



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



EKŞİ HAMURLARDAN İZOLE EDİLEN
Lactobacillus plantarum TÜRÜNÜN
DONDURARAK KURUTULMASINDA
FARKLI SÜTÇÜLÜK YAN ÜRÜNLERİNİN
KRİYOPROTEKTİF ROLLERİNİN
BELİRLENMESİ

Gamze ÜÇÖK

DOKTORA TEZİ

Eylül-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Gamze ÜÇÖK tarafından hazırlanan “**Ekşi Hamurlardan İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Türünün Dondurarak Kurutulmasında Farklı Sütçülük Yan Ürünlerinin Kriyoprotektif Rollerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 21/09/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Durmuş SERT

.....

Üye

Prof. Dr. Nermin BİLGİÇLİ

.....

Üye

Prof. Dr. Ercan KURAR

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Emin MERCAN

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. S. Savaş DURDURAN
FBE Müdürü

Bu tez çalışması NEÜ BAP Koordinatörlüğü tarafından 181419001 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Gamze ÜÇOK

Tarih: 21/09/2020

ÖZET

DOKTORA TEZİ

EKŞİ HAMURLARDAN İZOLE EDİLEN *Lactobacillus plantarum* TÜRÜNÜN DONDURARAK KURUTULMASINDA FARKLI SÜTÇÜLÜK YAN ÜRÜNLERİNİN KRİYOPROTEKTİF ROLLERİNİN BELİRLENMESİ

Gamze ÜÇOK

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Durmuş SERT

2020, 183 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Durmuş SERT

Prof. Dr. Nermin BİLGİÇLİ

Prof. Dr. Ercan KURAR

Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN

Dr. Öğr. Üyesi Emin MERCAN

Bu çalışmada, ekşi hamurdan izole edilen *L. plantarum* bakterisinin büyüme kinetiği, biyokütle özellikleri ve hamur oluşturma yeteneği incelenmiş ve %5 oranında asit kazein, rennet kazein, peynir altı suyu tozu (PAST) ve demineralize PAST gibi koruyucu madde içeren yağsız süt temelli ortam içerisinde dondurarak kurutulmasıyla toz kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen kültürler 5 ay boyunca vakum altında +4°C'de depolanmış ve kullanılan farklı protektanların, kültürlerin canlı kalma oranları ile bazı biyokimyasal ve fiziksel özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır. *L. plantarum*'un büyüme kinetiği ve biyokütle oluşturma özellikleri, MRS sıvı besiyeri ortamında 37°C'de 28 saatlik bir fermantasyon ile incelenmiştir. Log fazında maksimum spesifik büyüme hızı 0.551 sa⁻¹ ve biyokütle üretkenliği 1.08 g/Lsa olarak hesaplanmıştır. Durağan faza ulaşıldığında maksimum 2.9 log kob/mL artış gözlenmiş ve ortalama biyokütle üretkenliği ise 9.19 g/L (kuru madde bazında 2.14 g/L) olarak belirlenmiştir. Bir partikül boyut analizörü kullanılarak *L. plantarum* hücre D_{4,3} ve D₉₀ boyut sonuçları sırasıyla 4.38 ve 9.01 µm olarak ölçülmüştür. *L. plantarum* biyokütlesi ilave edilerek hazırlanan ve 1, 15, 20 ve 25 saat fermente edilen hamurların asitliği, canlı hücre sayısı ve işlenebilirlik özellikleri incelenmiştir. Fermantasyon sırasında artan asitlikle birlikte daha kohezif ve yapışkan hamur oluşumu tespit edilmiştir. Liyofilize edilerek toz haline getirilen *L. plantarum* kültürlerinde kullanılan kriyoprotektanların dondurarak kurutma prosesine karşı belirgin bir koruyuculuğunun olmadığı, rennet kazein kullanımının ise canlılığı ciddi şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Kullanılan koruyucu maddelerin canlılığı korumadaki etkinliği depolama sırasında ortaya çıkmış ve kontrol kültürüne göre oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol ve kazein kullanılan kültürler yüksek nem ve su aktivitesine sahipken, peynir altı suyu tozu kullanılan kültürlerin su içerikleri ise kabul edilebilir sınırlar içerisinde bulunmuştur. Buna göre yüksek nem içeriğine sahip kültürler %75 bağıl nem içeren ortamda su desorplama davranışı gösterirken, düşük neme sahip olan peynir altı suyu tozu içeren kültürler ise su adsorplama davranışında bulunmuşlardır. Elde edilen kültürlerin renk değerlerinde hem başlangıçta, hem de depolama süresince farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Kültürlerin partikül boyutlarının nem içeriğiyle paralellik gösterdiği, depolama ile birlikte de partikül boyut ve dağılımda artışlar meydana geldiği görülmüştür. SEM görüntülerinden farklı kriyoprotektanların toz morfolojileri üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kültürlerde yapılan TGA ve DSC analizleri dondurarak kurutulmuş tozların termal stabiliteyi incelenmiştir. Genel olarak, kültürlerin dondurarak kurutma yöntemiyle korunmasında, rennet kazein hariç, kullanılan tüm kriyoprotektanların avantaj sağladığı açık bir şekilde tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyokütle, büyüme kinetiği, dondurarak kurutma, ekşi hamur, kriyoprotektan, *L. plantarum*.

