çavdar ve buğday ekşi hamurlarının maya sayısının LAB sayısından yaklaşık 2 log kob/g daha yüksek olduğunu ve 4 log kob/g civarında bildirmiştir. Maya sayısı pasajlamanın 2. gününde azalmış ancak daha



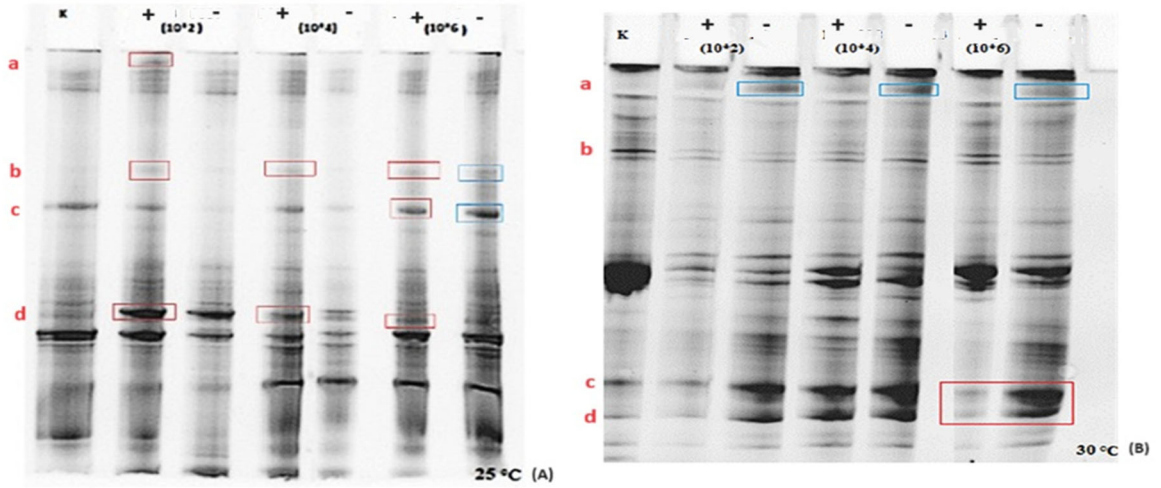
sonra artmaya devam etmiş ve fermentasyonun 11. gününde 6 log kob/g'ın üzerine çıkmıştır.

Chia unu ile hazırlanan ve 30 °C'de inkübe edilen hamur 10 gün boyunca günlük % 10 w/v oranında geri beslenerek elde edilmiştir. Üretilen hamurun 0. gün maya-küf sayısı 4,27 log kob/g'dan 2. gün sonunda 4,07 log kob/g'a düşmüştür ve diğer günlerde ise tespit edilememiştir. Bu durum yağlı tohumunun fermentasyonu sırasında, yüksek serbest yağ asitleri içeriğinin maya hücresi büyümesi ve bölünmesi üzerinde toksik etki gösterebilmesi ile ilişkilendirilmiştir (Maidana ve diğ. 2020).

#### **4.2.3 4,6 ve 4,3 AGT Enzimi Üreten Laktobasillerle Fermente Edilen Hamurların DGGE Profili**

4,6 ve 4,3 AGT geni içeren ve içermeyen suşların farklı oranlarda aşılandığı ve iki farklı sıcaklıkta fermente edildiği hamurların 3. pasajın ardından pH 4,5'de sahip olduğu LAB türleri sırasıyla Şekil 4.11 ve 4.12'de verilmiştir. Kullanılan jelin her bir kuyucuğu eşit konsantrasyonda (20 ng) PZR ürünü (DNA) içermektedir.

25 °C'de gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda 4,6 AGT (+) suşunun  $10^2$  kob/g inokülasyonunda tespit edilen a bandı  $10^4$  ve  $10^6$  kob/g inokülasyonunda kaybolmuştur. Bahsedilen bant kontrol hamuru ve 4,6 AGT (-) suşu ile fermentasyonu başlatılan hamurlarda yer almamaktadır. Yine bu sıcaklıkta 4,6 AGT (+) suşu içeren tüm hamurlarda varolan b bantı, 4,6 AGT (-) suşun inokülasyon konsantrasyonunun en yüksek olduğu hamurda tespit edilmiştir. Kontrol hamuru da dahil olmak üzere tüm hamurlarda yer alan c bandı 4,6 AGT (-) suşunun artan başlangıç inokülasyon oranıyla doğru orantı göstererek en yüksek profile  $10^6$  konsantrasyonda ulaşmıştır. Aynı bant 4,6 AGT (+) starterinin her inokülasyon oranında izlenmiştir ve en yüksek bant genişliğine 4,6 AGT (-) içeren hamura benzer şekilde yüksek konsantrasyonda ulaşmıştır. Bu durumun aksine 4,6 AGT (+) suşunun kullanıldığı hamurda d bandı gözlenmiş olup, inokülasyon oranı arttıkça bantın yoğunluğunun azaldığı görülmüştür (Şekil 4.11 A).



**Şekil 4.11:** Kontrol hamurunun, 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş hamurların fermentasyonu sonucu elde edilen ekşi hamurların DGGE jel profili A:25 °C’de fermentasyon B: 30 °C’de fermentasyon

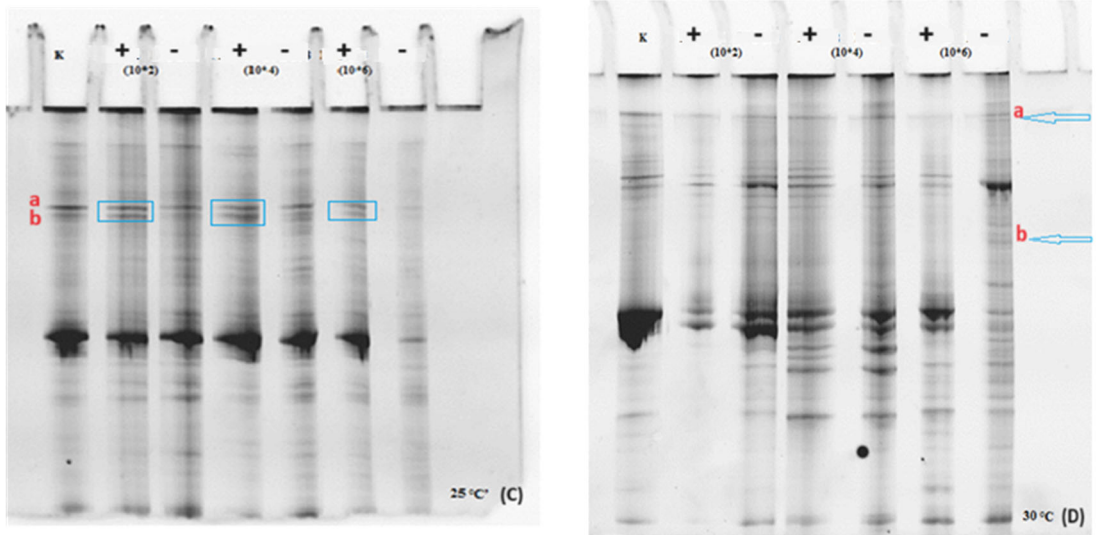
30 °C’de fermentasyonu tamamlanan hamurların DGGE bant profilinde ise kontrol hamuru ve 4,6 AGT(+) suşun kullanıldığı hamurlarda oldukça düşük izlenen a bandının 4,6 AGT (-) suşun hamurlarında  $10^2$  kob/g aşılama oranında oldukça belirgin olduğu izlenmiştir. Kontrol hamurunda yüksek yoğunlukta tespit edilen b bandı ise laktobasil aşılama oranında düşük yoğunlukta bulunmuştur. Yine aynı sıcaklıkta kontrol hamuru da dahil tüm hamurlarda farklı yoğunlukta izlenen c bandı 4,6 AGT (-) suş içeren hamurda  $10^6$  kob/g, 4,6 AGT (+) içeren hamurda ise  $10^4$  kob/g aşılama oranlarında diğerlerine göre daha yoğun gözlemlenmiştir (Şekil 4.11 B).

Yüksek sıcaklıkta fermente edilen hamurlarda tamamen silinen ya da ortaya çıkan bant görülmemekle birlikte laktobasil suşların başlangıç inokülasyon oranı değişimi ile bazı bantların yoğunluğunun arttığı veya azaldığı gözlemlenmiştir. 25 °C’de fermente edilen hamurlarda ise silinen bantlar izlenmiştir. Bu durum düşük sıcaklıkta fermente edilen ekşi hamurların mikroflorasında nişastayı modifiye eden/edemeyen starterlerin kullanımının LAB’nin çeşitliliği üzerine etkisi olduğunu; ancak yüksek sıcaklıktaki ekşi hamur fermentasyonunda ise bu etkinin LAB türünden ziyade yoğunluğu üzerine etkisi olduğunu göstermiştir.

4,3 AGT (+) ve (-) laktobasillerle fermente edilen hamurların DGGE profiline göre 25°C’de kontrol hamuru ile aynı sayıda bandın (inokülasyon oranından bağımsız) varlığı tespit edilmiştir. Kontrol hamurunda yüksek yoğunlukta tespit edilen a ve b

bantlarının gerek 4,3 AGT(+), gerekse 4,3 AGT(-) suş içeren hamurların artan inokülasyon oranları ile azaldığı ve bu azalmanın 4,3 AGT (-) hamurlarında dikkat çekici seviyede olduğu görülmüştür (Şekil 4.12 C).

Fermentasyon sıcaklığının 5 °C yükselmesi ile birlikte bant yoğunluklarında değişimlerin olduğu dikkati çekmektedir. Ayrıca 4,3 AGT (-) suşunun en yüksek inokülasyon oranında diğer hamurlarda yer almayan a ve b bantlarının varlığı tespit edilmiş olup bu durum hamur mikroflorasında farklı LAB türlerinin adaptasyon kazandığını göstermektedir. 4,3 AGT enzimi açısından fermentasyon gerçekleştirilen 30 °C’de: enzim üreticisi suşun mikroflora üzerinde baskılayıcı etki göstererek bazı türlerin inhibisyonuna yol açtığı bulunmuştur. Diğer sıcaklıkta ise bu etki LAB yoğunluğunun artması veya azalmasıyla sınırlı olmuştur (Şekil 4.12 D).



**Şekil 4.12:** Kontrol hamurunun, 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş hamurların fermentasyonu sonucu elde edilen ekşi hamurların DGGE jel profili C:25 °C’de fermantasyon D: 30 °C’de fermantasyon

DGGE kesin bir kantitatif yöntem olmasa da her bir bandın yoğunluk değişimi benzer mikrobiyal topluluklarda aynı mikroorganizmaların göreceli yoğunluğu hakkında bir gösterge verebilir (Kuang ve diğ. 2009). Görünür bantların sayısı ve yoğunluğu, fermantasyon süresi boyunca hamur örneklerindeki LAB değişikliğini göstermiştir. Özetle; 4,6 AGT enzimi üreticisi suşun 25 °C’de artan inokülasyon oranı ile bir türün yok olmasına sebep olurken, 30 °C’de enzimin üreticisi olan ve olmayan suşların hamur ortamında mikrobiyal yüke etkisi olduğu tespit edilmiştir. 25 °C’de 4,3

AGT enzim üreticisi suşun üretici olmayan suşa göre popülasyon stabilitesini sürdürdüğünü 30 °C’de de bu durumun devam ettiği şeklindedir.

Ekşi hamurda her iki enzimin in situ üretiminin LAB çeşidi üzerindeki etkisi sıcaklık değişimi ile düşük kalırken, mikrobiyal konsantrasyon üzerindeki etkisi daha belirgin olmuştur.

#### 4.2.4 4,6 ve 4,3 AGT Enzimi Üreten Laktobasillerle Fermente edilen Hamurların Metagenom Özellikleri

Çalışmada hamurların fermantasyon biotasının nihai bakteri cins ve tür tanımlamasını gerçekleştirmek amacıyla yapılan NGS analizinde uygulanan her iki sıcaklık derecesinde ve tüm hamurlarda LAB cinsi olarak *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Weissella* cinsi gruplar karşımıza çıkmıştır. *Enterococcus* ve *Streptogasseriococcus* cinsi bakteriler ise bazı hamurlarda görülmemiştir.

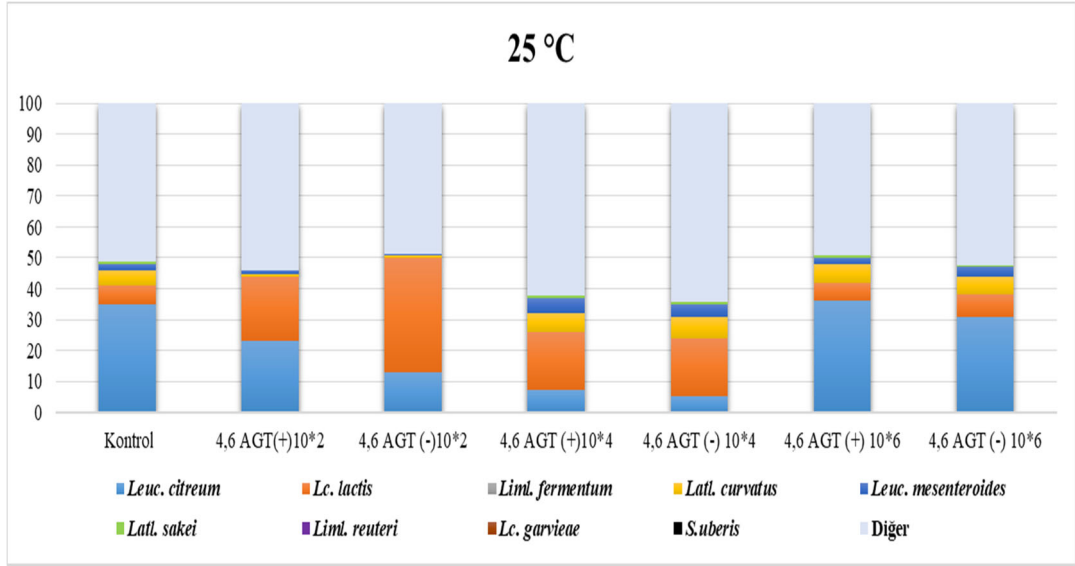
25 °C’de sıcaklıkta kontrol hamurunda %44 oranındaki *Lactobacillus* cinsi bakteri grubu tespit edilmiştir.  $10^2$ ,  $10^4$  ve  $10^6$  kob/g 4,6 AGT (+) suş ile aşıl原因an hamuralarda *Lactobacillus* sırasıyla %17, %50 ve %43 olarak tespit edilmiş olup 4,6 AGT (-) suşu ile hazırlanan hamurlarda bu oranlar %11, %58 ve %46 olarak bulunmuştur. Bu sıcaklıkta fermantasyonunu tamamlayan hamurlardan sadece  $10^2$  kob/g 4,6 AGT (-) suşu ile hazırlanan hamurda %0,003 oranında *Pediococcus* cinsi tespit edilmiştir. 4,6 AGT (+) suşu ile hazırlanan hamurlarda *Weissella* ve *Lactococcus* cinsi bakteriler inokülasyon oranı arttıkça azalmıştır ve aynı durum 4,6 AGT (-) laktobasilini içeren hamurlarda da görülmüştür. Kontrol hamurunda %37 olarak saptanan *Leuconostoc* cinsi ise, en yüksek değerine  $10^6$  kob/g 4,6 AGT (+) ve 4,6 AGT (-) suşları kullanılarak hazırlanan hamurlarda sırasıyla %38 ve %34 bulunmuştur.

30 °C’de fermantasyonu tamamlanan kontrol hamurunda *Lactobacillus* %16’ya düşmüştür.  $10^2$  ve  $10^4$  kob/g 4,6 AGT (+) suşu ile fermente edilen hamurda ise %17 oranında kalmıştır. Aynı laktobasilin başlangıç olarak  $10^6$  kob/g olarak yer aldığı hamurda *Lactobacillus* %47 iken yine bu inokülasyon oranında 4,6 AGT (-) suşu için %44’tür. *Weissella* cinsi hem AGT (+) hem de AGT (-) hamurda inokülasyon oranı arttıkça azalmıştır. *Lactococcus* cinsi ise kontrol hamurunda 25 °C’ye göre on kat

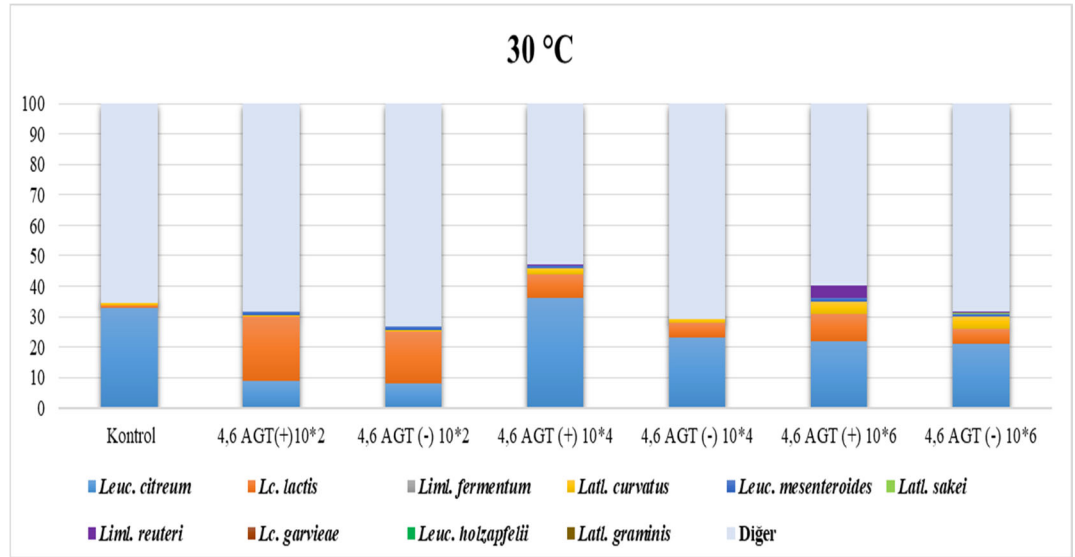
azalarak %0,6 olarak tespit edilmiştir. Bu cins 4,6 AGT (+) ve 4,6 AGT (-)'ün  $10^2$  kob/g olarak kullanıldığı hamurlarda sırasıyla %21, %18;  $10^4$  kob/g için %8, %9 ve son olarak  $10^6$  kob/g inokülasyonda %9, %6 değerlerine ulaşmıştır. Kontrol hamurunda *Leuconostoc* cinsi az oranda düşüş göstererek %33 iken  $10^2$  kob/g 4,6 AGT (+) ve (-) suşları ile hazırlanan hamurlar için aynıdır (%10). 4,6 AGT (-) hamurunda kalan diğer iki inokülasyon oranı için de bu cins artış göstererek %23'e ulaşmıştır. 4,6 AGT (+) suşu için ise dalgalanma göstererek  $10^4$  kob/g %37 ve  $10^6$  kob/g %24 olarak bulunmuştur.

Tanımlamaya tür düzeyinde devam edildiğinde 25 °C ve 30 °C'de kontrol, 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasillerin tüm inokülasyon oranıyla üretilen hamurlarda; *Leuc. mesenteroides*, *Lb. gasseri*, *Lc. lactis* ve *Latl. curvatus* tespit edilmiştir. 25 °C'de kontrol hamurunda %0,7 olarak tespit edilen *Latl. sakei* (Şekil 4.13), 30°C'de kontrol hamurunda bulunmamaktadır (Şekil 4.14) ve 25 °C, 30° C sıcaklıkta 4,6 AGT (+) ve 4,6 AGT (-) suşlarının tüm inokülasyon oranlarında *Latl. sakei* %1'in altında kalmıştır.

Fermentasyonun her iki sıcaklığında da kontrol hamurunda *Liml.* suşuna rastlanılmamıştır, ancak; bu hamurun fermentasyonu tamamlanan her iki sıcaklıkta da *Liml. fermentum* tespit edilmiş olup 25 °C'de %0,02 ve 30°C'de %0,005 gibi oldukça düşük düzeydedir. 25 °C'de  $10^6$  kob/g 4,6 AGT (+) laktobasil içeren hamurda *Liml. reuteri* %0,004 iken 4,6 AGT (-) hamurlarında tespit edilmemiştir. 30 °C'de ise 4,6 AGT (+) içeren hamurların  $10^4$  ve  $10^6$  kob/g inokülasyonunda *Liml. reuteri* sırasıyla %0,1 ve %4'tür. Buna karşılık 4,6 AGT (-) suşunun  $10^4$  kob/g inokülasyonunda %0,01 ve  $10^6$  kob/g inokülasyonunda %0,6 *Liml. reuteri* tespit edilmiştir. Bu durum düşük sıcaklıkta yüksek yoğunlukta kullanılan laktobasillerden AGT geni içeren suşun varlığını sürdürdüğünü; yüksek sıcaklıkta fermentasyon ortamında da AGT (-) olan suşun AGT (+)'e göre fermentasyon ortamına direncinin daha düşük düzeyde kaldığına işaret etmiştir.



**Şekil 4.13:** Kontrol hamurunun, 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş, 25 °C’de fermentasyon sonucu elde edilen hamurların tür çeşitliliği



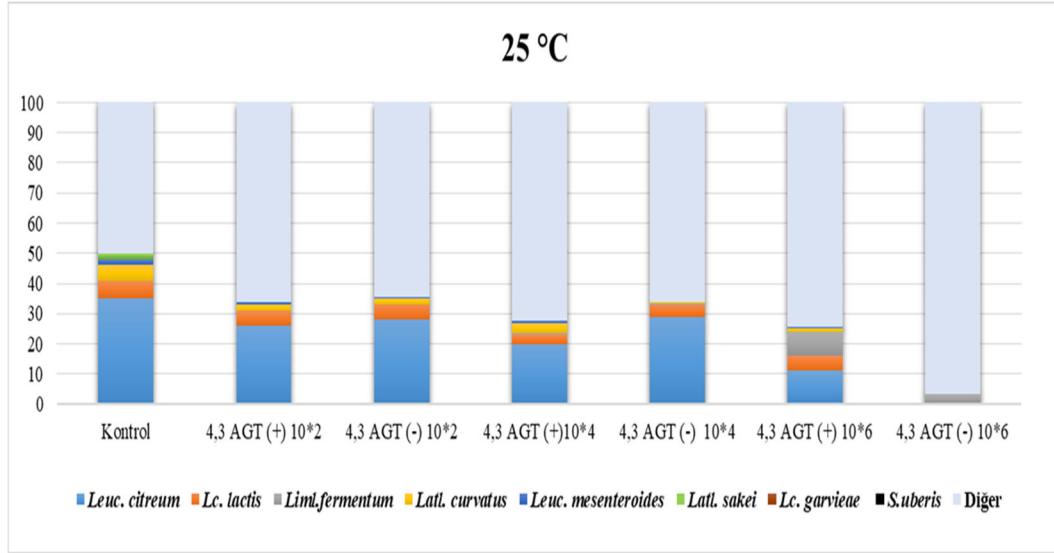
**Şekil 4.14:** Kontrol hamurunun, 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş, 30 °C’de fermentasyon sonucu elde edilen hamurların tür çeşitliliği

4,3 AGT için 25°C’de *Weissella* cinsinin 4,3 AGT (+) suşunun artan inokülasyon oranı ile arttığı ama tersi durumun *Leuconostoc* cinsi için tespit edildiği görülmektedir. Yine bu suşun 10<sup>4</sup> ve 10<sup>6</sup> kob/g olarak inoküle edildiği hamurlarda *Lactobacillus* cinsi sırasıyla %33 ve %32 iken *Lactococcus* cinsi en yüksek yüke 10<sup>6</sup> kob/g inokülasyonunda ulaşmıştır (%9). Bu sıcaklıkta söz konusu cinsler için 4,3 AGT (-) suşu ile fermente edilen hamurlarda suşun artan inokülasyon oranı ile *Lactococcus*’un

azaldığı, *Weissella* ve *Leuconostoc* cinsinin en yüksek  $10^4$  kob/g inokülasyonda görüldüğü (*Weissella*: %16, *Leuconostoc*: %29) bulunmuştur. *Lactobacillus* cinsi ise  $10^2$  kob/g inokülasyonda %33,  $10^4$  kob/g inokülasyonda %29 ve  $10^6$  kob/g inokülasyonda %56'ya ulaşmıştır.

30 °C'de fermantasyonu tamamlanan hamurlarda ise; beklenildiği üzere en yüksek *Lactobacillus* cinsi  $10^6$  kob/g suş inoküle edilen fermente hamurlarda tespit edilmiştir. Bu cins 4,3 AGT (+) suşu ile hazırlanan hamurda %48, 4,3 AGT (-) ile hazırlanan da ise %69'dur. 4,3 AGT (+) ve AGT (-) suşların inokülasyon oranı arttıkça *Leuconostoc* cinsinin azaldığı ve benzer durumun 4,3 AGT (-) suşu ile aşılamanın hamurların *Lactococcus* içeriği içinde tespit edilmiştir.  $10^6$  kob/g inokülasyon oranında 4,3 AGT (-) suşuyla fermente edilen hamurda %0,03 olarak tespit edilen *Lactococcus*, aynı oranda 4,3 AGT (+) suşu içeren ekşi hamur için ise %3'tür. *Weissella* cinsi 4,3 AGT (+) suşu ile hazırlanan hamurlarda  $10^2$ ,  $10^4$  ve  $10^6$  kob/g aşılama oranında %9, %13 ve %15 iken 4,3 AGT (-) suşu ile aşılamanın hamurlarda ise sırasıyla %0,08, %4 ve %0,08'dir.

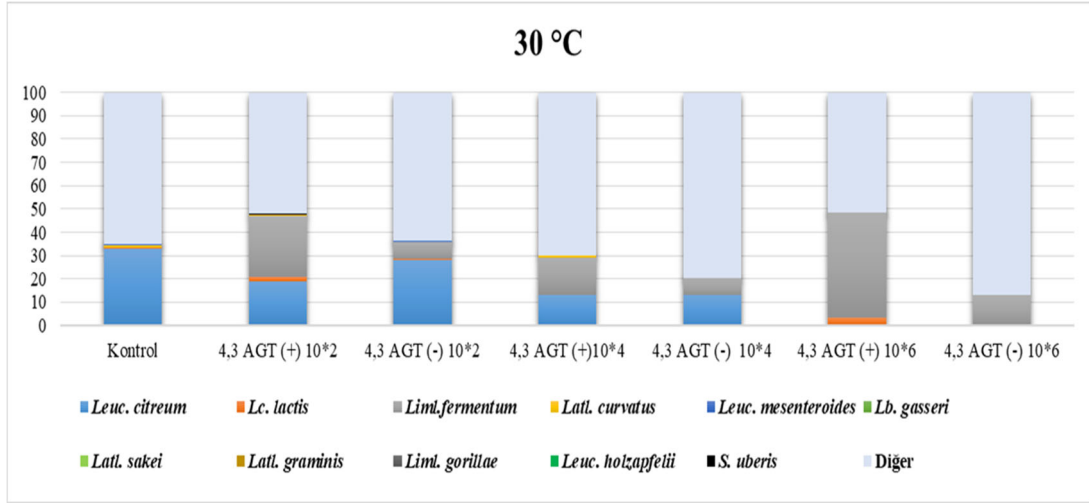
Hamurların tür düzeyinde mikroflorasının tanımlanmasında, 25 °C'de 4,3 AGT (+) laktobasilin hamurda inokülasyon oranı arttıkça *Liml. fermentum*'un arttığı gözlenmiştir. Nitekim  $10^2$  kob/g 4,3 AGT (+) suşu inokülasyonunda %0,01 olan *Liml. fermentum*  $10^6$  kob/g'da %8'dir. *Liml. fermentum* 4,3 AGT (-) suşunun  $10^6$  kob/g inoküle edilerek hazırlandığı hamurda ise %3'e yükselmiştir. Her iki suşun da inokülasyon oranı artışı ile *Leuconostoc citreum* üzerinde azaltıcı yönde bir etkisi olmuştur. Ayrıca *Lc. lactis* her iki hamurda da tüm inokülasyon oranlarında tespit edilmiştir. 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasillerinin hamurlarında 25 °C'de *Leuc. mesenteroides*'in varlığı oldukça düşük kalıp AGT (-) laktobasil suşun  $10^6$  kob/g inokülasyonunda görülmemiştir. *Latl. curvatus*, AGT (+) laktobasil içeren hamurlarda en az %1 oranında varlığını sürdürürken 4,3 AGT (-) suşunun hamura en yüksek oranda inokülasyonunda tespit edilememiştir. Yine *Lb. gasseri* sadece 4,3 AGT (+)'nin  $10^6$  kob/g inokülasyonunda görülmüştür (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15:** Kontrol hamurunun, 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş, 25 °C’de fermentasyon sonucu elde edilen hamurların tür çeşitliliği

30 °C’de fermente edilen hamurlarda, *Liml. fermentum* suşunun; 4,3 AGT (+) suşu ile hazırlanan hamurların 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup> ve 10<sup>6</sup> kob/g inokülasyonlarında sırasıyla %26, %16 ve %45 değerlerine ulaşırken 4,3 AGT (-) suşunun aynı oranda inokülasyonlarında ise; %7, %7 ve %13’tür. *Limisolactobacillus gorillae*, 10<sup>6</sup> kob/g inokülasyonda 4,3 AGT (+) suşu için %0,009, 4,3 AGT (-) suşu için ise %0,003 olmuştur. *Lb. gasseri* sadece 4,3 AGT (+) suşun tüm hamurlarında gözlemlenirken 4,3 AGT (-) suşunun hiçbir hamurunda yer almamıştır. Bu sıcaklık için her iki laktobasilinde farklı oranlarda inoküle edilmesiyle elde edilen ekşi hamurlardan en az birinde değişen oranlarda olsa da *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. citreum*, *Lc. lactis* ve *Latl. curvatus* bulunurken *Latl. sakei* sadece 10<sup>6</sup> kob/g oranında 4,3 AGT (+) ile hazırlanan hamurda %0,03 olarak bulunmuştur (Şekil 4.16).





**Şekil 4.16:** Kontrol hamurunun, 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ile farklı oranlarda inoküle edilmiş, 30 °C’de fermentasyon sonucu elde edilen hamurların tür çeşitliliği

Çalışmamızda fermentasyon sıcaklığının, başlangıç suş inokülasyon oranının ve kullanılan suşun nişastayı modifiye edici enzim üreticisi olmasının ekşi hamur mikroflora üzerinde önemli etkisi görülmüştür. Kontrol hamuru dahil 4,6 AGT (+),(-) ve 4,3 AGT (+), (-) suşları ile hazırlanan tüm hamurlarda başlangıç suş inokülasyon oranına bakılmaksızın *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. citreum*, *Lc. lactis*, *Latl. curvatus*, *Latl. sakei* değişen oranlarda gelişmiştir. 25 °C’de sadece 10<sup>6</sup> inokülasyonda tespit edilen AGT (+) *Liml. reuteri*’nin varlığı 30°C’de 10<sup>4</sup> ve 10<sup>6</sup> inokülasyonda da tespit edilmiştir. 25 °C’de AGT (-) *Liml. reuteri*’nin herhangi bir inokülasyonda tespit edilemeyip 30 °C’de ise 10<sup>4</sup> ve 10<sup>6</sup> inokülasyonda AGT (+) startere göre daha düşük kalması genin varlığının mikroflora üzerinde suşun canlılığını sürdürebilmesi yönünde etkisini göstermektedir.

Kontrol hamurunda artan sıcaklık *Liml. fermentum* suşunun oranını azaltırken AGT (+) ve (-) hamurlarda sıcaklık artışının inokülasyon artışı ile birlikte *Liml. fermentum* yükünü arttırmıştır. Ancak bu artış en fazla 4,3 AGT (+) suş ile fermente edilen hamurlarda olmuştur. Ayrıca *Liml. fermentum*’un AGT (+) olan hamurlarda *Lb. gasseri* gibi probiyotik bir suşun varlığının tespit edilmesi starterin modifiye edebildiği nişastanın son durumda prebiyotik özellikte olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim *Lb. gasseri* suşu *Liml. fermentum*’un AGT (-) suşunu içeren tüm hamurlarda her iki sıcaklık ve inokülasyon oranında da tespit edilmemiştir.

Türkiye’de üretilen ekşi hamurlarda *Levl. brevis*, *Coml. alimentarius* ve *Lacp. plantarum* türleri oldukça yaygın şekilde izole edilmiştir. Çeşitli illerinde ekşi hamur ekmeği yapımı için kullanılan olgun ekşi hamurların toplandığı ve LAB çeşitliliği karakterize edildiği çalışmada *Lacp. plantarum*, *Frul. sanfranciscensis*, *Furfurilactobacillus rossiae*, *P. pentosaceus*, *Leuc. mesenteroides*, *Levilactobacillus namurensis*, *Levilactobacillus zymae*, *Levilactobacillus spicheri*, *Lacc. casei*, *Companilactobacillus mindensis*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Companilactobacillus farciminis*, *Coml. paralimentarius*, *Enterococcus durans*, *E. faecium*, *W. confusa* tanımlanmıştır (Yağmur ve diğ. 2016).

Sevgili ve diğ. (2023) Konya, Mardin ve Gaziantep illerinden toplanan ekşi hamurlarda yaptığı çalışmada %43,33 *Levl. brevis*, %21,7 *Pediococcus acidilactici*, %18,3 *Lacp. plantarum* ve %3,3 *Lacp. pentosus* tespit etmişlerdir.

Benzer şekilde Doğan ve Tekiner (2019) tarafından Türkiye’nin farklı illerinden temin edilen ekşi hamurlardan izole edilen bakterilerin probiyotik özelliklerinin değerlendirildiği çalışmada, *P. pentosaceus* (18) ve *Levl. brevis* (14) başta olmak üzere *Lacc. casei* (10), *P. acidilactici* (10), *Lacc. rhamnosus* (9), *Lacp. pentosus* (8), *Lacp. plantarum* (8), *Liml. fermentum* (6), *Lc. lactis* (6) ve *E. faecium* (4) izole edilmiştir.

Dertli ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada Vakfikebir (Trabzon) ilçesinden toplanan ekşi hamurların LAB mikroflorası tanımlanmıştır. Heterofermentatif LAB baskın olmakla birlikte homofermentatif türler de bulunmuştur. Homofermentatif türler; *Lacp. plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Latl. curvatus* iken heterofermentatif olanlar; *Furl. rossiae*, *Frul. sanfranciscensis*, *Levl. brevis*, *Coml. paralimentarius*, *Weissella paramesenteroides*, *Leuc. mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* ve *W. cibaria* olarak tespit edilmiştir.

### 4.3 4,6 ve 4,3 AGT (+) ve (-) Laktobasiller ile Fermente Edilen Ekşi Hamurların Kullanılmasıyla Üretilen Ekmeklerin Özellikleri

#### 4.3.1 4,6 ve 4,3 AGT (+) ve (-) Laktobasiller ile Fermente Edilen Hamurların Viskozite Özellikleri

Reolojik ölçüm sonuçlarıyla hamur örneklerinin hem polimer yapısı hem de işleme kabiliyeti hakkında bilgi edinilirken aynı zamanda nihai ürününde kalitesi hakkında bir fikir elde edilebilir. Tablo 4.22 ve 4.23'te verilen 'C' hamuru tüm hamurlar için 3. pasaj sonundaki kontrol hamurunu temsil etmektedir. (C<sub>0</sub> fermentasyonun başlangıcındaki hamuru temsil etmektedir ve tabloda değerler verilmemiştir). Burada görüldüğü üzere kontrol hamuru ile birlikte diğer örnekler de (hem 4,6 hem 4,3  $\alpha$ -GT için hazırlanan) shear thinning davranış sergileyerek zayıf pseudoplastik özelliğe sahip oldukları görülmüştür (n<1). Ancak; hem 4,6 AGT (+) ve (-) hem de 4,3 AGT (+) ve (-) suşların kullanıldığı hamur örneklerinde n değerleri arasında istatistiksel anlamda fark bulunmamıştır (p>0,05).

Bir akışkanın kıvam katsayısı, viskozite ile ilişkilidir ve kıvam katsayısının yüksek olması viskozitenin de yüksek olduğunu anlamına gelir. Fermentasyon sürecinin tamamlanmasıyla tüm ekşi hamurlarda kıvam katsayısında (k) başlangıç hamura göre (C<sub>0</sub>) tipik bir düşüş gözlemlenmiştir. Kontrol hamurunun k değeri ise diğer hamurlardan oldukça düşük bulunmuştur. Burada kontrol hamuruna göre hem 4,6 hem de 4,3 AGT deneme deseninde k değeri değişimi fermentasyon için kullanılan laktobasiller tarafından *in situ* üretilen EPS'ye atfedilebilir. EPS'nin su bağlama kapasitesi ve hamurlardaki proteinlerle etkileşime girme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Nitekim Coda ve diğ. (2018) tarafından *Leuc. citreum* FDR241 suşu buğday unu kullanılarak üretilen Tip 1 ekşi hamurunda viskozite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bir homopolimerik EPS olan dekstran üreten bu bakteri karakterize edilen ekşi hamurlarda fermentasyonun başlangıcına kıyasla viskozitenin 2-2,6 kat artışını sağlamıştır.

**Tablo 4.22:** Kontrol hamuru ve 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ile fermente edilen hamurların viskozite özellikleri

Örnekler	Kıvam Katsayısı (Pa.s) <sup>n</sup>	Akış Davranış İndeksi (n)	R <sup>2</sup>
Kontrol	3,45±1,08 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,98
4,6 AGT (+)	20,48±6,54 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,99
4,6 AGT (-)	19,44±6,19 <sup>b</sup>	0,69 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,99

\*Her sütündeki harfler örneklerin kendi arasında istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05).

\*\*Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

**Tablo 4.23:** Kontrol hamuru ve 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ile fermente edilen hamurların viskozite özellikleri

Örnekler	Kıvam Katsayısı (Pa.s) <sup>n</sup>	Akış Davranış İndeksi (n)	R <sup>2</sup>
Kontrol	3,45±1,08 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,98
4,3 AGT (+)	18,40±4,22 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,98
4,3 AGT (-)	13,33±2,92 <sup>ab</sup>	0,76 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,99

\*Her sütündeki harfler örneklerin kendi arasında istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05).

\*\*Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

#### 4.3.2 4,6 ve 4,3 AGT (+) ve (-) Laktobasiller ile Fermente Edilen Ekşi Hamurlar Kullanılarak Üretilen Ekmeklerin Fiziksel Özellikleri

Bilindiği üzere spesifik hacim glutenin fermantasyon boyunca ve hamurun son fermentasyon aşamasında oluşan CO<sub>2</sub>'yi tutma yeteneğini ile ekmeğin de görüntüsü ve tekstürü hakkında bilgi veren önemli bir kalite parametresidir. Elgün ve diğ. (2012) üretilen ekmeklerin spesifik hacimlerinin 3,20-3,80 arasında kabul edilebilir olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada hazırlanan ekmeklerin spesifik hacimleri her iki enzim grubu içinde bu aralıktadır ve Tablo 4.24-4.25'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.24:** Kontrol hamuru ve 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ekşi hamurları ile hazırlanan ekmeklerin spesifik hacim özellikleri

Örnek	Ağırlık (g)	Hacim (ml)	Spesifik Hacim (ml/g)	Fire (%)
Kontrol Ekmek	137,30±1,35 <sup>a</sup>	458,00±12,00 <sup>ab</sup>	3,34±0,05 <sup>a</sup>	14,19±0,84
4,6 AGT (+)	138,65±0,48 <sup>a</sup>	500,00±5,77 <sup>a</sup>	3,61±0,04 <sup>b</sup>	13,34±0,30
4,6 AGT (-)	139,52±1,22 <sup>a</sup>	455,00±5,00 <sup>b</sup>	3,19±0,01 <sup>a</sup>	12,80±0,76

\*Her sütündeki harfler örneklerin kendi arasında istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder

*Liml. reuteri* ile fermente edilen ekşi hamurlar kullanılarak hazırlanan ekmeklerin olduğu grupta en yüksek hacim 3,30 değeri ile AGT (+) gruba ait olup kontrol ekmeğine göre hacimde % 6,66'lık bir artış söz konusudur. AGT (-) ekmeğin ise 3,19 ile kontrol ekmeğinden de daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.24). *Liml. fermentum* içeren hamurlara baktığımızda ise kontrol grubuna göre AGT (+) olan ekmek hacminde artış vardır; ancak bu artış AGT (-)'e göre düşüktür (Tablo 4.25).

**Tablo 4.25:** Kontrol, 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ekşi hamurları ile hazırlanan ekmeklerin spesifik hacim özellikleri

Örnek	Ağırlık (g)	Hacim (ml)	Spesifik Hacim (ml/g)	Fire (%)
Kontrol Ekmek	137,30±1,35 <sup>a</sup>	458,00±12,00 <sup>a</sup>	3,34±0,05 <sup>a</sup>	14,19±0,84
4,3 AGT(+)	139,70±0,40 <sup>a</sup>	542,50±12,50 <sup>b</sup>	3,88±0,08 <sup>b</sup>	12,69±0,25
4,3 AGT(-)	137,30±2,60 <sup>a</sup>	476,00±6,00 <sup>a</sup>	3,47±0,02 <sup>a</sup>	14,19±1,63

\*Her sütündeki harfler örneklerin kendi arasında istatistiksel açıdan karşılaştırılmasını ifade eder (p<0,05).