ABSTRACT

Ph.D THESIS

DETERMINATION OF THE CRYOPROTECTIVE ROLES OF DIFFERENT DAIRY BY-PRODUCTS IN THE FREEZE DRYING OF *Lactobacillus plantarum* ISOLATED FROM SOURDOUGH

Gamze ÜÇOK

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN FOOD ENGINEERING

Advisor: Asst. Prof. Dr. Durmuş SERT

2020, 183 Pages

Jury

Assist. Prof. Dr. Durmuş SERT

Prof. Dr. Nermin BİLGİÇLİ

Prof. Dr. Ercan KURAR

Assoc. Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN

Assist. Prof. Emin MERCAN

In this study, the growth kinetics, biomass properties and dough-forming ability of *L. plantarum* bacteria isolated from sourdough were investigated. Powder cultures were obtained by freeze-drying in skimmed milk-based media containing 5% acid casein, rennet casein and whey powder. The cultures were stored under vacuum at +4°C for 5 months and the effects of the different protectants used on the survival rates and some biochemical and physical properties of the cultures were investigated. Growth kinetics and biomass properties of *L. plantarum* were examined in MRS broth medium with a fermentation of 28 hours at 37°C. Maximum specific growth rate in log phase was calculated as 0.551 hr⁻¹ and biomass productivity as 1.08 g/Lh. When the stationary phase was reached, a maximum increase of 2.9 log cfu/mL was observed and the average biomass productivity was determined as 9.19 g/L (2.14 g/L on dry matter basis). D_{4,3} and D₉₀ size results of *L. plantarum* cells using a particle size analyzer were measured as 4.38 and 9.01 µm, respectively. Dough prepared by adding *L. plantarum* biomass was fermented for 1, 15, 20 and 25 hours. The acidity, viable cell number and machinability properties of dough were examined. More cohesive and sticky dough formation was detected with increasing acidity during fermentation. It was determined that the cryoprotectants used in *L. plantarum* cultures, which were powdered after lyophilized, did not have a significant protection against freeze-drying process, and the use of rennet casein significantly reduced viability. The efficiency of the preservatives used in protecting the viability was revealed during storage, and quite successful results were obtained compared to the control culture. While the control and casein-used cultures had high humidity and water activity, the water contents of the cultures using whey powders were found within acceptable limits. Accordingly, cultures with high moisture content showed water desorption behavior in an environment containing 75% relative humidity, while cultures with low moisture content whey powder showed water adsorption behavior. It has been determined that there were differences in the color values of the cultures both at the beginning and during the period of storage. It was observed that particle sizes of the cultures were parallel to the moisture content. Particle size and distribution increased with storage. Different cryoprotectants were found to be effective on powder morphologies from SEM images. In addition, the thermal stability of freeze-dried culture powders was investigated by TGA and DSC analyzes. Generally, it has been clearly established that all cryoprotectants are advantageous in the preservation of cultures by freeze drying, with the exception of rennet casein.

Keywords: Biomass, growth kinetics, freeze-drying, sourdough, cryoprotectants, *L. plantarum*.