\*\*Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

Li ve diğ. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada *S. thermophilus* tarafından üretilen 4,6 GtfB enzimi 0,04–0,16 U/g olacak şekilde hamur ortamına eklenmiş ve ekmek üretimi gerçekleştirilmiştir. 0,04 U/g enzim eklemenin ekmek spesifik hacminde kontrole göre %11,4-2,3 oranında artış tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları da söz konusu literatür verisiyle benzerdir. Buna göre glukanotransferazların ekmeklerin spesifik hacminde etkili olduğu anlaşılmaktadır.

Hazırlanan ekmeklerin tekstürel özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılan analiz sonuçları 4,6 AGT enzimi için Tablo 4.26 ve 4,3 AGT enzimi için Tablo 4.27'de verilmiştir.

**Tablo 4.26:** Kontrol, 4,6 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerinin tekstürel özellikleri

<b>SERTLİK</b>				
	<b>0.GÜN</b>	<b>3.GÜN</b>	<b>5.GÜN</b>	<b>7.GÜN</b>
<b>Kontrol</b>	3,72±0,29 <sup>Aa</sup>	9,53±0,69 <sup>Ba</sup>	11,89±0,71 <sup>Ba</sup>	23,42±1,64 <sup>Ca</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	3,70 ±0,10 <sup>Aa</sup>	8,59±0,88 <sup>Ba</sup>	14,73±0,78 <sup>Cb</sup>	15,37±1,00 <sup>Cb</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	3,29±0,47 <sup>Aa</sup>	7,18±0,26 <sup>Aa</sup>	16,43±0,98 <sup>Bb</sup>	24,24±1,71 <sup>Ca</sup>
<b>ÇİĞNENEİLİRLİK</b>				
	<b>0.GÜN</b>	<b>3.GÜN</b>	<b>5.GÜN</b>	<b>7.GÜN</b>
<b>Kontrol</b>	22,04±1,39 <sup>Aa</sup>	39,63±2,12 <sup>Ba</sup>	50,57±2,45 <sup>Ca</sup>	53,35±2,35 <sup>Ca</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	22,57±0,62 <sup>Aa</sup>	37,87±3,15 <sup>Ba</sup>	52,88±2,40 <sup>Ca</sup>	52,05±2,12 <sup>Ca</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	23,24±2,82 <sup>Aa</sup>	39,07±2,76 <sup>Ba</sup>	51,61±1,77 <sup>Ca</sup>	51,70±4,28 <sup>Ca</sup>
<b>İÇ YAPIŞKANLIK</b>				
	<b>0.GÜN</b>	<b>3.GÜN</b>	<b>5.GÜN</b>	<b>7.GÜN</b>
<b>Kontrol</b>	0,74±0,01 <sup>Aa</sup>	0,54±0,01 <sup>Ba</sup>	0,47±0,01 <sup>Ca</sup>	0,38±0,01 <sup>Da</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	0,78±0,00 <sup>BAa</sup>	0,57±0,01 <sup>Ba</sup>	0,50±0,01 <sup>Ca</sup>	0,43±0,01 <sup>Db</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	0,79±0,01 <sup>Ab</sup>	0,55±0,02 <sup>Ba</sup>	0,50±0,02 <sup>Ba</sup>	0,40±0,01 <sup>Cab</sup>
<b>SAKIZIMSILIK</b>				
	<b>0.GÜN</b>	<b>3.GÜN</b>	<b>5.GÜN</b>	<b>7.GÜN</b>
<b>Kontrol</b>	2,78±0,18 <sup>Aa</sup>	5,35±0,48 <sup>Ba</sup>	6,49±0,44 <sup>BCa</sup>	7,36±0,35 <sup>Ca</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	2,86±0,07 <sup>Aa</sup>	5,24±0,45 <sup>Ba</sup>	7,00±0,41 <sup>Ca</sup>	7,37±0,44 <sup>Ca</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	2,55±0,32 <sup>Aa</sup>	4,90±0,40 <sup>Ba</sup>	6,43±0,38 <sup>Ba</sup>	6,63±0,66 <sup>Ba</sup>
<b>ELASTİKİYET</b>				
	<b>0.GÜN</b>	<b>3.GÜN</b>	<b>5.GÜN</b>	<b>7.GÜN</b>
<b>Kontrol</b>	7,95±0,08 <sup>Aa</sup>	7,71±0,07 <sup>ABa</sup>	7,70±0,12 <sup>ABa</sup>	7,39±0,10 <sup>Ba</sup>
<b>4,6 AGT (+)</b>	7,87±0,06 <sup>Aa</sup>	7,73±0,08 <sup>ABa</sup>	7,69±0,07 <sup>ABa</sup>	7,54±0,09 <sup>Ba</sup>
<b>4,6 AGT (-)</b>	8,13±0,07 <sup>Aa</sup>	7,94±0,13 <sup>ABa</sup>	7,74±0,13 <sup>ABa</sup>	7,72±0,10 <sup>Ba</sup>

\* Değerlendirilen her özellikte aynı sütundaki küçük harfler örneklerin kendi arasında ve aynı satırdaki büyük harfler örneğin depolama günleri arasında istatistiksel açıdan farklılığını ifade eder (p<0,05).

\*\*Sonaçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

Sertlik (Hardness) ekmeği sıkıştırmak için gereken maksimum kuvveti gösteren önemli bir parametredir (Terrazas-Avila ve diğ 2024). Tablo 4.26'da görüldüğü üzere depolamanın ilk gününden 7. gününe kadar ekmeklerin sertliğinde artış meydana gelmiştir. Üretim sonrası ve 3. günde tüm ekmeklerin sertlik değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0,05). Depolamanın 5. gününde 4,6 AGT (+) ve (-) suşlarının fermente ettiği ekşi hamuru içeren ekmeklerin sertlik değerleri benzerdir (p>0,05). Depolamanın son gününde ise AGT (+) ekmeğin sertlik değeri kontrol ve AGT (-) ekmeklerin sertlik değerlerinden düşüktür (p<0,05).

**Tablo 4.27:** Kontrol, 4,3 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerinin tekstürel özellikleri

<b>SERTLİK</b>				
	<b>0.GÜN</b>	<b>3.GÜN</b>	<b>5.GÜN</b>	<b>7.GÜN</b>
<b>Kontrol</b>	3,72±0,29 <sup>Aa</sup>	9,53±0,69 <sup>Ba</sup>	11,89±0,71 <sup>Ba</sup>	23,42±1,64 <sup>Ca</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	2,63±0,14 <sup>Ab</sup>	7,33±0,21 <sup>Bab</sup>	9,03±0,29 <sup>Cb</sup>	11,53±0,85 <sup>Db</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	2,11±0,10 <sup>Ab</sup>	6,36±0,28 <sup>Bb</sup>	9,01±0,37 <sup>Cb</sup>	15,53±0,99 <sup>Db</sup>
<b>ÇİGNENEBİLİRLİK</b>				
	<b>0.GÜN</b>	<b>3.GÜN</b>	<b>5.GÜN</b>	<b>7.GÜN</b>
<b>Kontrol</b>	22,04±1,39 <sup>Aa</sup>	39,63±2,12 <sup>Ba</sup>	50,57±2,45 <sup>Ca</sup>	53,35±2,35 <sup>Ca</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	16,87±0,80 <sup>Ab</sup>	37,75±0,70 <sup>Bab</sup>	34,03±1,43 <sup>Bb</sup>	36,44±3,26 <sup>Bb</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	14,17±0,41 <sup>Ab</sup>	30,31±1,04 <sup>Bb</sup>	37,29±1,42 <sup>Cb</sup>	41,60±1,58 <sup>Cab</sup>
<b>İÇ YAPIŞKANLIK</b>				
	<b>0.GÜN</b>	<b>3.GÜN</b>	<b>5.GÜN</b>	<b>7.GÜN</b>
<b>Kontrol</b>	0,74±0,01 <sup>Aa</sup>	0,54±0,01 <sup>Ba</sup>	0,47±0,01 <sup>Ca</sup>	0,38±0,01 <sup>Da</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	0,79±0,01 <sup>Aa</sup>	0,57±0,01 <sup>Bab</sup>	0,48±0,02 <sup>Ca</sup>	0,41±0,01 <sup>Da</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	0,80±0,01 <sup>Aa</sup>	0,62±0,02 <sup>Bb</sup>	0,49±0,01 <sup>Ca</sup>	0,43±0,02 <sup>Da</sup>
<b>SAKIZIMSILIK</b>				
	<b>0.GÜN</b>	<b>3.GÜN</b>	<b>5.GÜN</b>	<b>7.GÜN</b>
<b>Kontrol</b>	2,78±0,18 <sup>Aa</sup>	5,35±0,48 <sup>Ba</sup>	6,49±0,44 <sup>BCa</sup>	7,36±0,35 <sup>Ca</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	2,07±0,09 <sup>Ab</sup>	4,07±0,08 <sup>Ba</sup>	4,45±0,24 <sup>Bb</sup>	4,76±0,41 <sup>Bb</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	1,68±0,08 <sup>Ab</sup>	4,08±0,24 <sup>Ba</sup>	4,50±0,20 <sup>Bb</sup>	7,58±0,80 <sup>Ca</sup>
<b>ELASTİKİYET</b>				
	<b>0.GÜN</b>	<b>3.GÜN</b>	<b>5.GÜN</b>	<b>7.GÜN</b>
<b>Kontrol</b>	7,95±0,08 <sup>Aa</sup>	7,71±0,07 <sup>ABa</sup>	7,70±0,12 <sup>ABa</sup>	7,39±0,10 <sup>Ca</sup>
<b>4,3 AGT (+)</b>	8,14±0,06 <sup>Aa</sup>	8,05±0,05 <sup>ABb</sup>	7,93±0,04 <sup>Ba</sup>	7,65±0,06 <sup>Cab</sup>
<b>4,3 AGT (-)</b>	8,12±0,07 <sup>Aa</sup>	8,01±0,04 <sup>Ab</sup>	8,01±0,07 <sup>Aa</sup>	7,98±0,05 <sup>Ab</sup>

\* Değerlendirilen her özellikte aynı sütundaki küçük harfler örneklerin kendi arasında ve aynı satırdaki büyük harfler örneğin depolama günleri arasında istatistiksel açıdan farklılığını ifade eder (p<0,05).

\*\*Sonnular ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

Tablo 4.27’de verilen ekmek sertlikleri incelendiğinde ise depolamanın ilk günü kontrol ekmeğinin, laktobasil ile fermente edilen ekşi hamurları içeren ekmeklere göre daha yüksek sertlik değerine sahip olduğu görülmüştür (p<0,05). Depolamanın ilerlemesiyle bu durum devam etmiş ve 7.günde 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil içeren ekşi hamurlarla hazırlanan ekmekler sırasıyla 11,53 ve 15,53 N sertlik değerleri kontrol ekmeğinden daha düşük sertlik değerine sahip olmuşlardır (p<0,05).

Kontrol ve AGT (-) gruplara göre 4,6 ve 4,3 AGT (+) grup ekmeklerin daha düşük sertliğe sahip bulunması glukanotransferaz enziminin bayatlamının geciktirilmesinde rol oynadığına işaret etmektedir. Ekmek sertliğinin artışı ekmeğın bayatlamasının bir göstergesi olup bu durumdan başlıca nişastanın retrogradasyonu sorumludur (Elgün ve Ertugay 2002). Dolayısıyla bu çalışmanın sonuçları hem 4,6 hem de 4,3 AGT (+) genleri içeren laktobasillerle fermente edilerek hazırlanan ekşi hamurların ekmekte kullanılması ile birlikte muhtemelen nişasta yapısında

modifikasyonların oluştuğu buna karşılık olarak da retrogradasyon davranışın da değiştiği şeklinde yorumlanabilir.

Çiğnenebilirlik, bir yiyeceği yutana kadar ezmek ve çiğnemek için gereken enerji miktarı olarak tanımlanır (Terrazas-Avila ve diğ 2024). Depolamanın ilk günden son gününe kadar 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasil ile fermete edilen ekşi hamuru içeren ekmeklerin çiğnenebilirlik değerleri kontrol ekmeği ile benzer bulunmuştur (Tablo 4.26) ( $p>0,05$ ). Ancak 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil ile fermente edilen ekşi hamuru içeren ekmeklerde ise depolamanın ilk günü kontrolden farklı olarak çiğnenebilirlik değeri istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur (Tablo 4.27) ( $p<0,05$ ). Depolamanın tüm günlerinde ekmeğin çiğnenebilirlik değerleri kontrol ekmeğinde yüksek olup beklenildiği üzere 7.günde en yüksek değere ulaşmıştır. Depolamanın son günü 4,3 AGT(+) laktobasil ile fermente edilen ekşi hamuru içeren ekmeğin çiğnenebilirlik değerleri 36,44 olup, 4,3 AGT(-) ile fermente edilen ekşi hamur ile hazırlanan ekmekten daha düşüktür ( $p>0,05$ ). Her iki enzim grubu değerlendirildiğinde, 4,3 AGT enziminin 4,6 AGT enzimine göre ekmeğin çiğnenebilirlik özelliklerine daha fazla etkili olduğu anlaşılmaktadır. Bu durumun enzimin yeni bağlanmalarla oluşturduğu glukan yapılarından kaynakladığı şeklinde yorumlanabilir.

Yapışkanlık, ekmek kırıntısını oluşturan i bağların gücü ve yiyecekleri çiğnemek için gereken enerji ile ilgilidir (Iglesias-Puig ve Haros, 2013). Depolama süresine paralel olarak tüm gruplarda yapışkanlık değerlerinin azaldığı görölmüştür. Ekmeklerin ilk üretildiği anda 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasillerin kullanıldığı ekşi hamurlar ile hazırlanan ekmeklerin yapışkanlık değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Ayrıca kontrol ekmeği de dahil 4,6 AGT (+) ve (-) laktobasillerin kullanıldığı ekşi hamurlar ile hazırlanan ekmeklerin 3. ve 5. gün yapışkanlık değerleri istatistiksel açıdan benzer olup ( $p>0,05$ ) depolamanın son günü 4,6 AGT (+) laktobasil içeren ekşi hamur ile üretilen ekmeklerin kontrol grubuna göre yapışkanlık değerleri yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

4,3 AGT (+) ve (-) laktobasilleri kullanılarak üretilen ekşi hamur ekmeklerinin 0. günü ve 3. günü yapışkanlık değerleri kontrol ekmeğinden istatistiksel açıdan farklı olup ( $p<0,05$ ) depolamanın kalan günlerinde ise yine bu grup ekmeklerin iç yapışkanlık özelliklerin düşük olduğu görölmüştür.



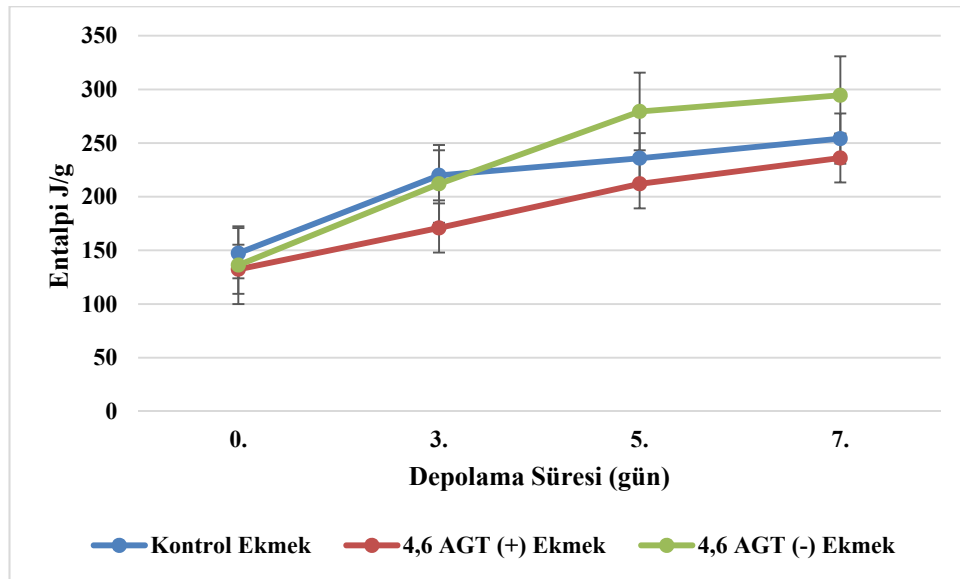
Sakızımsılık (gumminess), sertlik ve yapışkanlık değerlerinin çarpımı olarak ifade edilmektedir (Gerçekaslan ve diğ. 2007). Tablo 4.26'da görüleceği üzere tüm ekmeğin gruplarında depolama ile birlikte sakızımsılık değerleri artışı görülmüş ve sakızımsılık verileri bakımından istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Tablo 4.27'de ise 0. gün 4,3 AGT (+) ve (-) laktobasil suşlarını içeren ekşi hamur ile üretilen ekmeklerin kontrol ekmeğinden daha düşük sakızımsılık değerine sahip olduğu ve 3. günden sonra bu farkın olmadığı görülmüştür. Depolamanın 5. gününde 4,3 AGT(+) ve (-) suşları ile üretilen ekşi hamurları içeren ekmeklerin sırasıyla 4,45 ve 4,50 sakızımsılık değerlerine ulaşmış olup kontrol ekmeği ile aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Depolamanın son gününde ise kontrol ekmeği ve 4,3 AGT (-) suş ile fermente edilen ekşi hamuru içeren ekmeğin sakızımsılık değeri açısından istatistiksel olarak birbirine benzer olup 4,3 AGT(+) suş ile fermente edilen ekşi hamuru içeren ekmeğin hepsinden farklıdır ve en düşük değere sahiptir (4,76).

Elastikiyet; gıdanın ilk ısırmanın sonu ile ikinci ısırmanın başlangıcı arasında geçen süre boyunca toparlandığı yüksekliği ifade etmektedir. Kontrol ekmeği, 4,6 AGT (+) ve (-) suşlar ile fermente edilerek hazırlanan ekşi hamurların kullanıldığı ekmeklerin elastikiyet değeri depolama ile birlikte azalmış, fakat ekmekler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Benzer durum 4,3 AGT (+) ve (-) suşlar ile fermente edilerek hazırlanan ekşi hamurların kullanıldığı ekmekler ve kontrol ekmeği arasında görülmüştür. Ekşi hamur ekmeklerinin elastikiyetinin üzerinde kullanılan suşların *gtfB* geninin varlığı etkili olmamıştır.

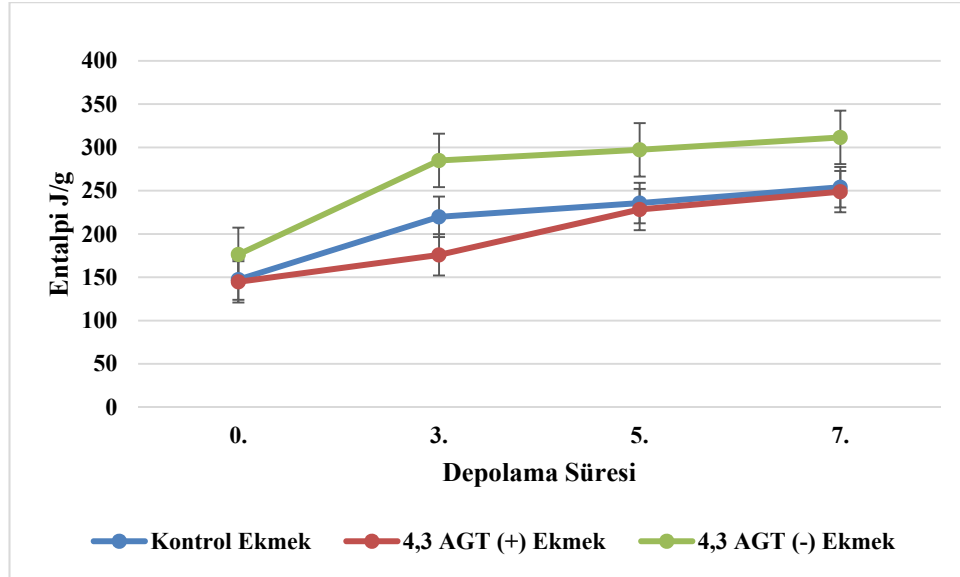
Ekmeğin bayatlaması hem makroskobik hem de moleküler ölçüde birçok reaksiyonu barındıran fizikokimyasal süreçtir. Lezzet, tekstür gibi önemli duyuşsal parametrelerin kaybı ile sonuçlanan bu sürecin mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak yine de bayatlamadan sorumlu en temel etkilerin; nişasta dönüşümü, nişasta-gluten etkileşimleri ve nemin yeniden dağılımı olduğu bilinmektedir. Nişastada kristalliğin uzun süreli gelişimi, bayatlama sürecine dahil olan amilopektin fraksiyonundan kaynaklanmaktadır. Çalışmada incelenen her iki grup enzim için hazırlanan ekşi hamur ekmeklerinin ve kontrol ekmeğinin jeletinizasyon başlangıcı (endotermik pik) ( $T_0$ ) başlangıcı  $40^{\circ}\text{C}$  civarında olduğu tespit edilmiştir. Endotermik pik esasen çift sarmal konformasyonlarda bulunan bitişik

nişasta polimer zincirleri arasındaki hidrojen bağlarının kırılmasıyla sonuçlanan absorbe edilen termal enerjidir.