ÖNSÖZ

Doktora tezimin planlanması ve yürütülmesinde bana büyük destek olan ve deneyimlerini esirgemeyen, büyük bir özveri göstererek karşılaştığım her türlü sorunda bana yardım eden, öneri ve katkılarıyla yönlendiren saygı değer hocam Dr. Öğr. Üyesi Durmuş SERT'e;

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Hayatımın her aşamasında arkamda duran, en büyük destekçim olan babama ve bana varlığıyla güç veren anneme;

Tez çalışmam boyunca benden desteğini ve sabrını esirgemeyen değerli eşim Hayrullah ÜÇOK'a ve ailesine;

Bana gösterdiği sonsuz sabır ve anlayışı için çok sevgili biricik kızım Masal'a içtenlikle teşekkür eder ve şükranlarımı sunarım.

Gamze ÜÇOK
KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Ekşi Hamur	4
2.1.1. Genel özellikleri.....	4
2.1.2. Ekşi hamurların bazı teknik özellikleri.....	6
2.1.3. Ekşi hamurların sınıflandırılması.....	7
2.2. Laktik Asit Bakterileri	9
2.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	10
2.3. Kültür Korumanın Önemi	13
2.4. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon)	15
2.4.1. Dondurarak kurutma prosesi.....	16
2.4.2. Mikroorganizmaların dondurarak kurutulması.....	18
2.5. Mikrobiyal Büyüme Kinetiği.....	23
2.5.1. Kesikli kültürde (batch) hücre büyümesi.....	24
2.5.2. Bakteri büyümesinin ölçülmesi ve büyüme kinetiklerinin belirlenmesi	25
2.6. Sütçülük Yan Ürünleri	28
2.6.1. Yağsız süt tozu.....	29
2.6.2. Kazeinler	31
2.6.3. Peynir altı suyu tozu	34
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36
3.1. Materyal	36
3.2. Ekşi Hamur Örneklerinin Toplanması ve Üretimi.....	36
3.2.1. Ekşi hamur üretimi.....	36
3.3. Ekşi Hamur Örneklerinde Yapılan Analizler.....	38
3.3.1. Toplam titrasyon asitliği	38
3.3.2. pH.....	38
3.3.3. Renk değerleri.....	38
3.3.4. Su aktivitesi.....	39
3.3.5. Nem miktarı	39
3.3.6. Laktik asit bakterisi (LAB) sayımı	39
3.4. Ekşi Hamurlardan LAB İzolasyonu.....	40
3.4.1. Biyokimyasal tanımlama	40

3.4.2. Hücre konsantrasyonunun optik dansitesi (OD ₆₀₀).....	41
3.5. İzole edilen LAB'nin Genetik Tanımlanması.....	42
3.5.1. LAB'nden DNA izolasyonu	42
3.5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ve DNA dizi analizi	42
3.6. <i>L. plantarum</i> Gelişmesine Ait Kinetik Parametrelerin Hesaplanması.....	43
3.7. <i>L. plantarum</i> 'un Biyokütle Özellikleri	44
3.7.1. <i>L. plantarum</i> biyokütlesinin toplanması ve kuru ağırlığının belirlenmesi....	44
3.7.2. Biyokütlenin parçacık boyutu dağılımı.....	44
3.7.3. Biyokütlenin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.....	45
3.8. <i>L. plantarum</i> Kullanarak Ekşi Hamur Denemesi.....	45
3.8.1. Ekşi hamur denemesi için sıvı inokülümün hazırlanması	45
3.8.2. Hamurun hazırlanması	45
3.8.3. Hamur analizleri	46
3.9. <i>L. plantarum</i> Liyofilize Kültürlerinin Üretilmesi	47
3.9.1. Mikroorganizma inokülümünün hazırlanması.....	47
3.9.2. Koruyucu ortamların hazırlanması	47
3.9.3. Liyofilizasyon işlemi	48
3.10. Liyofilize Kültürlerde Yapılan Analizler.....	48
3.10.1. Canlı hücre sayımı	48
3.10.2. Nem içeriği	50
3.10.3. Su aktivitesi.....	50
3.10.4. Su sorpsiyon özelliği.....	50
3.10.5. Renk analizi	50
3.10.6. Toz kültürlerin parçacık boyutu dağılımı	50
3.10.7. Toz kültürlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmesi.....	51
3.10.8. Termal analizler	51
3.11. İstatistiki Değerlendirme.....	51
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	52
4.1. Ekşi Hamur Analiz Sonuçları	52
4.1.1. Hamurların toplam titrasyon asitliği (TTA) ve pH sonuçları	52
4.1.2. Ekşi hamurların renk değerleri	54
4.1.3. Ekşi hamurların su aktivitesi, nem miktarı ve LAB sayım sonuçları	55
4.2. Ekşi Hamurlardan LAB İzolasyonu ve LAB'nin OD ₆₀₀ Ölçüm Sonuçları.....	56
4.3. <i>L. plantarum</i> 'un Büyüme Kinetiği	59
4.4. <i>L. plantarum</i> 'un Biyokütle Özellikleri.....	63
4.4.1. Biyokütle üretkenliği	63
4.4.2. Biyokütlenin partikül boyut dağılımı.....	65
4.4.3. Biyokütlenin SEM görüntüsü ve boyut ölçümü	67
4.5. <i>L. plantarum</i> ile Yapılan Tip II Ekşi Hamur Denemesi Analiz Sonuçları	68
4.5.1. Hamur asitliği ve pH'sı.....	68
4.5.2. Ekşi hamurlardaki LAB sayısı	69
4.5.3. Ekşi hamurların renk değerleri	71
4.5.4. Ekşi hamurlardaki hacim artışı	72
4.5.5. <i>L. plantarum</i> 'un hamur işleme özelliklerine etkisi.....	72
4.6. Liyofilize Kültürlerde Yapılan Analiz Sonuçları.....	74
4.6.1. Liyofilize kültürlerin canlı hücre sayım sonuçları	78
4.6.2. Liyofilize kültürlerin nem miktarları ve kullanılan koruyucu ajanların kuruma etkinliği üzerine etkisi	91

4.6.3. Liyofilize kültürlerin su aktivitesi (a_w) değerleri	95
4.6.4. Liyofilize kültürlerin sorpsiyon özellikleri	99
4.6.5. Liyofilize kültürlerin renk değerleri	104
4.6.6. Liyofilize kültürlerin partikül büyüklük ve boyut dağılımları	112
4.6.7. Liyofilize kültürlerin SEM görüntüleri	123
4.6.8. Liyofilize kültürlerin termal davranışları	130
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	146
5.1. Sonuçlar	146
5.2. Öneriler	153
6. KAYNAKLAR	155
ÖZGEÇMİŞ	173



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	: Alfa
a^*	: (a+) kırmızı ve (a-) yeşil renk değeri
a_w	: Su aktivitesi
b^*	: (b+) sarı ve (b-) mavi renk değeri
β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece
dk	: Dakika
$D_{3,2}$: Hacim/yüzey alanı ortalama çap
$D_{4,3}$: Hacimsel ortalama çap
D_{10}	: %10 kümülatif yüzdeye denk gelen boyut
D_{50}	: Hacme dayalı medyan
D_{90}	: %90 kümülatif yüzdeye denk gelen boyut
ΔE^*	: Toplam renk farkı
φ biyokütle	: Biyokütle üretkenliği
g	: Gram
sa	: Saat
L	: Litre
L^*	: (0) siyah-(100) beyaz Parlaklık renk değeri
mL	: Mililitre
M	: Molarite
μm	: Mikrometre
μ	: Özgül büyüme hızı
μ_{max}	: Maksimum özgül büyüme hızı

Kısaltmalar

AACC	: American Association for Clinical Chemistry
AK	: Asit kazein eklenerek liyofilize edilmiş kültür
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DP	: DPAST eklenerek liyofilize edilmiş kültür
DPAST	: Demineralize peynir altı suyu tozu
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
kob	: koloni oluşturan birim
LAB	: Laktik asit bakterisi
MRD	: Maximum Recovery Diluent
MRS	: de Man, Rogosa and Sharpe
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
OD_{600}	: 600nm'deki optik yoğunluk
P	: PAST eklenerek liyofilize edilmiş kültür
PAST	: Peynir altı suyu tozu
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RK	: Rennet kazein eklenerek liyofilize edilmiş kültür
rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	: Termogravimetrik analiz