4,6 AGT enziminin ekmeğin bayatlaması üzerine etkisini tespit etmek için hazırlanan ekşi hamur ekmeklerinde; kontrol ekmeği ile 4,6 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerin arasında depolamanın ilk gününde entalpi değişimi ( $\Delta H$ ) açısından belirgin fark bulunmazken depolamanın ilerlemesi ile 4,6 AGT (+) suş inoküle edilen ekşi hamurla hazırlanan ekmeğin daha düşük entalpi değerleri gözlenmiştir (Şekil 4.17). Bu durum 4,3 AGT (+) ekmeklerde de gözlenmiş olup entalpideki bu fark 5. ve 7. gün depolamanın sonunda daha belirgindir (Şekil 4.18). Amilopektindeki  $\alpha$ -(1,4) glikozidik bağların stabilitesi  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağlardan daha yüksektir. 4,6 ve 4,3 AGT (+) ekmeklerde kontrol ekmeği, 4,6 ve 4,3 AGT (-) ekmeklere nazaran entalpide daha az bir artışa; yeni  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağların oluşumu ve termal direnci azaltan  $\alpha$ -(1,4) glikozidik bağların parçalanarak jelatinleşme sıcaklıklarının düşmesi neden olabilir.



Şekil 4.17: Kontrol, 4,6 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerin farklı depolama süresince diferansiyel kalorimetrik değişimleri



**Şekil 4.18:** Kontrol, 4,3 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerin farklı depolama süresince diferansiyel kalorimetrik değişimleri

#### 4.3.2.1 Ekmeklerin GI Değerleri

Hazırlanan ekşi hamur ekmeklerinin GI ve HI değerleri Tablo 4.28 ve 4.29’da verilmiştir. 4,6 AGT (+) suşun ekşi hamur üretiminde kullanılması ile elde edilen ekmeğin beyaz ekmeğe göre GI değerinin 59,14 olduğu ve durumda 4,6 AGT (+) ekmeğin orta GI değerine sahip olduğu görülmektedir (Tablo 4.28). 4,3 AGT(+) suş kullanılarak üretilen ekmeklerin GI değeri de (Tablo 4.29) beyaz ekmeğe göre daha düşüktür; ancak bu durum istatistiksel açıdan önemli bir fark oluşturmamaktadır ( $p>0,05$ ). Glukanotransferaz enzimi, kolayca sindirilebilen  $\alpha$ -(1,4) bağlarının miktarını azaltarak ve  $\alpha$ -amilaz tarafından parçalanamayan  $\alpha$ -(1,6) ve (1,3) bağlarının eklenmesiyle nişastanın sindirilebilirliğini azalttığı düşünülmektedir.

**Tablo 4.28:** Beyaz ekmek, 4,6 AGT (+) ve (-) suşları kullanılarak hazırlanan ekşi hamur ekmeklerinin glisemik indeks değeri

Örnekler	HI	GI
Beyaz Ekmek	151,15±9,00 <sup>a</sup>	86,94±3,52 <sup>a</sup>
4,6 AGT (+) Ekmek	80,09±0,95 <sup>b</sup>	59,14±0,37 <sup>b</sup>
4,6 AGT (-) Ekmek	125,93±4,01 <sup>c</sup>	77,07±1,57 <sup>c</sup>

\*Değerlendirilen her özelliğe aynı sütundaki harfler örneklerin kendi arasında istatistiksel açıdan farklılığını ifade eder ( $p<0,05$ ).

\*\*Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

**Tablo 4.29:** Beyaz ekme , 4,3 AGT (+) ve (-) suşları kullanılarak hazırlanan ekşi hamur ekmeklerinin glisemik indeks değeri

<b>Örnekler</b>	<b>HI</b>	<b>GI</b>
Beyaz Ekmek	151,15±9,00 <sup>a</sup>	86,94±3,52 <sup>a</sup>
4,3 AGT (+) Ekmek	129,82±2,99 <sup>a</sup>	78,60±1,17 <sup>a</sup>
4,3 AGT (-) Ekmek	138,17±0,50 <sup>a</sup>	81,86±0,20 <sup>a</sup>

\*Değerlendirilen her özellihte aynı sütundaki harfler örneklerin kendi arasında istatistiksel açıdan farklılığını ifade eder (p<0,05).

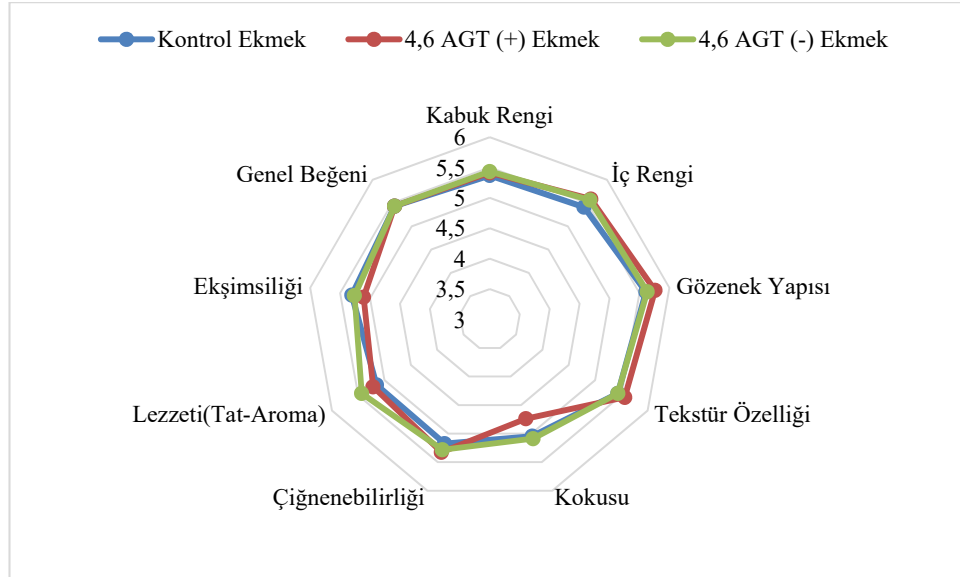
\*\*Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

### **Duyusal Özellikler**

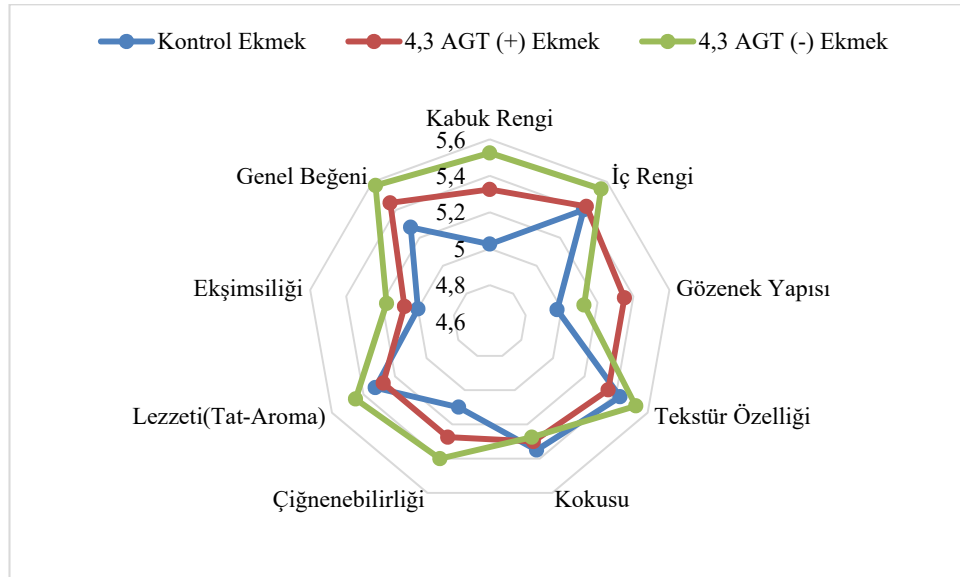
4,6 AGT (+), (-) ve 4,3 AGT (+), (-) laktobasiller kullanılarak ve spontan olarak elde edilen preferment hamurlardan üretilen ekşi hamur ekmeklerinin duyuasal profili sırasıyla Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de gösterilmiştir.

4,6 AGT (+) ve (-) laktobasiller ile hazırlanan preferment hamurlardan elde edilen ekmekler ile kontrol ekmeği arasında değerlendirilen tüm duyuasal özellikler bakımından istatistiksel açıdan bir fark görölmemiştir (p>0,05). Bununla beraber 4,6 AGT (+) suş ile fermente edilerek hazırlanan hamurdan üretilen ekmeğin gözenek yapısı ve tekstürü kontrol ekmeği ve 4,6 AGT(-) suş ile hazırlanan ekşi hamurdan üretilen ekmeklere göre daha yüksek puan alırken; koku bakımından ise daha düşük beğeni kazanmıştır. Tüm ekmeklerde genel beğeni en yüksek 4,3 AGT (-) ekmeği için elde edilmiştir. Sonuç olarak genel duyuasal beğeni değiştirmesede 4,6 a-GT (+) suşun kullanıldığı ekmeklerin yapısal özelliğine olumlu katkı sağlayabileceğini göstermektedir (Şekil 4.19).

4,3 AGT (+) ve (-) suşlar ile hazırlanan preferment hamurlardan elde edilen ekmekler ile kontrol ekmekleri arasında kabuk rengi beğenisi hariç diğer tüm duyuasal özellikler bakımından istatistiksel açıdan bir fark görölmemiştir (p>0,05). Kontrol ekmeği ve 4,3 AGT(+) ekmeği kabuk rengi açısından benzer puana sahip olup (p>0,05), 4,3 AGT (-)ekmeği 5,53 ±0,14 skoru ile kontrol ekmeğinden farklı (p<0,05) 4,3 AGT (+) ekmeği ile benzerdir. Panelistlere sunulan özelliklerden AGT(+) suşu ile fermente edilen hamurun ekmeği gözenek yapısı bakımından diğer ekmeklerden daha yüksek puan almıştır (Şekil 4.20).



**Şekil 4.19:** Kontrol, 4,6 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerin duysal profili



**Şekil 4.20:** Kontrol, 4,3 AGT (+) ve (-) suş ile hazırlanan ekmeklerin duysal profili

Ekmek üretiminde ekşi hamur kullanılması ekmeğin duysal karakteristiğinin gelişimine katkı sağlayan bir süreçtir (Gobbetti ve diğ. 2014). Doğan (2021) tarafında yapılan çalışmada fitik asit üzerine etkili LAB'lerin çeşitli kombinasyonlarda kullanıldığı ekşi hamurlardan üretilen ekmeklerin spontan fermantasyon ile üretilen kontrol ekmeğine göre kabuk ve iç rengi, kokusu, lezzeti, gözenek yapısı ve genel kabul edilebilirliği daha yüksek bulunmuştur.

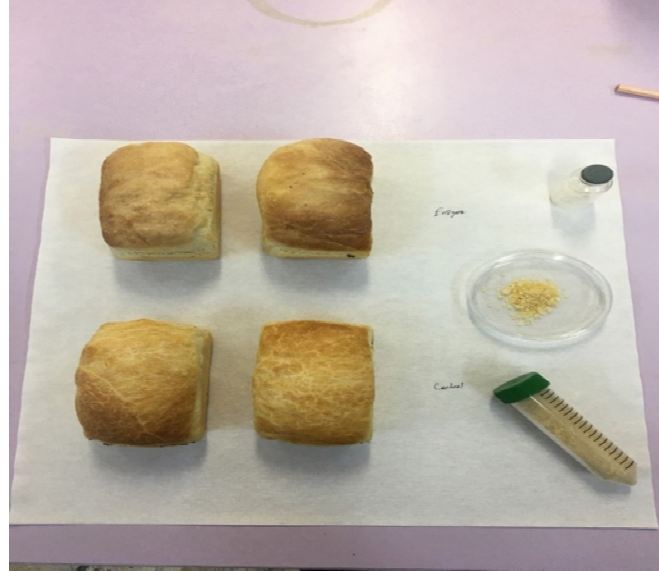
Bu çalışmaya benzer şekilde maya ve dört defa pasajlandıktan sonra 4 saat (S4) ve 24 saat (S24) 30 °C'de inkübe edilen ekşi hamurlar kullanılarak elde edilen ekmeklerden S4 ekmeğinin kabuk rengi ve gözenek yapısı yüksek skora sahip olmuştur, ancak ekmekler arasında genel lezzet açısından önemli bir fark bulunmamıştır (Rizzello ve diğ. 2019).

#### **4.4 4,6 ve 4,3 $\alpha$ -Glukanotransferaz Enzim Preparatlarının Fırıncılık Ürünlerinde Kullanılması ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi**

Çalışmanın bu kısmında projede üretilen iki farklı 4,6- ve 4,3- $\alpha$ -glukanotransferaz enzimlerinin fırıncılık ürünlerinde bayatlamamanın geciktirilmesi ve/veya glisemik indeksin düşürülmesi yönünde etkili olup olmadığının test edilmesi için fırıncılık ürünleri içerisinde oldukça önemli oranda tüketimi olan roll ekmek üretimi gerçekleştirilmiştir. Projede 4 U /g un aktiviteye sahip olacak şekilde liyofilize enzim örneği kullanılmış deney örneği (4,6- $\alpha$ -glukanotransferaz) ile enzim içermeyen kontrol örneğinin (C) üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.21 ve 4.22).



**Şekil 4.21:** 4 U /g un aktiviteye sahip liyofilize enzim örneği kullanılarak yapılan ekmek (4,6- $\alpha$ -glukanotransferaz) ile enzim içermeyen kontrol ekmeğın (C) pişirilme görüntüsü



**Şekil 4.22:** 4 U /g un aktiviteye sahip liyofilize enzim örneği kullanılarak yapılan ekmek (4,6- $\alpha$ -glukanotransferaz) ile enzim içermeyen kontrol ekmeğın (C) görüntüsü

#### 4.4.1 Ekmek ve Poğaç a Örneklerinin Spesifik Hacimlerinin Belirlenmesi

Kontrol ve enzim ilaveli ekmeklerin ağırlıklarında farklılık belirlenmezken, enzim ilaveli ekmeklerin hacimleri düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Paralel bir şekilde enzim katkılı ekmeklerde spesifik hacim düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Benzer sonuçlar poğaç a örnekleri için de tespit edilmiştir (Tablo 4.30). Hem ekmek hem de poğaç a örnekleri dikkate alındığında 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz enziminin spesifik hacmin düşmesinde daha fazla etkili olduğu dikkati çekmiştir. Bu sonuç muhtemelen nişasta fraksiyonlarındaki söz konusu enzimlerin etkisi ile nişasta-gluten yapısının zayıflaması ile ilişkili olabilir. Yapının zayıflaması ile gaz tutma kapasitesinde azalmanın meydana geldiğine işaret etmektedir.

**Tablo 4.30:** Ekmek ve poğaç a örneklerinin fiziksel özellikleri

Örnek	Ağırlık (g)	Hacim (ml)	Spesifik Hacim (ml/g)	Fire (%)
<b>Kontrol Ekmek</b>	138,88 $\pm$ 2,65 <sup>a</sup>	457,50 $\pm$ 6,01 <sup>a</sup>	3,29 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	13,88 $\pm$ 1,83
<b>4.6 Ekmek</b>	139,63 $\pm$ 1,94 <sup>a</sup>	450,00 $\pm$ 4,07 <sup>ab</sup>	3,22 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	13,81 $\pm$ 1,58
<b>4.3 Ekmek</b>	141,63 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>	442,50 $\pm$ 5,95 <sup>ab</sup>	3,12 $\pm$ 0,25 <sup>c</sup>	13,12 $\pm$ 0,76
<b>Kontrol Poğaç a</b>	142,00 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>	442,50 $\pm$ 8,89 <sup>a</sup>	3,12 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	13,42 $\pm$ 0,06
<b>4.6 Poğaç a</b>	145,25 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>	425,00 $\pm$ 14,14 <sup>b</sup>	2,93 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	12,37 $\pm$ 1,25
<b>4.3 Poğaç a</b>	146,88 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	352,50 $\pm$ 10,61 <sup>c</sup>	2,40 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	11,92 $\pm$ 0,13

\*Değerlendirilen her özellikte aynı sütundaki harfler örneklerin kendi arasında istatistiksel açıdan farklılığını ifade eder ( $p<0,05$ ).

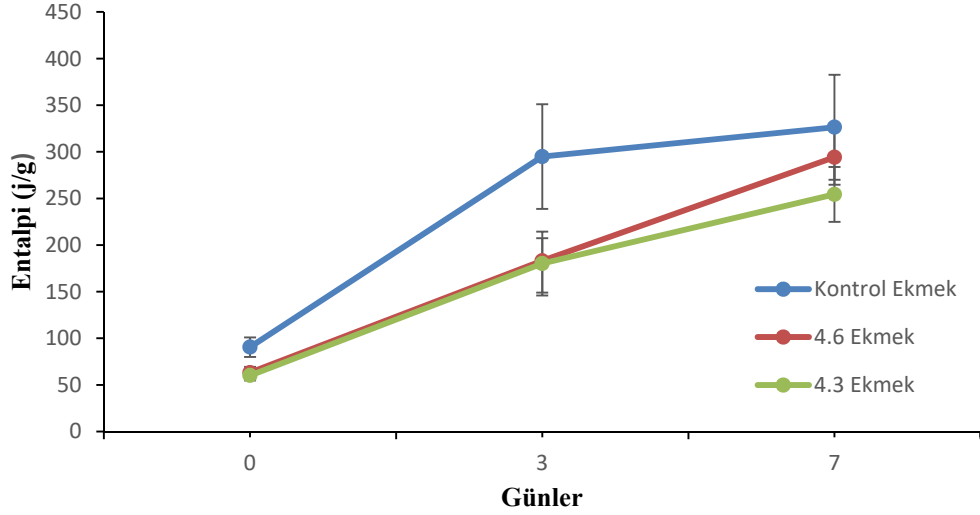
\*\*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

#### 4.4.2 Ekmek ve Poğaç a Örneklerinin Kalorimetrik Özellikleri

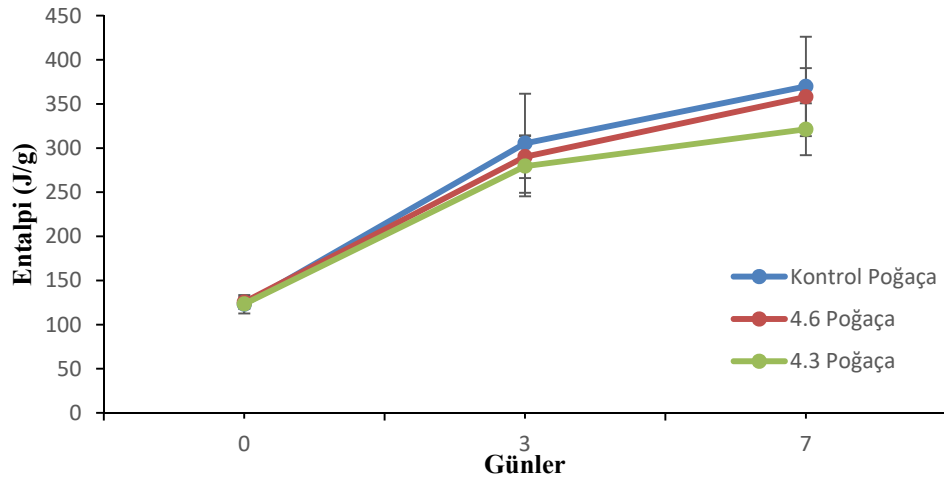
Deneme deseni gereğince üretilen enzimlerin bayatlama üzerine geciktirici özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik (DSC) analiz ile entalpi değerleri ölçülmüştür. 4 °C’de depolanan roll ekmek örnekleri 0, 3, ve 7. günlerde DSC analizi (Perkin Elmer Pyris 6 DSC) gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.23 ve 4.24). Bunun için cihaz, indiyum (156,6 °C, 28,591 J/g) ve tin (232,2 °C, 60,62 J/g) ile kalibrasyonu yapılmış, referans olarak ise distile su kullanılmıştır. Örnekler (10 mg)



alüminyum kaplarda hermetikli ve hassas olarak tartılmıştır. Kap sıcaklığı 20'den 130 °C'ye kadar 5 °C/dk artacak şekilde ısıya maruz bırakılmış 40 ve 80 °C arasındaki alanlar kıyaslanmıştır. Ekmek ve poğaçaya örneklerinin DSC analiz sonuçları Şekil 3.47'de gösterilmiştir.