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), yoğurt, peynir, turşu, fermente et ürünleri ve fermente içecekler gibi birçok fermente gıda üretiminde starter kültür olarak kullandıkları için gıda ve süt endüstrileri için son derece önemlidir (Doyle ve ark., 2013; Wang ve ark., 2020). *Lactobacillus plantarum*, fermente et ve sebze ürünlerinin üretimi için kullanılan en önemli laktik asit bakterilerinden biridir (Tiwari ve Srivastava, 2008). Sebze ve bitki fermantasyonlarından insan gastrointestinal sistemine kadar çeşitli ekolojik nişlerde bulunan çok yönlü bir bakteridir (Landete ve ark., 2010). Aynı zamanda da ekşi hamurdan en sık izole edilen ve en baskın laktobasil türlerinden bir tanesidir (Gobbetti, 1998; Iacumin ve ark., 2009). *L. plantarum*, üretim kolaylığı ve gastrointestinal sistemdeki yüksek performansı nedeniyle diğer laktik asit bakterilerine göre daha fazla avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, potansiyel bir probiyotik olduğu birçok yazar tarafından bildirilmiştir (Yoon ve ark., 2006; Georgieva ve ark., 2009; Zago ve ark., 2011; Janković ve ark., 2012; Park ve Lim, 2015; Corsetti ve ark., 2016)

Mikroorganizmaların uzun süreli muhafazası, gerek kültür koleksiyonları gerekse endüstrideki kullanımlar için büyük önem taşımaktadır. Ancak, doğadan izole edilen bakteri suşlarının, yapay besiyeri ve ortamlarda düzenli olarak alt kültürlenmesiyle genotipik ve fenotipik karakteristikleri değişebilmektedir. Bu nedenle, özgün türlerin başarılı bir şekilde korunması kültür koleksiyonları için önem arz etmektedir. Her mikroorganizma için özel bilgi gerektiren kültür muhafaza işlemlerinde uygulanan modern ve ileri tekniklerin maksimum canlılığı sağlayarak hücrelere minimum zarar vermesi ve hücrelerin karakteristiklerini koruması gerekmektedir (Malik, 1988a).

Mikrobiyoloji uygulamalarında ve endüstride oldukça önemli bir yere sahip olan dondurarak kurutma yöntemi (liyofilizasyon), mikroorganizma hücrelerinin, canlılık kaybı ve mutasyon riski olmadan yıllarca korunabilmesine olanak sağlamaktadır. Dondurarak kurutulmuş mikroorganizmaların en büyük avantajı hücre canlılığının yüksek ölçüde korunabilmesi ve ayrıca sevkiyat ve depolama bakımından kullanım kolaylığı sağlamasıdır. Dondurarak kurutma, kültür koleksiyonlarının oluşturulmasında, probiyotikler, biyopreservatifler ve biyokontrol ajanlarının üretimi gibi uygulamalarda ve ayrıca çeşitli gıda prosesleri için starter kültürlerin üretiminde kullanılan en ideal ve kullanışlı yöntemdir (Morgan ve Vesey, 2009).

Fermente gıda üretiminde önemli rolü olan laktik asit bakterilerinin kurutulmuş preparatları, uzun süreli muhafaza için oldukça avantajlı olup; depolama, pazarlama,

taşıma ve tüketimde kolaylık sağlamaktadır. Bu starter kültürlerin kurutma işlemi sonrasında ve depolama sırasında sahip olacağı maksimum düzeydeki canlılık, teknolojik ve ekonomik olarak hayati öneme sahiptir (Carvalho ve ark., 2003). Ancak, dondurarak kurutma sırasında, hücreler, canlılıklarını azaltan düşük sıcaklık ve düşük su aktivitesi gibi zorlayıcı çevresel koşullara maruz kalırlar (Palmfeldt ve Hahn-Hägerdal, 2000). Bu stres koşulları, hücrelerin biyolojik sistemlerinde hasarlar oluşturabilmektedir. Bununla birlikte, dondurma ve/veya kurutma sırasında canlılık gözlenirse bile, daha sonraki depolama işlemi sırasında canlılık kaybedilebilmekte ve bu da muhafaza teknolojilerinin nihai hedefini engellemektedir (Carvalho ve ark., 2003). Bakteri hücrelerinin kurutulmasından kaynaklanan başlıca hasar faktörleri, muhtemel membran hasarına bağlı ozmotik şok ve hücrelerdeki birçok hidrofilik makromolekülün özelliklerini etkileyen bağlı suyun uzaklaşması ile açıklanmaktadır. Uygun kriyoprotektanların varlığında dondurarak kurutulan bakteriyel hücrelerin canlılığının daha iyi koruyabildiği görülmüştür. Bu nedenle, LAB starterlerini kuruturken de, uygun hidrofilik katkıları ilave edilerek kritik düzeyde bağlı suyun tutulması sağlanmakta ve canlılık artırılabilir (Selmer-Olsen ve ark., 1999). Yağsız süt tozu, serum, trehaloz, gliserol, betain, adonitol, sükröz, glikoz, laktoz, dekstran, silikajel ve polietilen glikol gibi polimerler pek çok mikroorganizma için koruyucu ajan olarak kullanılabilir (Morgan ve ark., 2006). Ancak, bir katkı maddesinin sağladığı koruma, mikroorganizma türlerine göre değişebilmektedir (Costa ve ark., 2000). Aynı zamanda, kurutma sonundaki canlılık için en uygun büyüme fazının büyük ölçüde yine organizmaya bağlı olduğu bildirilmiştir (Morgan ve ark., 2006).

Mikrobiyal büyüme kinetiği, genel olarak canlı hücre aktivitelerinin gözlemlenmesidir. Hücre gelişiminin ve hücre metabolizmasındaki biyolojik ve biyokatalitik aktivitelerin izlenmesi, mikrobiyal davranışın anlaşılabilmesi ve biyoteknolojik süreçlerin tasarımı ve kontrolü için oldukça önemlidir (Najafpour, 2007; Rezvani ve ark., 2017). Mikrobiyal gelişme kinetiği üzerine yapılan çalışmalar, biyoteknolojideki ilerlemeleri sağlayan en etkili araçlardır.

Bu çalışmada, fermente ürünler için oldukça değerli sayılan ve probiyotik özelliği ile sağlık üzerinde birçok yararlı etkisi olan *L. plantarum* türünün, büyüme kinetiğinin ve biyokütle özelliklerinin araştırılması ve liyofilize kültürlerinin oluşturulması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda ekşi hamurdan izole edilen *L. plantarum*'un büyüme kinetiği ve biyokütle özelliklerinin belirlenerek, türün karakteristik davranışı ortaya konmuş ve dondurarak kurutma prosesinde kullanılan farklı kriyoprotektanların,

liyofile kültürlerin canlılığına ve fiziksel özelliklerine etkileri depolama boyunca araştırılmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Ekşi Hamur

2.1.1. Genel özellikleri

Ekşi hamur, laktik asit bakterileri (LAB) ile fermente edilmiş, laktik asit ve asetik asit oluşumu ile nihai ürünün ekşi bir tada sahip olduğu un ve su karışımıdır. Ekşi hamurlu ekmeğin üretimi çok eski zamanlara kadar uzanmaktadır. Ekşi hamur, genellikle hamur özelliklerini, ekmeğin dokusunu ve lezzetini iyileştirmek ve ekmeğin raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadır (De Vuyst ve Neysens, 2005).

Ekşi hamurun mayalama aracı olarak kullanılması, gıda üretimindeki en eski biyoteknolojik süreçlerden biridir. Son yıllarda tüketicilerin daha doğal, lezzetli ve sağlıklı gıdalara olan talebinin artmasıyla, geleneksel ekşi hamurlu ekmeğin üretimi yeniden popülerlik kazanmıştır. Geçmişte, hamur fermantasyonu doğal mayalar ve laktik asit bakterilerine dayanmaktaydı (Arendt ve ark., 2007). Yakın geçmişte, ekşi hamur kullanımı daha sistematik hale gelmiştir ve fermente hamurun bir kısmı daha sonraki kullanımlar için saklanarak mikrobiyal kültürler geliştirilmiş ve korunmuştur (Poutanen ve ark., 2009).

Ekşi hamur bir ara üründür ve metabolik olarak aktif halde bulunan maya ve LAB suşları içermektedir. Hamurda gelişen LAB, undaki doğal seçilmiş kontaminantlardan veya bilinen bir veya daha fazla LAB türünü içeren bir starter kültürden kaynaklanmaktadır. Mikrobiyolojik çalışmalar, ekşi hamurda, çoğunlukla *Lactobacillus* cinsine ait 50'den fazla LAB türünün ve özellikle *Saccharomyces* ve *Candida* cinslerine ait 20'den fazla maya türünün bulunduğunu ortaya koymuştur. Ekşi hamur mikroflorası, metabolik etkileşimlere bağlı olarak laktobasil ve mayaların dengeli bir ortaklığıyla oluşmaktadır. Ekşi hamur proseslerinde, fermantasyon işlemi aseptik olmayan koşullar altında yapılmasına rağmen, bu tür mikrobiyal ilişkiler yıllarca sürebilmektedir. Ekşi hamur mikroflorasının kontrollü ve tekrar üretilebilir bir bileşime sahip olması, aynı özelliklere sahip ekşi hamur ekmeği elde etmek için vazgeçilmezdir (De Vuyst ve Neysens, 2005).