Şekil 4.23: Ekmek örneklerinin depolama günlerindeki entalpi değişimleri



Şekil 4.24: Poğaçaya örneklerinin depolama günlerindeki entalpi değişimleri

Amiloz içeriğinin nişastaların termal özelliklerini etkileyebilecek ana faktör olduğunu bilinmektedir. Tüm örnek gruplarının entalpi değerleri depolama ile artış göstermiştir. Ancak 3. günde 4-6 ve 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimleri kullanılan ekmeklerin entalpi'lerinin düşük olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Aynı şekilde 7.

günün sonunda da enzim ilavesi yapılarak üretilen ekmeklerin entalpi değerleri düşük tespit edilmiştir. Ancak 4-3  $\alpha$ -glukanotransferazın kullanıldığı ekmeklerde kontrol ekmeğe kıyasla daha düşük entalpi ölçülmüştür ( $p<0,05$ ). Bu sonuçlar her iki enzimin (4-6 ve 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz) ekmekte bayatlamının geciktirilmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Özellikle 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz, 4-6  $\alpha$ -glukanotransferazdan daha fazla etkili bulunmuştur.

Poğaç örneklerinde ise entalpi değerleri birbirine yakın bulunmuştur. 3. günde tüm örneklerin entalpisi artmış lakin örnekler arasında fark tespit edilememiştir ( $p>0,05$ ). 7. günde ise 4-6  $\alpha$ -glukanotransferaz katkılı ekme ve kontrol ekme arasında fark bulunmazken, 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz katkılı ekmeğin diğerlerinden farklı olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Bu sonuçlar poğaç örneklerinde bayatlamının geciktirilmesinde kısmen etkili olduğunu göstermiştir.

#### 4.4.3 Ekmek ve Poğaç Örneklerinin Tekstür Özellikleri

Enzim katkılı ve kontrol ekme örneklerinin tekstür özellikleri Tablo 4.31’de verilmiştir. Tüm ekme örneklerinde depolama günlerine göre sertlik artmıştır ( $p<0,05$ ). Buna karşın enzim katkılı (4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz ve 4-6  $\alpha$ -glukanotransferaz) ekmeklerin 7. gündeki sertlikleri daha düşük ölçülmüştür. Tüm ekme örneklerinde yapışkanlık depolama günleriyle azalmıştır. 7. günde 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz ve 4-6  $\alpha$ -glukanotransferaz katkılı ekmeklerin kontrole göre daha yapışkan olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Enzim katkılı ekmeklerin elastikiyet özelliklerinin daha fazla olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). İlâveten aynı ekmeklerin çiğnenebilirlik özelliklerinin daha düşük olduğu ve yutmak için daha düşük çiğneme enerjisine ihtiyaç olduğu anlaşılmıştır ( $p<0,05$ ). Tüm bu sonuçlar enzimlerin nişasta yapısında etkili olduğundan ekmeğin yapısal özelliklerinde değişimlere neden olduğunu göstermektedir. Özellikle nişasta amiloz fraksiyonunda boyut küçülmesi; sertliğin azalmasına, yapışkanlığın artmasına ve çiğneme enerjisinde azalmaya neden olmuştur.

Tüm poğaç ürünlerinin tekstürel özellikleri Tablo 4.32’de verilmiştir. Poğaç ürünlerinin depolama günleri ile sertliğinin arttığı görülmüştür. 7. günde enzim katkılı

örneklerin sertliğinin daha düşük olduğu ölçülmüştür ( $p < 0,05$ ). Tüm poğaç ürünlerinde yapışkanlığın azaldığı izlenmiştir. Lakin 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz katkılı ekmeklerde yapışkanlığın daha fazla olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Elastikiyet bakımından yine 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz katkılı poğaçaların daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Çiğnenebilirlik açısından örnekler arasında anlamlı farklar görülememiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuçlar 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz ve 4-6  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimlerinin poğaçaya yapısı üzerine etkisinin sınırlı kaldığına işaret etmiştir. Zira ekmekte özellikle yapışkanlık ve çiğnenebilirlik karakteristiklerindeki farklanmanın poğaçada görülemediği dikkat çekmiştir. Bu durumun poğaçaya üretiminde formülasyon gereği kullanılan yumurta, şeker, katı yağ ilavesinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür.

**Tablo 4.31:** 4-6 ve 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz katkılı ve katkisız (kontrol) ekmek örneklerinin tekstürel özellikleri.

	SERTLİK		
	0.GÜN	3.GÜN	7.GÜN
<b>Kontrol Ekmek</b>	3,71 $\pm$ 0,30 <sup>Ac</sup>	8,44 $\pm$ 0,22 <sup>Ab</sup>	20,24 $\pm$ 5,39 <sup>Aa</sup>
<b>4,6 Ekmek</b>	3,66 $\pm$ 0,38 <sup>Ac</sup>	6,70 $\pm$ 0,70 <sup>Bb</sup>	14,09 $\pm$ 1,98 <sup>Ba</sup>
<b>4,3 Ekmek</b>	3,36 $\pm$ 0,32 <sup>Ac</sup>	7,18 $\pm$ 0,58 <sup>Ab</sup>	12,02 $\pm$ 1,75 <sup>Ba</sup>
	ÇİĞNEBİLİRLİK		
	0.GÜN	3.GÜN	7.GÜN
<b>Kontrol Ekmek</b>	22,58 $\pm$ 1,41 <sup>Ac</sup>	36,64 $\pm$ 2,57 <sup>Ab</sup>	55,07 $\pm$ 9,35 <sup>Aa</sup>
<b>4,6 Ekmek</b>	22,08 $\pm$ 1,33 <sup>Ac</sup>	30,73 $\pm$ 2,30 <sup>Bb</sup>	51,45 $\pm$ 5,77 <sup>Aa</sup>
<b>4,3 Ekmek</b>	15,59 $\pm$ 2,25 <sup>Bc</sup>	34,20 $\pm$ 3,20 <sup>Ab</sup>	40,80 $\pm$ 8,01 <sup>Ba</sup>
	İÇ YAPIŞKANLIK		
	0.GÜN	3.GÜN	7.GÜN
<b>Kontrol Ekmek</b>	0,74 $\pm$ 0,04 <sup>Aa</sup>	0,48 $\pm$ 0,03 <sup>Ab</sup>	0,39 $\pm$ 0,04 <sup>Bc</sup>
<b>4.6 Ekmek</b>	0,78 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,48 $\pm$ 0,02 <sup>Ab</sup>	0,47 $\pm$ 0,04 <sup>Ab</sup>
<b>4.3 Ekmek</b>	0,81 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,50 $\pm$ 0,06 <sup>Ab</sup>	0,44 $\pm$ 0,03 <sup>Ab</sup>
	ELASTİKİYET		
	0.GÜN	3.GÜN	7.GÜN
<b>Kontrol Ekmek</b>	8,22 $\pm$ 0,18 <sup>Aa</sup>	7,63 $\pm$ 0,30 <sup>Bb</sup>	7,25 $\pm$ 0,45 <sup>Bb</sup>
<b>4.6 Ekmek</b>	7,92 $\pm$ 0,19 <sup>Ba</sup>	7,88 $\pm$ 0,20 <sup>Ba</sup>	7,80 $\pm$ 0,29 <sup>Aa</sup>
<b>4.3 Ekmek</b>	8,16 $\pm$ 0,21 <sup>Aa</sup>	8,23 $\pm$ 0,11 <sup>Aa</sup>	8,06 $\pm$ 0,17 <sup>Aa</sup>

\* Farklı büyük harfler örnekler arasında, küçük harfler depolama günleri arasında istatistiksel açıdan farklılığı ifade etmektedir.

**Tablo 4.32:** 4-6 ve 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz katkılı ve katkısız (kontrol) poğaçı örneklerinin tekstürel özellikleri.

	SERTLİK		
	0.GÜN	3.GÜN	7.GÜN
<b>Kontrol Poğaçı</b>	3,71 ± 0,30 <sup>Ac</sup>	8,44 ± 0,22 <sup>Ab</sup>	20,24 ± 5,39 <sup>Aa</sup>
<b>4.6 Poğaçı</b>	2,45 ± 0,62 <sup>Bc</sup>	7,45 ± 0,75 <sup>Ab</sup>	16,19 ± 5,11 <sup>Ba</sup>
<b>4.3 Poğaçı</b>	1,91 ± 0,48 <sup>Bc</sup>	6,55 ± 1,84 <sup>Bb</sup>	11,53 ± 2,84 <sup>Ba</sup>
	ÇİĞNENE BİLİRLİK		
	0.GÜN	3.GÜN	7.GÜN
<b>Kontrol Poğaçı</b>	22,58 ± 1,40 <sup>Ac</sup>	36,64 ± 2,57 <sup>Ab</sup>	55,07 ± 9,34 <sup>Aa</sup>
<b>4.6 Poğaçı</b>	14,59 ± 2,28 <sup>Bb</sup>	33,58 ± 1,66 <sup>Aa</sup>	36,44 ± 10,93 <sup>Ba</sup>
<b>4.3 Poğaçı</b>	13,14 ± 3,79 <sup>Bc</sup>	31,49 ± 6,57 <sup>Ab</sup>	55,95 ± 19,97 <sup>Aa</sup>
	İÇ YAPIŞKANLIK		
	0.GÜN	3.GÜN	7.GÜN
<b>Kontrol Poğaçı</b>	0,74 ± 0,03 <sup>Ba</sup>	0,57 ± 0,04 <sup>Bb</sup>	0,39 ± 0,05 <sup>Bc</sup>
<b>4.6 Poğaçı</b>	0,82 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,55 ± 0,02 <sup>Bb</sup>	0,41 ± 0,04 <sup>Ac</sup>
<b>4.3 Poğaçı</b>	0,82 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,61 ± 0,06 <sup>Ab</sup>	0,43 ± 0,06 <sup>Ac</sup>
	ELASTİKİYET		
	0.GÜN	3.GÜN	7.GÜN
<b>Kontrol Poğaçı</b>	8,22 ± 0,18 <sup>Aa</sup>	7,63 ± 0,30 <sup>Bb</sup>	7,24 ± 0,45 <sup>Bb</sup>
<b>4.6 Poğaçı</b>	8,30 ± 0,12 <sup>Aa</sup>	8,17 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	7,65 ± 0,19 <sup>Bb</sup>
<b>4.3 Poğaçı</b>	8,32 ± 0,15 <sup>Aa</sup>	8,04 ± 0,18 <sup>Aa</sup>	8,01 ± 0,15 <sup>Aa</sup>

\* Farklı büyük harfler örnekler arasında, küçük harfler depolama günleri arasında istatistiksel açıdan farklılığı ifade etmektedir.

#### 4.4.4 Ekmek ve Poğaçı Örneklerinin GI Özellikleri

Enzim katkısının (4-6 ve 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz) ekmeğın glisemik indeksini anlamlı düşürdüğü tespit edilmiştir (Tablo 4.33). Buna göre ekmeğın en az %15 oranında glisemik indeksinin azaltıldığı görülmüştür. Benzer sonuçlar poğaçı örnekleri için de kaydedilmiştir (Tablo 4.34). Ayrıca enzim uygulamaları ile glisemik indeksin azalma oranı poğaçı örneklerinde ekmekteki benzer seviyelerde gerçekleşmiştir. Enzim farklılığı bakımından karşılaştırma yapıldığında ise önemli farklanmalar tespit edilmemiştir. Söz konusu enzimlerin nişasta amiloz fraksiyonunda glikozidik bağ dallanmasını meydana getirmesi ile glisemik indeksin azaltılabildiği anlaşılmıştır. Bu sonuç glukanotransferazların özellikle fırın ürünlerinin insan sağlığı açısından fayda sağlayabildiğinin de ispatı olmuştur.

Poğaçta ürünlerinde ekmeğe göre daha yüksek HI değerleri tespit edilmiştir. Muhtemelen poğaçta üretimindeki diğer katkıların da bunun üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Özellikle şeker ilavesi bu artışa neden olmuş olabilir. Ekmek ve poğaçta gibi fırın ürünleri yüksek glisemik indeksli (>70) ürünler olarak kabul edilmektedir. Buna göre enzim katkısı ile üretilen ekmeğin ve poğaçta ürünlerinde söz konusu sınır değer üzerinde kalınmıştır. 4-6 ve 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimlerinin hem ekmekte hem de poğaçta glisemik indeksin anlamlı azalmasına neden olsa da sınır değer aşılabilmesi için daha yüksek konsantrasyonda enzim kullanılması gerekliliği anlaşılmaktadır.

**Tablo 4.33:** Kontrol ekmeği, 4.6 ve 4.3 enzim katkılı ekmeklerin GI değerleri

Örnekler	HI	GI
<b>Kontrol Ekmek</b>	93,08 $\pm$ 5,50 <sup>a</sup>	90,81 $\pm$ 7,99 <sup>a</sup>
<b>4.6 Ekmek</b>	63,27 $\pm$ 7,48 <sup>b</sup>	74,45 $\pm$ 4,18 <sup>b</sup>
<b>4.3 Ekmek</b>	70,08 $\pm$ 6,84 <sup>b</sup>	78,18 $\pm$ 5,09 <sup>b</sup>

\*Aynı sütundaki farklı harfler, 4.6 ve 4.3 glukanotransferaz enzimlerinin etkisi arasındaki farklılığı gösterir (p < 0,05).

\*\*Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verilmiştir.

**Tablo 4.34:** Poğaçta, 4.6 ve 4.3 enzim katkılı poğaçaların GI değerleri

Örnekler	HI	GI
<b>Kontrol Poğaçta</b>	127,85 $\pm$ 10,64 <sup>a</sup>	109,89 $\pm$ 12,25 <sup>a</sup>
<b>4.6 Poğaçta</b>	91,45 $\pm$ 11,99 <sup>b</sup>	89,67 $\pm$ 2,76 <sup>b</sup>
<b>4.3 Poğaçta</b>	87,49 $\pm$ 12,06 <sup>b</sup>	87,74 $\pm$ 3,79 <sup>b</sup>

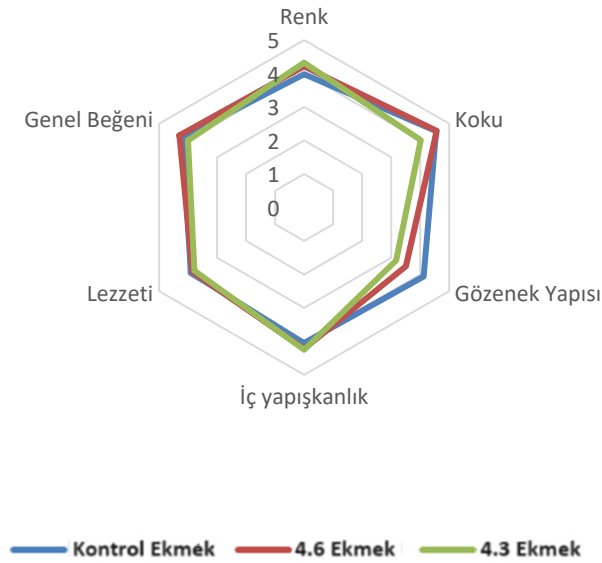
\*Aynı sütundaki farklı harfler, 4.6 ve 4.3 glukanotransferaz enzimlerinin etkisi arasındaki farklılığı gösterir (p < 0,05).

\*\*Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verilmiştir.

*S. thermophilus* GtfB'nin ekmeğin hamuruna direkt kullanıldığı çalışmada enzim miktarı 0,04'ten 0,16 U/g un'a yükseldikçe ekmeklerdeki toplam nişastanın hızlı sindirilen nişasta (RDS) ve dirençli nişasta (RS) içeriklerinin sırasıyla %70,9'dan %64,2'ye ve %9,4'ten %0,8'e önemli ölçüde azalırken, yavaş sindirilen nişasta (SDS) içeriğinin 19,7'den %35,0'a önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Li ve diğ. 2019).

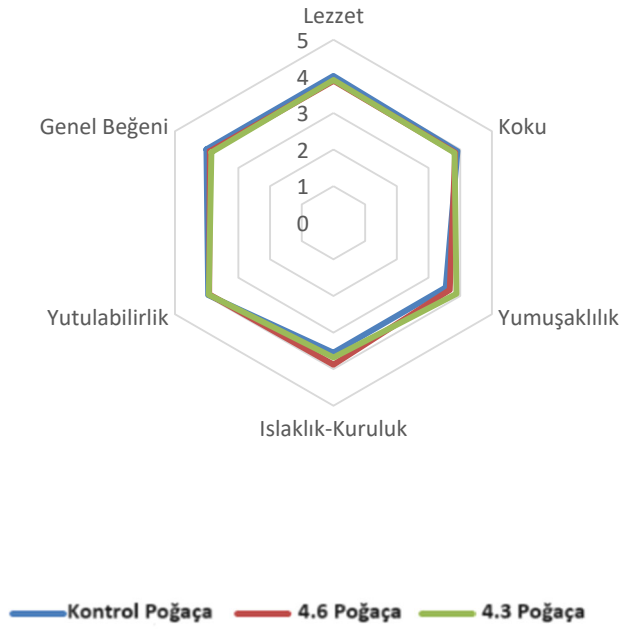
#### 4.4.5 Ekmek ve Poğaçanın Duyusal Özellikleri

Ekmek ve poğaçanın örneklerinin duysal özellikleri Şekil 4.25 ve 4.26'da gösterilmiştir. Duysal değerlendirilmede örnekler arasında çok küçük farklılıklar izlenmekle birlikte bunlar istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Buna rağmen enzim katkı ekmeğin (4.6 Ekmek ve 4.3 Ekmek) rengi daha fazla beğenilmiştir. Fakat gözenek yapısı bakımından beğenisi daha düşük bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Ekmeklerin iç yapısının daha yapışkan olduğu değerlendirilmiştir. Lezzet ve genel beğeni açısından benzer puanlar almıştır (Şekil 4.25). Poğaçanın örneklerinde duysal karakteristikler bakımından farklılıklar önemsizdir ( $p>0,05$ ). Enzim ilave edilerek üretilen poğaçaların (4.6 Poğaçanın ve 4.3 Poğaçanın) ıslaklık-kuruluk ve yumuşaklık bakımından daha fazla beğeni almıştır ( $p>0,05$ ). Diğer özellikler (lezzet, koku, yutulabilirlik ve genel beğeni) açısından herhangi farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.25: Kontrol ekmeği, 4.6 ve 4.3 enzim katkı ekmeğin duysal özellikleri

Bu sonuçlar 4-6 ve 4-3  $\alpha$ -glukanotransferaz kullanılmasının ekmeğin ve poğaçanın gibi fırın ürünlerinin duysal özelliklerini etkilemediğini göstermiştir. Nişastayı



**Şekil 4.26:** Poğaç, 4.6 ve 4.3 enzim katkılı poğaç örneklerin duyu özellikleri

modifiye etme özellikleri bulunan bu enzimler ekmeğin yapısal ve lezzet özelliklerini etkilememiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda nişasta ve maltooligosakkaritlere özgül spesifik etkisi bulunan ve özellikle laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen GH70 enzim ailesine mensup glukanoferazların (GTaz) moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıyla beraber bu enzimler önem kazanmıştır. Bu kapsamda glukanoferazların karakterizasyonlarına yönelik çalışmalar artmıştır; ancak bu enzimlerin gıda sistemlerinde kullanımı henüz gerçekleştirilmemiştir. Yapılan bu çalışmada ekşi hamur ortamında 4,3 ve 4,6 AGT enzim üreticisi olan ve olmayan suşların starter kültür olarak kullanımı gerçekleştirilerek gerek hamur ortamına gerekse ekşi hamur ekmeğine katkısı ilk defa gösterilmiştir.

4,6 ve 4,3 AGT enzim üreticisi laktobasillerin hamur mikrobiotasını kısmen modifiye edebildiği anlaşılmıştır. Bu sonuç suşlara ait enzimlerin ekosisteme adaptasyon doğrultusunda rol aldığına ilişkin işaretler sunmaktadır. Enzimlerin suşlarda üretimi ile mikrobiotada farklı türlerin kaybolması veya görülmesine neden olmuştur. Bu sonuçlar; enzimlerin bazı laktobasiller tarafından adaptasyon ve mikrobiotada stabilitenin sağlanması için evrimsel süreçte kazanıldığına işaret etmektedir.

4,6 ve 4,3 AGT enzim üreticisi laktobasillerin kullanılmasıyla üretilen ekşi hamurların kullanıldığı ekmeklerin kalite özelliklerine etkisi de izlenmiştir. Bunlar arasında ekmeklerde bayatlamamanın kısmen geciktirilmesi, ekmek israfının engellenmesine katkı sağlayabilecek bir özelliktir. Bu nedenle tez çalışmasında kullanılan 4,6 ve 4,3 AGT enzim üreticisi laktobasil suşlarının ekşi hamur teknolojisi için starter kültür özellikleri taşıdıkları ifade edilebilir. Ayrıca ekşi hamur ekmeğinde 4,6 AGT enzim üreticisi suşun nişasta modifikasyonu ile daha düşük GI'li ekmek üretimi bu yönde beslenme için yeni bir alternatif olabilmeyi vaad etmektedir.

Bu tez çalışmasının ikinci kısmında ise rekombinant *Lc. lactis*'te üretilmiş olan 4,3 ve 4,6  $\alpha$ -glukanoferaz enzimlerinin ekmek ve poğaçaya üretiminde katkı olarak kullanımı gerçekleştirilmiştir. *Lc. lactis* tarafından hücre dışına salgılanarak üretilen 4,3 ve 4,6  $\alpha$ -glukanoferaz enzimlerinin ekmek ve poğaçaya gibi fırın ürünlerinde teknolojik ve sağlık açısından fonksiyonel etkilerde bulunduğu ortaya konmuştur. Çalışmanın da hedefleri olan glisemik indeksin düşürülmesi ve bayatlamamanın



geciktirilmesinde bu enzimlerle başarılı sonuçlar alınmıştır. Böylece gıda teknolojisi için yenilikçi bir enzim kullanım alanı ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca ülkemiz enzim geliştirme ve teknolojisi bakımından da bilgi ve tecrübenin edinilmesi mümkün olmuştur. Mevcut durumda 4,3 ve 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimlerinin üretilmesi için teknoloji altyapısı oluşturulmuştur.

Sonuç olarak, fırın ürünleri günlük beslenmemizin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Beslenirken sağlığımızın korunması ve aynı zamanda gıda israfının önlenmesinin sağlanması hem kaynakların sürdürülebilir kullanılması hem de yaşam kalitesinin artırılması bakımından kritiktir. Bu çalışmada doğrudan *Liml. reuteri* ve *Liml. fermentum* 4,3 ve 4,6 AGT (+) suşlarının starter kültür olarak ekşi hamur üretiminde kullanılabileceği gösterilmiştir. Ek olarak rekombinant enzimlerin de fırın ürünlerinde başarıyla kullanılabileceği anlaşılmıştır. Böylece biyoteknolojik fırsatlar ekseninde yenilikçi bir enzim grubunun endüstriyel üretimi doğrultusunda alt yapısı kurulmuştur. Bu enzimlerin gıda teknolojisinde sağlıklı ve kaliteli fırın ürünlerinin üretilmesine imkan sağladığı ve raf ömrünü uzatarak kaynakların verimli kullanılmasında önem taşıdığı ortaya konulmuştur.

## 6. KAYNAKLAR

AACC, *International Approved Methods of the American Association of Cereal chemists*, 11th Edition, Method 46-10.01, The Association, St. Paul, (2000).

Abedi, E., and Hashemi, S. M. B., 'Lactic acid production–producing microorganisms and substrates sources-state of art', *Heliyon*, 6(10), (2020).

Abedin, M. M., Chourasia, R., Phukon, L. C., Sarkar, P., Ray, R. C., Singh, S. P., and Rai, A. K., 'Lactic acid bacteria in the functional food industry: Biotechnological properties and potential applications', *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1-19, (2023).

Abuqwider, J., Altamimi, M., & Mauriello, G., 'Limosilactobacillus reuteri in health and disease', *Microorganisms*, 10(3), 522, (2022).

Adewale, P., Yancheshmeh, M. S., and Lam, E., 'Starch modification for non-food, industrial applications: Market intelligence and critical review', *Carbohydr. Polym.*, 291, 119590, (2022).

Akamine, I. T., Mansoldo, F. R., and Vermelho, A. B., 'Probiotics in the sourdough bread fermentation: current status', *Fermentation*, 9(2), 90, (2023).

Alam, M. D., Islam, M., Ziaul, M. D., Tayab, M. D., Alam, K., Sahid, H., ... and Haque, A. T. M., 'Role of probiotic *Lactobacillus reuteri* in improving gut health and immunity in infants and toddlers: A review', *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 7(2), 75-80, (2022).

Aljada, B., Zohni, A., and El-Matary, W., 'The gluten-free diet for celiac disease and beyond', *Nutrients*, 13(11), 3993, (2021).

Alkay, Z., Falah, F., Cankurt, H., and Dertli, E., 'Exploring the nutritional impact of sourdough fermentation: Its mechanisms and functional potential', *Foods*, 13(11), 1732, (2024).

Altuğ Onoğur, T., ve Elmacı, Y., *Gıdalarda Duyusal Değerlendirme*, İzmir: Sıdaş Medya., 134s, (2011).

Ameen, S.M., Caruso, G., ‘Lactic Acid and Lactic Acid Bacteria: Current Use and Perspectives in the Food and Beverage Industry’, *In: Lactic Acid in the Food Industry*, SpringerBriefs in Molecular Science, Springer, Cham., (2017).

Anastasio, M., Pepe, O., Cirillo, T., Palomba, S., Blaiotta, G., and Villani, F., ‘Selection and use of phytate-degrading LAB to improve cereal-based products by mineral solubilization during dough fermentation’, *J. Food Sci.*, 75(1), M28-M35, (2010).

Anbukkarasi, K., Nanda, D. K., UmaMaheswari, T., Hemalatha, T., Singh, P., and Singh, R., ‘Assessment of expression of Leloir pathway genes in wild-type galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* by real-time PCR’, *Eur. Food Res. Technol.*, 239, 895-903, (2014).

André, I., Potocki-Véronese, G., Morel, S., Monsan, P., and Remaud-Siméon, M., ‘Sucrose-utilizing transglucosidases for biocatalysis’, *Carbohydrates in Sustainable Development I*, (eds: Rauter, A., Vogel, P., Queneau, Y.) vol 294. Springer, Berlin, (2010).

APHA, American Public Health Association, ‘Plate count method APHA 2001 for aerobic mesophilic bacteria in foods and water’, (2001).

Arendt, E. K., Ryan, L. A., and Dal Bello, F., ‘Impact of sourdough on the texture of bread’, *Food Microbiol* 24(2), 165-174, (2007).

Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., and Gobbetti, M., ‘Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review’, *Trends Food Sci. Technol.*, 108, 71-83, (2021).

Arora, R., and Chandel, A. K., ‘Unlocking the potential of low FODMAPs sourdough technology for management of irritable bowel syndrome’, *Food Res. Int.*, 113425, (2023).

Arranz-Otaegui, A., Carretero, L.G., Ramsey, M.N., Fuller, D.Q., Richter, T., ‘Archaeobotanical evidence reveals the origins of bread 14,400 years ago in northeastern Jordan’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 115, 7925–7930, (2018).

Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., ... and Ibrahim, S., A., 'Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications', *Dairy*, 1(3), 202-232., (2020).

Bai, Y., Boger, M., van der Kaaij, R. M., Woortman, A. J. J., Pijning, T., van Leeuwen, S. S., ... and Dijkhuizen, L., '*Lactobacillus reuteri* strains convert starch and maltodextrins into homoexopolysaccharides using an extracellular and cell-associated 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase', *J. Agric. Food Chem.*, 64(14), 2941-2952, (2016).

Bai, Y., Gangoiti, J., Dijkstra, B. W., Dijkhuizen, L., and Pijning, T., 'Crystal structure of 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase supports diet-driven evolution of GH70 enzymes from  $\alpha$ -amylases in oral bacteria', *Structure*, 25(2), 231-242, (2017).

Bai, Y., van der Kaaij, R. M., Leemhuis, H., Pijning, T., van Leeuwen, S. S., Jin, Z., and Dijkhuizen, L., 'Biochemical characterization of the *Lactobacillus reuteri* glycoside hydrolase family 70 GTFB type of 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase enzymes that synthesize soluble dietary starch fibers', *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(20), 7223-7232, (2015).

Bangar, S. P., Ashogbon, A. O., Singh, A., Chaudhary, V., and Whiteside, W. S., 'Enzymatic modification of starch: A green approach for starch applications', *Carbohydr. Polym.*, 287, 119265, (2022).

Bangar, S. P., Suri, S., Trif, M., and Ozogul, F., 'Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach', *Food Biosci.*, 46, 101615, (2022).

Barros, J. H., Telis, V. R., Taboga, S., and Franco, C. M., 'Resistant starch: effect on rheology, quality, and staling rate of white wheat bread', *J. Food Sci. Technol.*, 55, 4578-4588, (2018).

Belz, M. C. E., 'Reduction of salt in yeasted wheat bread: impact on bread quality and solutions using sourdough fermented by functional lactic acid bacteria strains', PhD Thesis, *University College Cork*, (2016).

Belz, M. C., Axel, C., Arendt, E. K., Lynch, K. M., Brosnan, B., Sheehan, E. M., ... and Zannini, E., 'Improvement of taste and shelf life of yeasted low-salt bread

containing functional sourdoughs using *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 and *Weissella cibaria* MG1', *Int. J. Food Microbiol.*, 302, 69-79, (2019).

Bi, Q., Hong, T., Mei, X., Xu, X., and Xu, D., 'Effect of high-molecular weight dextran-enriched sourdough fermented using *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 on bread quality and gluten', *Food Biosci.*, 102777, (2023).

Boakye, P. G., Koungblenou, I., Murai, T., Okyere, A. Y., Anderson, J., Bajgain, P., ... and Annor, G. A., 'Impact of sourdough fermentation on FODMAPs and amylase-trypsin inhibitor levels in wheat dough', *J. Cereal Sci.*, 108, 103574, (2022).

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G. A., ... and Caporaso, J. G., 'QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science', (No. e27295v1), *PeerJ Preprints*, (2018).

Caggianiello, G., Kleerebezem, M., and Spano, G., 'Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 3877-3886, (2016).

Calasso, M., and Gobbetti, M., 'Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other species', *In Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second Edition (Vol. 3, pp. 125-131), (2011).

Calvert, M. D., Madden, A. A., Nichols, L. M., Haddad, N. M., Lahne, J., Dunn, R. R., and McKenney, E. A., 'A review of sourdough starters: Ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research', *PeerJ*, 9, e11389, (2021).

Carbonetto, B., Nidelet, T., Guezenec, S., Perez, M., Segond, D., and Sicard, D., 'Interactions between *Kazachstania humilis* yeast species and lactic acid bacteria in sourdough', *Microorganisms*, 8(2), 240, (2020).

Cardinali, F., Garofalo, C., Reale, A., Boscaino, F., Osimani, A., Milanović, V., ...and Aquilanti, L., 'Liquid sourdough from stone-ground soft wheat (*Triticum aestivum*) flour: Development and exploitation in the breadmaking process', *Food Res. Int.*, 161, 111796, (2022).

Catzeddu, P., ‘Sourdough breads’, *In Flour and breads and their fortification in health and disease prevention*, (pp. 177-188), Academic press, (2019).

Certel, M., Erem, F., Erem, F., Konak, Ü. İ., ve Karakaş, B., ‘Dondurulmuş hamur ile kısmi olarak pişirilip dondurulmuş hamurlardan üretilen beyaz ekmeklerin fiziksel tekstürel ve duyuşal özellikleri’ *Akdeniz Univ. Ziraat Fak. Derg.*, 22(1), 91-102, (2009).

Chavan, R. S., and Chavan, S. R., ‘Sourdough technology—a traditional way for wholesome foods: a review’, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 10(3), 169-182, (2011).

Chawla, S., and Nagal, S., ‘Sourdough in bread-making: An ancient technology to solve modern issues’, *International Journal of Industrial Biotechnology and Biomaterials*, 1(1), 1-10, (2015).

Chen, X. Y., Levy, C., and Gänzle, M. G., ‘Structure-function relationships of bacterial and enzymatically produced reuterans and dextran in sourdough bread baking application’, *Int. J. Food Microbiol.*, 239, 95-102, (2016).

Chen, Y., McClements, D. J., Peng, X., Chen, L., Xu, Z., Meng, M., ...and Jin, Z., ‘Research progresses on enzymatic modification of starch with 4- $\alpha$ -glucanotransferase’, *Trends Food Sci. Technol.*, 131, 164-174, (2023).

Chen, Z., Ni, D., Mu, W., ‘Glucansucrases derived from lactic acid bacteria to synthesize multitudinous  $\alpha$ -glucans’, (eds: Mu, W., Zhang, W., Chen, Q), *Novel enzymes for functional carbohydrates production*, Singapore: Springer, (2021).

Coda, R., Xu, Y., Moreno, D. S., Mojzita, D., Nionelli, L., Rizzello, C. G., and Katina, K., ‘Performance of *Leuconostoc citreum* FDR241 during wheat flour sourdough type I propagation and transcriptional analysis of exopolysaccharides biosynthesis genes’ *Food Microbiol.*, 76, 164-172, (2018).

Coelho, M. C., Malcata, F. X., and Silva, C. C., ‘Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: From starter cultures to probiotic functions’, *Foods*, 11(15), 2276, (2022).

Comasio, A., Van Kerrebroeck, S., and De Vuyst, L., ‘Lemon juice and apple juice used as source of citrate and malate, respectively, enhance the formation of buttery

aroma compounds and/or organic acids during Type 2 and Type 3 sourdough productions performed with *Companilactobacillus crustorum* LMG 23699' *Int. J. Food Microbiol.*, 339, 109020, (2021).

Corsetti, A., and Settanni, L., 'Lactobacilli in sourdough fermentation', *Food Res. Int.*, 40(5), 539-558, (2007).

D'Amico, V., Gänzle, M., Call, L., Zwirzitz, B., Grausgruber, H., D'Amico, S., and Brouns, F., 'Does sourdough bread provide clinically relevant health benefits?' *Front. Nutr.*, 10, (2023).

Dan, H., Gu, Z., Li, C., Fang, Z., Hu, B., Wang, C., ... and Liu, Y., 'Effect of fermentation time and addition amount of rice sourdoughs with different microbial compositions on the physicochemical properties of three gluten-free rice breads', *Food Res Int*, 161, 111889, (2022).

De Angelis, M., Minervini, F., Siragusa, S., Rizzello, C. G., and Gobbetti, M., 'Wholemeal wheat flours drive the microbiome and functional features of wheat sourdoughs', *Int. J. Food Microbiol.*, 302, 35-46, (2019).

De Marco, I., da Silva, C. M., de Moraes, J. O., Menezes, L. A. A., Miotto, M., Laurindo, J. B., and Lindner, J. D. D., 'A systematic review of drying methods and their impact on technological characteristics of sourdough type III', *Biotechnology Research and Innovation Journal*, 6(1), 0-0, (2022).

De Vuyst, L., and F. de Vin., 'Exopolysaccharides from lactic acid bacteria', Pages 477–519 in *Comprehensive Glycosciences*, (ed H. Kamerling), Elsevier Ltd., Oxford, UK, (2007).

De Vuyst, L., Comasio, A., and Kerrebroeck, S. V., 'Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients', *Critical Reviews in Food Sci. Nutr.*, 63(15), 2447-2479, (2023).

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., and Leroy, F., 'Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation', *Adv. Appl. Microbiol.*, 100, 49-160, (2017).

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

Demirkesen-Bicak, H., Arici, M., Yaman, M., Karasu, S., and Sagdic, O., 'Effect of different fermentation condition on estimated glycemic index, in vitro starch digestibility, and textural and sensory properties of sourdough bread', *Foods*, 10(3), 514, (2021).

Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T., and Sağdıç, O., 'Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics', *LWT- Food Sci. Technol.*, 71, 116-124, (2016).

Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., and Whelan, K., 'Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease', *Nutrients*, 11(8), 1806, (2019).

Doğan, M., 'The effect of different compositions of starter cultures developed from phytic acid-degrading lactic acid bacteria on the sensory quality of bread', *Int. Food Res. J.*, 28(5), 926-935, (2021).

Doğan, M., and Tekiner, İ. H., 'Assessment of probiotic properties of lactic acid bacteria from traditional sourdoughs for bread-making in Turkey against some gut conditions', *Journal of Applied Food Technology*, (2019).

Doi, Y., 'Glycerol metabolism and its regulation in lactic acid bacteria', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103(13), 5079-5093, (2019).

Dong, J., Bai, Y., Chen, Y., Li, X., Wang, Y., Fan, R., ... and Jin, Z., 'Identification of a novel starch-converting GtfB enzyme from the *Fructilactobacillus sanfranciscensis* TMW11304 to reduce the viscoelasticity and retrogradation of tapioca starch', *Int. J. Biol. Macromol.*, 130308, (2024<sup>b</sup>).

Dong, J., Bai, Y., Fan, R., Li, X., Wang, Y., Chen, Y., ... and Jin, Z., 'Exploring a GtfB-Type 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase to synthesize the ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$  6) linkages in linear



chain and branching points from amylose and enhance the functional property of granular corn starches', *J. Agric. Food Chem.*, 72(4), 2287-2299, (2024<sup>c</sup>).

Dong, J., Wang, Y., Li, X., Chen, Y., Fan, R., Wang, N., ... and Bai, Y., 'Comparison of a novel GtfB-type 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase from *Fructilactobacillus sanfranciscensis* Gs2 for converting starch in the gelatinized and granular systems', *Food Biosci.*, 59, 104118, (2024<sup>a</sup>).

Eiteman, M. A., and Ramalingam, S., 'Microbial production of lactic acid', *Biotechnol. Lett.*, 37, 955-972, (2024<sup>a</sup>).

Ekinci, R., Şimşek, Ö., Küçükçuban, A., and Nas, S., 'Evaluation of mono or mixed cultures of lactic acid bacteria in type II sourdough system', *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 46(3), 247-253, (2016).

El Fechtali, T., and Reffai, Y. M., 'The leavening ability of many lactic acid bacteria isolated from spontaneous sourdough', *Emir. J. Food Agric.*, 35, 23-31, (2023).

Elgün, A. ve Ertugay, Z., '*Tahıl İşleme Teknolojisi*', Erzurum: Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 297, (2002).

Elgün, A., Certel, M., Ertugay, Z. ve Kotancılar, H. G., '*Tahıl ve Ürünlerinde Analitik Kalite Kontrolü ve Laboratuvar Uygulama Kılavuzu*', Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 335, (2012).

Englyst, H. N., Kingman, S. M., and Cummings, J. H., 'Classification and measurement of nutritionally important starch fractions', *Eur. J. Clin. Nutr.*, 46, S33-50, (1992).

Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Storia, A., Gobbetti, M., and Di Cagno, R., 'Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation', *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(24), 7827-7836, (2013).

European Food Safety Authority (EFSA), 'The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed-scientific opinion of the panel on biological hazards', *EFSA Journal*, 6(12), 923, (2008).

- Fadda, C., Sanguinetti, A. M., Del Caro, A., Collar, C., and Piga, A., 'Bread staling: Updating the view', *Compr. Rev. Food Sci. Food. Saf.*, 13(4), 473-492, (2014).
- Fang, L., Wang, W., Dou, Z., Chen, J., Meng, Y., Cai, L., and Li, Y., 'Effects of mixed fermentation of different lactic acid bacteria and yeast on phytic acid degradation and flavor compounds in sourdough', *LWT*, 174, 114438, (2023).
- Feizollahi, E., Mirmahdi, R. S., Zoghi, A., Zijlstra, R. T., Roopesh, M. S., and Vasanthan, T., 'Review of the beneficial and anti-nutritional qualities of phytic acid, and procedures for removing it from food products', *Food Res. Int.*, 143, 110284, (2021).
- Fekri, A., Abedinzadeh, S., Torbati, M., Azadmard-Damirchi, S., and Savage, G. P., 'Considering sourdough from a biochemical, organoleptic, and nutritional perspective', *J. Food Compos. Anal.*, 105853, (2023).
- Feng, S., Wang, H., Lin, X., Liang, H., Zhang, S., Chen, Y., and Ji, C., 'Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* and application in prebiotic gummies', *LWT*, 174, 114357, (2023).
- Fernández-Peláez, J., Paesani, C., and Gómez, M., 'Sourdough technology as a tool for the development of healthier grain-based products: An update.', *Agronomy*, 10(12), 1962, (2020).
- Fischer, S. G., and Lerman, L. S., 'DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80(6), 1579-1583, (1983).
- Fortina, M. G., Ricci, G., and Borgo, F., 'A study of lactose metabolism in *Lactococcus garvieae* reveals a genetic marker for distinguishing between dairy and fish biotypes', *J. Food Prot.*, 72(6), 1248-1254, (2009).
- Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D., Guglielmetti, S., and Manachini, P. L., 'Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in *Lactobacillus helveticus*', *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(6), 3238-3243, (2003).