LAB ve mayalar genellikle ekşi hamurlarda bir arada bulunurlar. Ekşi hamur fermantasyonlarında LAB hücre konsantrasyonunun 10^8 koloni oluşturan birim (kob)/g'ı aşması beklenmektedir. Genel bir kural olarak, LAB baskın mikroorganizmalardır, aynı

zamanda birçok durumda mayalar da önemli sayıda bulunmaktadır. Ekşi hamurdaki LAB:maya oranı genellikle 100:1'dir (De Vuyst ve Neysens, 2005). Başarılı fırıncılık uygulamalarında kullanılan başlangıç hamurunun, metabolik olarak aktif 10^7 - 10^9 kob/g arası LAB ve 10^5 - 10^7 kob/g civarında da maya içerdiği bildirilmiştir (Corsetti, 2013). Fermente gıdaların çoğunda homofermentatif LAB önemli bir rol oynamaktayken, özellikle geleneksel olarak hazırlanan ekşi hamurlarda heterofermentatif LAB baskındır. Heterofermantasyonun önemli bir son ürünü olan asetik asit, ekşi hamurun lezzetinde önemli bir rol oynamaktadır. *Lactobacillus* suşları, *Leuconostoc*, *Weissella* ve *Pediococcus* türlerinden daha sık bulunmaktadır. Laktokok, enterokok ve streptokoklar ise nadiren bulunmaktadır. Ekşi hamurlardaki (zorunlu) heterofermentatif laktobasillerin baskınlığı, bu belirli ortam içindeki rekabet yeteneklerine ve bu ortamlara adaptasyonlarıyla açıklanmaktadır (De Vuyst ve Neysens, 2005).

Tahıl fermantasyonlarında, mevcut mikroorganizmalar, metabolik aktiviteleri sırasında, tipik olarak orta sıcaklıklarda ve 24 saate kadar, tahıl bileşenleri ile etkileşime girmektedir. Laktik asit bakterileri laktik ve asetik asit üreterek ortamın pH'sını 5'in altına düşürürken, mayalar ise karbondioksit ve etanol üretirler. Mayalar ve laktobasiller arasındaki etkileşimler, ekşi hamurunun metabolik aktivitesi için önemlidir. Fermantasyon sırasında değişen koşullar, mevcut enzimlerin aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır. pH'ın ayarlanması ile amilaz, proteaz, hemiselülaz ve fitaz gibi belirli enzimlerin performansı seçici olarak artırılabilir. Enzime bağlı değişiklikler, mikrobiyal metabolitler ile birlikte, fermente tahıl gıdalarının teknolojik ve besinsel etkilerini ortaya çıkarmaktadır (Poutanen ve ark., 2009).

Lactobacillus sanfranciscensis (*L. brevis* subsp. *lindneri*), *L. plantarum* ve *L. brevis* ekşi hamurlardan en sık izole edilen laktobasillerdir. Başlangıçta *L. brevis* olarak sınıflandırılan bazı suşlar son zamanlarda yeni *L. pontis* türleri altında incelenmiştir (Gobbetti, 1998).

Ekşi hamur, fermente edilebilir karbonhidratlar açısından zengindir ve başlangıçta 5.0-6.2 gibi oldukça düşük bir pH'a sahiptir. Bu nedenle, uygulanan ekşi hamur üretim teknolojisine bağlı olarak, kullanılan tahıl veya unlardan spontane olarak gelen karakteristik LAB gelişimine olanak sağlamaktır. Bununla birlikte, geleneksel ekşi hamur prosesi, genellikle tesadüfi floraya bağlı olmayarak, tanımlanmış ve tipik bir hazırlık döngüsüyle uzun süreler boyunca sürekli olarak muhafaza edilmiş ön hamurların kullanımıyla gerçekleşmektedir. Burada bahsedilen ön hamur, daha sonra hazırlanacak olan hamurlar için doğal mikrobiyal aşılama materyalidir. Spontan fermantasyon

sırasında gelişen laktobasiller (homofermentatif *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. plantarum* ve heterofermentatif *L. brevis*, *L. buchneri* ve *L. fermentum*) ve pediokoklar (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), gram-negatif enterobakterilere hızla hâkim olarak, baskın hale gelmektedir. *Leuconostocs* ve *Weissella*, genellikle fermantasyonun ilk aşamasında rol oynamaktadır (De Vuyst ve Neysens, 2005).