Foschia, M., Horstmann, S., Arendt, E. K., and Zannini, E., 'Nutritional therapy—Facing the gap between coeliac disease and gluten-free food', *Int. J. Food Microbiol.*, 239, 113-124, (2016).

Fu, W., Wang, S., and Xue, W., 'Mechanism of carbohydrate and protein conversion during sourdough fermentation: An analysis based on representative Chinese sourdough microbiota', *Int. J. Food Microbiol.*, 410, 110487, (2024).

Galoburda, R., Straumite, E., Sabovics, M., and Kruma, Z., 'Dynamics of volatile compounds in triticale bread with sourdough: From flour to bread', *Foods*, 9(12), 1837, (2020).

Gangoiti, J., Lamothe, L., van Leeuwen, S. S., Vafiadi, C., and Dijkhuizen, L., 'Characterization of the *Paenibacillus beijingensis* DSM 24997 GtfD and its glucan polymer products representing a new glycoside hydrolase 70 subfamily of 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase enzymes', *PLoS One*, 12(4), e0172622, (2017<sup>b</sup>).

Gangoiti, J., Pijning, T., & Dijkhuizen, L., 'The *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 GtfC enzyme represents a novel glycoside hydrolase 70 subfamily of 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase enzymes', *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(2), 756-766, (2016<sup>a</sup>).

Gangoiti, J., Pijning, T., and Dijkhuizen, L., 'Biotechnological potential of novel glycoside hydrolase family 70 enzymes synthesizing  $\alpha$ -glucans from starch and sucrose', *Biotechnol. Adv.*, 36(1), 196-207, (2018).

Gangoiti, J., van Leeuwen, S. S., Gerwig, G. J., Duboux, S., Vafiadi, C., Pijning, T., and Dijkhuizen, L., '4, 3- $\alpha$ -Glucanotransferase, a novel reaction specificity in glycoside hydrolase family 70 and clan GH-H', *Sci. Rep.*, 7(1), 39761, (2017<sup>a</sup>).

Gangoiti, J., van Leeuwen, S. S., Meng, X., Duboux, S., Vafiadi, C., Pijning, T., and Dijkhuizen, L., 'Mining novel starch-converting Glycoside Hydrolase 70 enzymes from the Nestlé Culture Collection genome database: The *Lactobacillus reuteri* NCC 2613 GtfB', *Sci. Rep.*, 7(1), 9947, (2017<sup>c</sup>).

Gangoiti, J., van Leeuwen, S. S., Vafiadi, C., and Dijkhuizen, L., 'The Gram-negative bacterium *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 employs a new glycoside

hydrolase family 70 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase enzyme (GtfD) to synthesize a reuteran like polymer from maltodextrins and starch', *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.*, 1860(6), 1224-1236, (2016<sup>b</sup>).

Gänzle, M. G., 'Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage', *Curr. Opin. Food Sci.*, 2, 106-117, (2015).

Gänzle, M. G., and Zheng, J., 'Lifestyles of sourdough lactobacilli—Do they matter for microbial ecology and bread quality?', *Int. J. Food Microbiol.*, 302, 15-23, (2019).

Gänzle, M. G., Qiao, N., and Bechtner, J., 'The quest for the perfect loaf of sourdough bread continues: Novel developments for selection of sourdough starter cultures', *Int. J. Food Microbiol.*, 110421, (2023).

Garnweidner-Holme, L., Hallquist, M., Watters, S. I., Gjøvik, M., Frederiksen, M. P., Jonassen, S., ... and Telle-Hansen, V. H., 'Attitudes towards and experiences with sourdough and baker's yeast bread amongst participants in a randomised controlled trial: a qualitative study', *Food Nutr. Res.*, 66, (2022).

Gerçekaslan, K. E., Kotancılar, H. G. ve Karaoğlu, M. M., 'Ekmek bayatlaması ve bayatlama derecesini ölçmede kullanılan yöntemler – I', *Gıda*, 32 (6), 305-315, (2007).

Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Archetti, G., and Rizzello, C. G., 'Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation', *Int. J. Food Microbiol.*, 302, 103-113, (2019).

Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., and De Angelis, M., 'Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota' *Int. J. Food Microbiol.*, 239, 3-18, (2016).

Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., and De Angelis, M., 'How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods', *Food Microbiol.*, 37, 30-40, (2014).

Goñi, I., Garcia-Alonso, A., and Saura-Calixto, F., 'A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index', *Nutr. Res.*, 17(3), 427-437, (1997).

González-Alonso, V., Pradal, I., Wardhana, Y. R., Cnockaert, M., Wieme, A. D., Vandamme, P., and De Vuyst, L., 'Microbial ecology and metabolite dynamics of backslopped triticale sourdough productions and the impact of scale', *Int. J. Food Microbiol.*, 408, 110445, (2024).

Graça, C., Lima, A., Raymundo, A., and Sousa, I., 'Sourdough fermentation as a tool to improve the nutritional and health-promoting properties of its derived-products', *Fermentation*, 7(4), 246, (2021).

Gunduz, C. P. B., Agirman, B., Gaglio, R., Franciosi, E., Francesca, N., Settanni, L., and Erten, H., 'Evaluation of the variations in chemical and microbiological properties of the sourdoughs produced with selected lactic acid bacteria strains during fermentation', *Food Chem. X*, 14, 100357, (2022).

Gunkova, P. I., Buchilina, A. S., Maksimiuk, N. N., Bazarnova, Y. G., and Girel, K. S., 'Carbohydrate fermentation test of lactic acid starter cultures', In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* (Vol. 852, No. 1, p. 012035). IOP Publishing, (2021).

Gül, F., 'Kek Üretiminde Üretimde Ekşi Hamur Kullanımı', Yüksek Lisans Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. İstanbul, (2019).

Han, K. J., Lee, N. K., Park, H., and Paik, H. D., 'Anticancer and anti-inflammatory activity of probiotic *Lactococcus lactis* NK34', *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(10), 1697-1701, (2015).

Hassanein, W. S., İspirli, H., Dertli, E., and Yilmaz, M. T., 'Structural characterization of potato starch modified by a 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase B from *Lactobacillus reuteri* E81', *Int. J. Biol. Macromol.*, 242, 124988, (2023).

Hernández-Parada, N., González-Ríos, O., Suárez-Quiroz, M. L., Hernández-Estrada, Z. J., Figueroa-Hernández, C. Y., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., ... and Figueroa-Espinoza, M. C., 'Exploiting the native microorganisms from different food matrices to formulate starter cultures for sourdough bread production', *Microorganisms*, 11(1), 109, (2022).

- Hidalgo-Cantabrana, C., B. Sánchez, C. Milani, M. Ventura, A. Margolles, and P. Ruas-Madiedo., ‘Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp.’, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80:9–18, (2014).
- Iglesias-Puig, E., and Haros, M., ‘Evaluation of performance of dough and bread incorporating chia (*Salvia hispanica* L.)’, *Eur. Food Res. Technol.*, 237(6), 865–874. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2067-x>, (2013).
- Iskandar, C. F., Cailliez-Grimal, C., Borges, F., and Revol-Junelles, A. M., ‘Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation’, *Trends Food Sci. Technol.*, 88, 121-132, (2019).
- İspirli, H., Korkmaz, K., Arioglu-Tuncil, S., Bozkurt, F., Sağdıç, O., Tunçil, Y. E., ... and Dertli, E., ‘Utilisation of an active branching sucrase from *Lactobacillus kunkeei* AP-37 to produce techno-functional poly-oligosaccharides’, *Int. J. Biol. Macromol.*, 236, 123967, (2023).
- İspirli, H., Şimşek, Ö., Skory, C., Sağdıç, O., and Dertli, E., ‘Characterization of a 4, 6  $\alpha$  glucanotransferase from *Lactobacillus reuteri* E81 and production of malto-oligosaccharides with immune-modulatory roles’, *Int. J. Biol. Macromol.*, 124, 1213-1219, (2019).
- Janeček, Š., and Gabriško, M., ‘Remarkable evolutionary relatedness among the enzymes and proteins from the  $\alpha$ -amylase family’, *Cell. Mol. Life Sci.*, 73, 2707-2725, (2016).
- Jiang, Z., Jiang, P., Ji, S., Su, D., Xu, G., and Zhang, M., ‘Research progress on *Limosilactibacillus reuteri* in diseases’, *Microbiol. Res.*, 127482, (2023).
- Jurášková, D., Ribeiro, S. C., and Silva, C. C., ‘Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from biosynthesis to health-promoting properties’, *Foods*, 11(2), 156, (2022).
- Kılıç, S., ‘*Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri*’, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:502, Sayfa No:99-100, 3.Baskı, (2014).

Klostermann, C. E., van der Zaal, P. H., Schols, H. A., Buwalda, P. L., and Bitter, J. H., 'The influence of  $\alpha$ -1, 4-glucan substrates on 4, 6- $\alpha$ -d-glucanotransferase reaction dynamics during isomalto/malto-polysaccharide synthesis', *Int. J. Biol. Macromol.*, 181, 762-768, (2021).

Kobyliak, N., Conte, C., Cammarota, G., Haley, A. P., Styriak, I., Gaspar, L., ... and Kruzliak, P., 'Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view', *Nutr. Metab.*, 13(1), 1-13, (2016).

Korcari, D., Ricci, G., Quattrini, M., & Fortina, M. G., 'Microbial consortia involved in fermented spelt sourdoughs: Dynamics and characterization of yeasts and lactic acid bacteria', *Lett. Appl. Microbiol.*, 70(1), 48-54. (2020).

Kotsiou, K., Sacharidis, D. D., Matsakidou, A., Biliaderis, C. G., and Lazaridou, A., 'Physicochemical and functional aspects of composite wheat-roasted chickpea flours in relation to dough rheology, bread quality and staling phenomena', *Food Hydrocoll.*, 124, 107322, (2022).

König, H., and Fröhlich, J., 'Lactic acid bacteria', *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 3-41, (2017).

Kralj, S., Eeuwema, W., Eckhardt, T. H., and Dijkhuizen, L., 'Role of asparagine 1134 in glucosidic bond and transglycosylation specificity of reuteransucrase from *Lactobacillus reuteri* 121', *FEBS J.*, 273(16), 3735-3742, (2006).

Kralj, S., Grijpstra, P., van Leeuwen, S. S., Leemhuis, H., Dobruchowska, J. M., van der Kaaij, R. M., ... and Dijkhuizen, L., '4, 6- $\alpha$ -Glucanotransferase, a novel enzyme that structurally and functionally provides an evolutionary link between glycoside hydrolase enzyme families 13 and 70', *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(22), 8154-8163, (2011).

Kuang, Y., Tani, K., Synnott, A. J., Ohshima, K., Higuchi, H., Nagahata, H., and Tanji, Y., 'Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method', *Biochem. Eng. J.*, 45(1), 76-81, (2009).

Laurent, J., Timmermans, E., Struyf, N., Verstrepen, K. J., and Courtin, C. M., 'Variability in yeast invertase activity determines the extent of fructan hydrolysis during wheat dough fermentation and final FODMAP levels in bread', *Int. J. Food Microbiol.*, 326, 108648, (2020).

Leemhuis, H., Dijkman, W. P., Dobruchowska, J. M., Pijning, T., Grijpstra, P., Kralj, S., ... and Dijkhuizen, L., '4, 6- $\alpha$ -Glucanotransferase activity occurs more widespread in *Lactobacillus* strains and constitutes a separate GH70 subfamily', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 181-193, (2013).

Leemhuis, H., Dobruchowska, J. M., Ebbelaar, M., Faber, F., Buwalda, P. L., van der Maarel, M. J., ... and Dijkhuizen, L., 'Isomalto/malto-polysaccharide, a novel soluble dietary fiber made via enzymatic conversion of starch', *J. Agric. Food Chem.*, 62(49), 12034-12044, (2014).

Lefebvre, D., Gabriel, V., Vayssier, Y., and Fontagné-Faucher, C., 'Simultaneous HPLC determination of sugars, organic acids and ethanol in sourdough process', *LWT-Food Sci. Technol.*, 35(5), 407-414, (2002).

Li, D., Zhao, Y., Fei, T., Wang, Y., Lee, B. H., Shim, J. H., ... and Li, X., 'Effects of *Streptococcus thermophilus* GtfB enzyme on dough rheology, bread quality and starch digestibility', *Food Hydrocoll.*, 96, 134-139, (2019).

Li, X., Fei, T., Wang, Y., Zhao, Y., Pan, Y., and Li, D., 'Wheat starch with low retrogradation properties produced by modification of the GtfB enzyme 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase from *Streptococcus thermophilus*', *J. Agric. Food Chem.*, 66(15), 3891-3898, (2018).

Li, X., Meng, X., De Leeuw, T. C., Te Poele, E. M., Pijning, T., Dijkhuizen, L., and Liu, W., 'Enzymatic glucosylation of polyphenols using glucansucrases and branching sucrases of glycoside hydrolase family 70', *Critical Reviews in Food Sci. Nutr.*, 63(21), 5247-5267, (2023).

Li, X., Wang, X., Meng, X., Dijkhuizen, L., and Liu, W., 'Structures, physico-chemical properties, production and (potential) applications of sucrose-derived  $\alpha$ -d-glucans synthesized by glucansucrases', *Carbohydr. Polym.*, 249, 116818, (2020).



Lima, T. T. M., de Oliveira Hosken, B., Lindner, J. D. D., Menezes, L. A. A., Pirozzi, M. R., and Martin, J. G. P., 'How to deliver sourdough with appropriate characteristics for the bakery industry? The answer may be provided by microbiota', *Food Biosci.*, 103072, (2023).

Liu, S., Hu, J., Zhong, Y., Hu, X., Yin, J., Xiong, T., ... and Xie, M., 'A review: Effects of microbial fermentation on the structure and bioactivity of polysaccharides in plant-based foods', *Food Chem.*, 137453, (2023).

Lu, Y., Han, S., Zhang, S., Wang, K., Lv, L., McClements, D. J., ...and Li, L., 'The role of probiotic exopolysaccharides in adhesion to mucin in different gastrointestinal conditions', *Curr. Res. Food Sci.*, 5, 581-589, (2022).

Luo, Z., Chen, A., Xie, A., Liu, X., Jiang, S., and Yu, R., '*Limosilactobacillus reuteri* in immunomodulation: molecular mechanisms and potential applications', *Front. Immunol.*, 14, (2023).

Lv, R., Gao, X., Zhang, C., Lian, W., Quan, X., Guo, S., and Chen, X., 'Characteristics and whole-genome analysis of *Limosilactobacillus fermentum* phage LFP02', *Foods*, 12(14), 2716, (2023).

Lynch, K. M., Coffey, A., and Arendt, E. K., 'Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products', *Food Res. Int.*, 110, 52-61, (2018).

Ma, S., Wang, Z., Guo, X., Wang, F., Huang, J., Sun, B., and Wang, X., 'Sourdough improves the quality of whole-wheat flour products: Mechanisms and challenges—A review', *Food Chem.*, 360, 130038, (2021).

Maidana, S. D., Ficoseco, C. A., Bassi, D., Cocconcelli, P. S., Puglisi, E., Savoy, G., ... and Fontana, C., 'Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented chia sourdough', *Int. J. Food Microbiol.*, 316, 108425, (2020).

Mantzourani, I., Plessas, S., Odatzidou, M., Alexopoulos, A., Galanis, A., Bezirtzoglou, E., and Bekatorou, A., 'Effect of a novel *Lactobacillus paracasei* starter on sourdough bread quality', *Food Chem.*, 271, 259-265, (2019).

Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., and de Souza Oliveira, R. P., 'Lactic acid properties, applications and production: A review', *Trends Food Sci. Technol.*, 30(1), 70-83, (2013).

Mazhar, S. F., Afzal, M., Almatroudi, A., Munir, S., Ashfaq, U. A., Rasool, M., ... and Khurshid, M., 'The prospects for the therapeutic implications of genetically engineered probiotics', *J. Food Qual.*, 9676452, (2020).

Menezes, L. A., Minervini, F., Filannino, P., Sardaro, M. L., Gatti, M., and Lindner, J. D. D., 'Effects of sourdough on FODMAPs in bread and potential outcomes on irritable bowel syndrome patients and healthy subjects', *Front. Microbiol.*, 9, 411439, (2018).

Meng, X., Dobruchowska, J. M., Pijning, T., Gerwig, G. J., Kamerling, J. P., and Dijkhuizen, L., 'Truncation of domain V of the multidomain glucansucrase GTF180 of *Lactobacillus reuteri* 180 heavily impairs its polysaccharide-synthesizing ability', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 5885-5894, (2015).

Meng, X., Gangoiti, J., Bai, Y., Pijning, T., Van Leeuwen, S. S., and Dijkhuizen, L., 'Structure–function relationships of family GH70 glucansucrase and 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase enzymes, and their evolutionary relationships with family GH13 enzymes', *Cell. Mol. Life Sci.*, 73, 2681-2706, (2016a).

Meng, X., Gangoiti, J., de Kok, N., van Leeuwen, S. S., Pijning, T., and Dijkhuizen, L., 'Biochemical characterization of two GH70 family 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferases with distinct product specificity from *Lactobacillus aviarius* subsp. *aviarius* DSM 20655', *Food Chem.*, 253, 236-246, (2018).

Meng, X., Li, X., Pijning, T., Wang, X., van Leeuwen, S. S., Dijkhuizen, L., ... and Liu, W., 'Characterization of the (engineered) branching sucrose gtfz-cd2 from *Apilactobacillus kunkeei* for efficient glucosylation of benzenediol compounds', *Appl. Environ. Microbiol.*, 88(16), e01031-22, (2022).

Meng, X., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., Gerwig, G. J., and Dijkhuizen, L., 'Characterization of the functional roles of amino acid residues in acceptor-binding subsite+ 1 in the active site of the glucansucrase GTF180 from *Lactobacillus reuteri* 180', *J. Biol. Chem.* 290(50), 30131-30141, (2015).

Meroth, C. B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M. J., and Hammes, W. P., 'Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis', *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1), 475-482, (2003).

Miambi, E., Guyot, J. P., and Ampe, F., 'Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods', *Int. J. Food Microbiol.*, 82(2), 111-120, (2003).

Miao, M., and BeMiller, J. N., 'Enzymatic approaches for structuring starch to improve functionality', *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 14, 271-295, (2023).

Mihhalevski, A., Heinmaa, I., Traksmäa, R., Pehk, T., Mere, A., and Paalme, T., 'Structural changes of starch during baking and staling of rye bread', *J. Agric. Food Chem.*, 60(34), 8492-8500, (2012).

Mohammadi-Kouchesfahani, M., Hamidi-Esfahani, Z., and Azizi, M. H., 'Isolation and identification of lactic acid bacteria with phytase activity from sourdough', *Food Sci. Nutr.*, 7(11), 3700-3708, (2019).

Mokoena, M. P., Omatola, C. A., and Olaniran, A. O., 'Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens', *Molecules*, 26(22), 7055, (2021).

Molina, M., Cioci, G., Moulis, C., Séverac, E., and Remaud-Siméon, M., 'Bacterial  $\alpha$ -glucan and branching sucrases from GH70 family: Discovery, structure–function relationship studies and engineering', *Microorganisms*, 9(8), 1607, (2021).

- Mollakhalili-Meybodi, N., Sheidaei, Z., Khorshidian, N., Nematollahi, A., and Khanniri, E., 'Sensory attributes of wheat bread: A review of influential factors', *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(3), 2172-2181, (2023).
- Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., and Willemot, R. M., 'Cloning and sequencing of a gene coding for an extracellular dextransucrase (DSRB) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only a  $\alpha$  (1-6) glucan', *FEMS Microbiol. Lett.*, 159(2), 307-315, (1998).
- Moroni, A. V., Dal Bello, F., and Arendt, E. K., 'Sourdough in gluten-free bread-making: an ancient technology to solve a novel issue?', *Food Microbiol.* 26(7), 676-684, (2009).
- Mozzi, F., 'Lactic acid bacteria', *In: Encyclopedia of food and health* (ed) Elsevier, 1th edn., pp 501-508, (2016).
- Mu, Q., Tavella, V. J., and Luo, X. M., 'Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases', *Front. Microbiol.*, 9, 757, (2018).
- Muir, J. G., Varney, J. E., Ajamian, M., and Gibson, P. R., 'Gluten-free and low-FODMAP sourdoughs for patients with coeliac disease and irritable bowel syndrome: A clinical perspective', *Int. J. Food Microbiol.*, 290, 237-246, (2019).
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, M., and de las Rivas, B., 'Lactic acid bacteria', *Molecular Wine Microbiology*, 191-226, (2011).
- Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., and Nguyen, H. T., 'Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications', *AIMS Microbiol.*, 6(4), 451, (2020).
- Nutter, J., Saiz, A. I., and Iurlina, M. O., 'Microstructural and conformational changes of gluten proteins in wheat-rye sourdough', *J. Cereal Sci.*, 87, 91-97, (2019).
- Oguntoyinbo, F. A., and Dodd, C. E., 'Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in gari production', *Food Control*, 21(3), 306-312, (2010).

Orla-Jensen, S., 'The lactic acid bacteria', *AF Host*, (Vol. 3, No. 2), (1919).

Oshiro, M., Momoda, R., Tanaka, M., Zendo, T., and Nakayama, J., 'Dense tracking of the dynamics of the microbial community and chemicals constituents in spontaneous wheat sourdough during two months of backslopping', *J. Biosci. Bioeng.*, 128(2), 170-176, (2019).

Oshiro, M., Zendo, T., and Nakayama, J., 'Diversity and dynamics of sourdough lactic acid bacteria created by a slow food fermentation system', *J. Biosci. Bioeng.*, 131(4), 333-340, (2021).

Ozen, M., Piloquet, H., and Schaubeck, M., '*Limosilactobacillus fermentum* CECT5716: Clinical potential of a probiotic strain isolated from human milk', *Nutrients*, 15(9), 2207, (2023).

Özel, S., 'Tarhana hamuru fermentasyonunun mikrobiyal taksonomik yapısının ve populasyon dinamiğinin belirlenmesi', Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Denizli, (2012).

Park, D. Y., Hwang, J., Kim, Y., Lee, D., Kim, Y. Y., Kim, H. S., and Hwang, I., 'Antimicrobial activity of *Limosilactobacillus fermentum* strains isolated from the human oral cavity against *Streptococcus mutans*', *Sci. Rep.*, 13(1), 7969, (2023).

Passerini, D., Vuillemin, M., Ufarté, L., Morel, S., Loux, V., Fontagné-Faucher, C., ... and Moulis, C., 'Inventory of the GH 70 enzymes encoded by *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299—identification of three novel  $\alpha$ -transglucosylases', *FEBS J.*, 282(11), 2115-2130, (2015).

Pejcz, E., Lachowicz-Wiśniewska, S., Nowicka, P., Wojciechowicz-Budzisz, A., and Harasym, J., 'Enhancing bread's benefits: Investigating the influence of boosted native sourdough on FODMAP modulation and antioxidant potential in wheat bread', *Foods*, 12(19), 3552, (2023).

Pereira, E. P. R., da Graça, J. S., Ferreira, B. M., Balthazar, C. F., Xavier-Santos, D., Bezerril, F. F., ... and Sant'Ana, A. S., 'What are the main obstacles to turning foods

healthier through probiotics incorporation? A review of functionalization of foods by probiotics and bioactive metabolites', *Food Res. Int.*, 113785, (2023).

Pérez-Alvarado, O., Zepeda-Hernández, A., Garcia-Amezquita, L. E., Requena, T., Vinderola, G., and García-Cayueta, T., 'Role of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough fermentation during breadmaking: Evaluation of postbiotic-like components and health benefits', *Front. Microbiol.*, 13, 969460, (2022).

Petrova, P., Petrov, K., and Stoyancheva, G., 'Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria—structures, properties, and applications', *Starke*, 65(1-2), 34-47, (2013).

Phujumpa, P., Muangham, S., Jatuponwiphat, T., Koffas, M., Nakphaichit, M., and Vongsangnak, W., 'Comparative genomics-based probiotic relevance of *Limosilactobacillus fermentum* KUB-D18', *Gene*, 840, 146747, (2022).

Pico, J., Bernal, J., and Gómez, M., 'Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: A review', *Food Res. Int.*, 75, 200-215, (2015).

Pijning, T., Gangoiti, J., Te Poele, E. M., Börner, T., and Dijkhuizen, L., 'Insights into broad-specificity starch modification from the crystal structure of *Limosilactobacillus reuteri* NCC 2613 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase GtfB', *J. Agric. Food Chem.*, 69(44), 13235-13245, (2021).

Pijning, T., Te Poele, E. M., de Leeuw, T. C., Guskov, A., and Dijkhuizen, L., 'Crystal structure of 4,6- $\alpha$ -Glucanotransferase GtfC- $\Delta$ C from *Thermophilic geobacillus* 12AMOR1: Starch transglycosylation in non-permuted GH70 enzymes', *J. Agric. Food Chem.*, 70(48), 15283-15295, (2022).

Pino, A., Russo, N., Solieri, L., Sola, L., Caggia, C., and Randazzo, C. L., 'Microbial consortia involved in traditional Sicilian sourdough: Characterization of lactic acid bacteria and yeast populations', *Microorganisms*, 10(2), 283, (2022).

Pitcher, D. G., Saunders, N. A., and Owen, R. J., 'Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate', *Lett. Appl. Microbiol.*, 8(4), 151-156, (1989).

Plessas, S., Alexopoulos, A., Mantzourani, I., Koutinas, A., Voidarou, C., Stavropoulou, E., and Bezirtzoglou, E., 'Application of novel starter cultures for sourdough bread production', *Anaerobe*, 17(6), 486-489, (2011).

Ramos, L., Alonso-Hernando, A., Martínez-Castro, M., Morán-Pérez, J. A., Cabrero-Lobato, P., Pascual-Maté, A., ... and Mujico, J. R., 'Sourdough biotechnology applied to gluten-free baked goods: Rescuing the tradition', *Foods*, 10(7), 1498, (2021).

Rao, D., Huo, R., Yan, Z., Guo, Z., Liu, W., Lu, M., ... and Wu, J., 'Multiple approaches of loop region modification for thermostability improvement of 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase from *Limosilactobacillus fermentum* NCC 3057', *Int. J. Biol. Macromol.*, 233, 123536, (2023).

Rastogi, Y. R., Thakur, R., Thakur, P., Mittal, A., Chakrabarti, S., Siwal, S. S., ... and Saini, A. K., 'Food fermentation—Significance to public health and sustainability challenges of modern diet and food systems', *Int. J. Food Microbiol.*, 371, 109666, (2022).

Reale, A., Di Renzo, T., Boscaino, F., Nazzaro, F., Fratianni, F., and Aponte, M., 'Lactic acid bacteria biota and aroma profile of italian traditional sourdoughs from the irpinian area in Italy', *Front. Microbiol.*, 10, 1621, (2019).

Rizzello, C. G., Portincasa, P., Montemurro, M., Di Palo, D. M., Lorusso, M. P., De Angelis, M., ... and Gobbetti, M., 'Sourdough fermented breads are more digestible than those started with baker's yeast alone: an in vivo challenge dissecting distinct gastrointestinal responses', *Nutrients*, 11(12), 2954, (2019).

Rozhkova, I. V., Yurova, E. A., and Leonova, V. A., 'Evaluation of the amino acid composition and content of organic acids of complex postbiotic substances obtained on the basis of metabolites of probiotic bacteria *Lactocaseibacillus paracasei* ABK and *Lactobacillus helveticus* H9', *Fermentation*, 9(5), 460, (2023).

Ruiz-Rodríguez, L., Bleckwedel, J., Eugenia Ortiz, M., Pescuma, M., and Mozzi, F., 'Lactic acid bacteria', *Industrial Biotechnology: Microorganisms*, 1, 395-451, (2017).

Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Hajinia, F., Kharazmi, M. S., and Jafari, S. M., 'FoodOmics as a promising strategy to study the effects of sourdough on human health and nutrition, as well as product quality and safety; back to the future', *Trends Food Sci. Technol.*, (2023).

Sakandar, H. A., Hussain, R., Kubow, S., Sadiq, F. A., Huang, W., and Imran, M., 'Sourdough bread: A contemporary cereal fermented product', *J. Food Process. Preserv.*, 43(3), e13883, (2019).

Sánchez, L., Mendoza, F., Alderete, J. B., Jiménez, V. A., and Jaña, G. A., 'The role of conserved arginine in the GH70 family: a computational study of the structural features and their implications on the catalytic mechanism of GTF-SI from *Streptococcus mutans*', *Org. Biomol. Chem.*, 17(25), 6269-6276, (2019).

Sereti, V., Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., and Valamoti, S. M., 'Reinvigorating modern breadmaking based on ancient practices and plant ingredients, with implementation of a physicochemical approach', *Foods*, 10(4), 789, (2021).

Serin, S., and Sayar, S., 'The effect of the replacement of fat with carbohydrate-based fat replacers on the dough properties and quality of the baked pogaca: a traditional high-fat bakery product', *Food Sci. Technol.*, 37, 25-32, (2016).

Seung, D., 'Amylose in starch: towards an understanding of biosynthesis, structure and function', *New Phytol.*, 228(5), 1490-1504, (2020).

Sevgili, A., Can, C., Ceyhan, D. I., and Erkmen, O., 'Molecular identification of LAB and yeasts from traditional sourdoughs and their impacts on the sourdough bread quality characteristics', *Curr. Res. Food Sci.*, 6, 100479, (2023).

Shi, S., Dong, J., Cheng, X., Hu, J., Liu, Y., He, G., ...and Zhou, D., 'Biological characteristics and whole-genome analysis of the potential probiotic, *Lactobacillus reuteri* S5', *Lett. Appl. Microbiol.*, 74(4), 593-603, (2022).

Siepmann, F. B., de Almeida, B. S., Waszczyński, N., and Spier, M. R., 'Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic



compounds evolution on type II sourdough and wheat bread', *LWT*, 108, 199-206, (2019).

Siepmann, F. B., Ripari, V., Waszczyński, N., and Spier, M. R., 'Overview of sourdough technology: From production to marketing', *Food Bioproc. Tech.*, 11, 242-270, (2018).

Song, L., Miao, M., Jiang, B., Xu, T., Cui, S. W., and Zhang, T., '*Leuconostoc citreum* SK24. 002 glucanase: Biochemical characterisation and de novo synthesis of  $\alpha$ -glucan', *Int. J. Biol. Macromol.*, 91, 123-131, (2016).

Sudeepa, E. S., and Bhavini, K., 'Review on *Lactobacillus fermentum*', Vol-6 Issue-3 *IJARIE- ISSN(O)-2395-4396*, (2020).

Sun, X., Ma, L., Zhong, X., and Liang, J., 'Potential of raw and fermented maize gluten feed in bread making: Assess of dough rheological properties and bread quality', *LWT*, 162, 113482, (2022).

Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., Zhang, H., 'Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. (eds: Zhang, H., Cai, Y.), *Lactic Acid Bacteria*. Springer, Dordrecht, (2014).

Sümbül, M., 'Ekşi hamur ekmeklerinin üretiminde kullanılmak üzere bir sıvı ekşi hamur mayasının geliştirilme imkanlarının araştırılması', *Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2021).

Syrokou, M. K., Themeli, C., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Bosnea, L., Argyri, A. A., ... and Drosinos, E. H., 'Microbial ecology of Greek wheat sourdoughs, identified by a culture-dependent and a culture-independent approach', *Foods*, 9(11), 1603, (2020).

Teneva-Angelova, T., Hristova, I., Pavlov, A., and Beshkova, D., 'Lactic acid bacteria—from nature through food to health', *In Advances in Biotechnology for Food Industry* (pp. 91-133). Academic Press, (2018).

Terrazas-Avila, P., Palma-Rodríguez, H. M., Navarro-Cortez, R. O., Hernández-Urbe, J. P., Piloni-Martini, J., and Vargas-Torres, A., 'The effects of fermentation

time on sourdough bread: An analysis of texture profile, starch digestion rate, and protein hydrolysis rate', *J. Texture Stud.*, 55(2), e12831, (2024).

Tiwari, S., Kavitate, D., Devi, P. B., and Shetty, P. H., 'Bacterial exopolysaccharides for improvement of technological, functional and rheological properties of yoghurt', *Int. J. Biol. Macromol.*, 183, 1585-1595, (2021).

Van der Meulen, R., Scheirlinck, I., Van Schoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., and De Vuyst, L., 'Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs', *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(15), 4741-4750, (2007).

Van Hijum, S. A., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., and van Geel-Schutten, I. G., 'Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(1), 157-176, (2006).

Van Kerrebroeck, S., Maes, D., and De Vuyst, L., 'Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis', *Trends Food Sci. Technol.*, 68, 152-159, (2017).

Vaughan, E. E., Pridmore, R. D., and Mollet, B., 'Transcriptional regulation and evolution of lactose genes in the galactose-lactose operon of *Lactococcus lactis* NCDO2054', *J. Bacteriol.*, 180(18), 4893-4902, (1998).

Vijaykumar, S., McCready, J., Graham, P. L., and Morris, D., 'That gut feeling: public perceptions of media coverage and science surrounding probiotic products', *Br. Food J.*, 124(11), 3428-3446, (2022).

Vuillemin, M., Claverie, M., Brison, Y., Séverac, E., Bondy, P., Morel, S., ... and Remaud-Siméon, M., 'Characterization of the first  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) branching sucrases of the GH70 family', *J. Biol. Chem.*, 291(14), 7687-7702, (2016).

Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., and Wang, S., 'Starch retrogradation: A comprehensive review', *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 14(5), 568-585, (2015).

Wang, X., Zhao, R., and Yuan, W., 'Type I sourdough steamed bread made by retarded sponge-dough method', *Food Chem.*, 311, 126029, (2020).

- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., ... and Geng, W., 'Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry', *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9, 612285, (2021).
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., ... and Li, W., 'Antioxidant properties of probiotic bacteria', *Nutrients*, 9(5), 521, (2017).
- Wang, Z., and Wang, L., 'Impact of sourdough fermentation on nutrient transformations in cereal-based foods: Mechanisms, practical applications, and health implications', *GOST*, (2024).
- Werning, M. L., Hernández-Alcántara, A. M., Ruiz, M. J., Soto, L. P., Dueñas, M. T., López, P., and Frizzo, L. S., 'Biological functions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their potential benefits for humans and farmed animals', *Foods*, 11(9), 1284, (2022).
- Wu, Q., and Shah, N. P., 'The potential of species-specific tagatose-6-phosphate (T6P) pathway in *Lactobacillus casei* group for galactose reduction in fermented dairy foods', *Food Microbiol.*, 62, 178-187, (2017).
- Wu, Q., Cheung, C. K., and Shah, N. P., 'Towards galactose accumulation in dairy foods fermented by conventional starter cultures: Challenges and strategies', *Trends Food Sci. Technol.*, 41(1), 24-36, (2015).
- Xiang, G., Buwalda, P. L., Van Der Maarel, M. J., and Leemhuis, H., 'The thermostable 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase of *Bacillus coagulans* DSM 1 synthesizes isomaltooligosaccharides', *Amylase*, 5(1), 13-22, (2021).
- Xu, D., Yin, Y., Ali, B., Zhang, Y., Guo, L., and Xu, X., 'Isolation of yeast strains from Chinese liquor Daqu and its use in the wheat sourdough bread making', *Food Biosci.*, 31, 100443, (2019).
- Xu, X., Dechesne, A., Visser, R. G., and Trindade, L. M., 'Expression of an (engineered) 4,6- $\alpha$ -Glucanotransferase in potato results in changes in starch characteristics', *PLoS One*, 11(12), e0166981, (2016).

Yagmur, G., Tanguler, H., Leventdurur, S., Bağder Elmacı, S., Turhan, E., Francesca, N., ... and Erten, H., 'Identification of predominant lactic acid bacteria and yeasts of Turkish sourdoughs and selection of starter cultures for liquid sourdough production using different flours and dough yields', *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 66(2), (2016).

Yaman, M., Sargin, H. S., and Mızrak, Ö. F., 'Free sugar content, in vitro starch digestibility and predicted glycemic index of ready-to-eat breakfast cereals commonly consumed in Turkey: An evaluation of nutritional quality', *Int. J. Biol. Macromol.*, 135, 1082-1087, (2019).

Yang, S., Xu, X., Peng, Q., Ma, L., Qiao, Y., and Shi, B., 'Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, as an alternative to antibiotics, on regulation of intestinal health and the immune system', *Anim. Nutr.*, 13, 78-89, (2023).

Yang, W., Sheng, L., Chen, S., Wang, L., Su, L., and Wu, J., 'Characterization of a new 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase from *Limosilactobacillus fermentum* NCC 3057 with ability of synthesizing low molecular mass isomalto-/maltopolysaccharide', *Food Biosci.*, 46, 101514, (2022).

Yang, Y., Zhao, X., Zhang, T., Hamaker, B. R., and Miao, M., 'Development of a novel starch-based dietary fiber using glucanotransferase', *Food Funct.*, 12(13), 5745-5754, (2021).

Yılmaz, D., 'Ekşi hamurdan mayaların izolasyonu ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi', Yüksek Lisans Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2019).

Yildirim, R. M., and Arici, M., 'Effect of the fermentation temperature on the degradation of phytic acid in whole-wheat sourdough bread', *LWT*, 112, 108224, (2019).

Yu, L., Qian, Z., Ge, J., and Du, R., 'Glucansucrase produced by lactic acid bacteria: Structure, properties, and applications', *Fermentation*, 8(11), 629, (2022).

Zhang, G., Zhang, W., Sun, L., Sadiq, F. A., Yang, Y., Gao, J., and Sang, Y., 'Preparation screening, production optimization and characterization of

exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis* Ls-1001 isolated from Chinese traditional sourdough', *Int. J. Biol. Macromol.*, 139, 1295-1303, (2019).

Zhang, J., Yao, Y., Li, J., Ju, X., and Wang, L., 'Impact of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria on the chemical, rheological properties of buckwheat sourdough and the quality of buckwheat bread', *Food Chem.*, 425, 136369, (2023).

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... and Lebeer, S., 'A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*', *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 70(4), 2782-2858, (2020).

# **EKLER**

## 7. EKLER

**EK A** Kontrol Ekmeği, 4,6 AGT (+)-(-) ve 4,3 AGT (+)-(-) Ekmek Duyusal Değerlendirme Formu

**EKMEK NUMARASI:** .....

1. Ekmeđin **kabuk rengini** inceleyip, dűşüncenizi iřaretleyiniz.

Aşırı kötü  Çok kötü  Kötü  Orta  İyi  Çok iyi  Mükemmel

2. Ekmeđin **iç rengini** inceleyip, dűşüncenizi iřaretleyiniz.

Aşırı kötü  Çok kötü  Kötü  Orta  İyi  Çok iyi  Mükemmel

3. Ekmeđin **gözenek yapısını** inceleyip, dűşüncenizi iřaretleyiniz.

Aşırı kötü  Çok kötü  Kötü  Orta  İyi  Çok iyi  Mükemmel

4. Ekmeđe parmađınızla dokunarak **tekstür (vapsal) özelliđi** hakkındaki dűşüncenizi iřaretleyiniz.

Aşırı kötü  Çok kötü  Kötü  Orta  İyi  Çok iyi  Mükemmel

5. Ekmeđin **kokusu** hakkındaki dűşüncenizi iřaretleyiniz.

Aşırı kötü  Çok kötü  Kötü  Orta  İyi  Çok iyi  Mükemmel

6. Ekmeđin **ciđnenebilirliđi** hakkındaki dűşüncenizi iřaretleyiniz.

Aşırı kötü  Çok kötü  Kötü  Orta  İyi  Çok iyi  Mükemmel

7. Ekmeđin **lezzeti (tat ve aroma)** hakkındaki dűşüncenizi iřaretleyiniz.

Aşırı kötü  Çok kötü  Kötü  Orta  İyi  Çok iyi  Mükemmel

8. Ekmeđin **eksimsiliđi** hakkındaki dűşüncenizi iřaretleyiniz.

Aşırı kötü  Çok kötü  Kötü  Orta  İyi  Çok iyi  Mükemmel

9. Ekmek ile ilgili olarak **genel beđeniniz** hakkındaki dűşüncenizi iřaretleyiniz.

Aşırı kötü  Çok kötü  Kötü  Orta  İyi  Çok iyi  Mükemmel