2.1.2. Ekşi hamurların bazı teknik özellikleri

2.1.2.1. Yoğunluk (Kıvam)-Hamur verimi

Ekşi hamurların hamur yoğunlukları değişkenlik göstermektedir. Ekşi hamur fermantasyonu sert bir hamur veya sıvı bir un-su süspansiyonu olarak yapılabilmektedir. Un ve su arasındaki bu orana hamur verimi (HV) denmektedir ve aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır (Decock ve Cappelle, 2005):

$$\text{Hamur verimi} = \frac{\text{un miktarı} + \text{su miktarı}}{\text{un miktarı}} \times 100$$

Yukarıdaki formülden anlaşılacağı üzere, HV 160 olan bir buğday ekşi hamuru sert bir hamurken, HV 200 olan ise sıvı bir hamurdur. Bir hamurun HV değeri, hamurun lezzet profilini önemli ölçüde etkilemektedir. Sert ekşi hamurlarda (düşük HV değeri) daha fazla asetik asit ve daha az laktik asit üretimi olmaktadır. Laktik asidin aroması oldukça yumuşaktır ve geç algılanır; asetik asit ise hemen algılanan keskin bir asidik tada sahiptir. Asidifikasyon oranı da ekşi hamurunun hamur veriminden etkilenmektedir. HV ne kadar yüksek olursa, üretilen organik asitlerin muhtemelen ortama daha iyi yayılması nedeniyle asitlenme de o kadar hızlı gerçekleşmektedir (Decock ve Cappelle, 2005).

2.1.2.2. Sıcaklık

İkinci önemli parametre fermantasyon sırasındaki uygulanan sıcaklıktır. Aslında sıcaklığın, asitlenme oranı üzerine etkisi hamur veriminden daha fazla olmaktadır. Ayrıca sıcaklığın ekşi hamurun mikrobiyal bileşimi üzerinde de etkisi bulunmaktadır (Decock ve Cappelle, 2005). Hazırlana hamur partisinden bir miktar hamurun ayrılarak bir sonraki fermantasyonda kullanıldığı “back-slopping” yönteminde, sıcaklık kritik bir rol oynamaktadır. Eğer sıcaklık kontrol edilmezse mikrofloranın bir kısmı yeni oluşturulan

hamurda kaybolabilir. Optimum gelişme sıcaklığı Laktobasiller için 25-27°C arasında, mayalar için ise 30-40°C aralığındadır. Genel olarak, daha yüksek bir sıcaklık, daha yüksek bir su içeriği ve kepekli un kullanımı ekşi hamurdaki asit üretimini arttırmaktadır (Chavan ve Chavan, 2011).

2.1.2.3. Titrasyon asitliği ve pH

Ekşi hamur fermantasyonu sırasında hamurun titrasyon asitliği ve pH'sı oldukça önemlidir. Fermantasyonun başında, hem asitlik hem de pH sabit kalırken, fermantasyonun ilerlemesi sonucu gelişen maya aktivitesi nedeniyle titrasyon asitliği artmaktadır. Uzun süreli fermantasyonlarda, maya mevcudiyeti sonlanır ve bu aşamada titrasyon asitliği ve pH hamurda bulunan LAB'ne bağlı olmaktadır. Ekşi mayada bulunan mayalar laktik asitten daha az etkilenirken, asetik asitten çok daha fazla etkilenmektedir (Chavan ve Chavan, 2011)

2.1.2.4. Substrat

Ekşi hamur fermantasyonu için kullanılan substratlar, bilhassa un, ekşi hamuru önemli ölçüde etkileyen bir başka parametredir. Kepek içindeki kül miktarı endosperminkinden yaklaşık 20 kat daha fazla olduğu için unun sınıfını ve ekstraksiyon oranını belirleyebilmek için kül miktarı önem arz etmektedir. Kepek fraksiyonu, LAB'nin büyümesi için önemli olan daha fazla mineral ve mikro besin içermektedir. Kül ayrıca, ekşi hamur sisteminin tamponlama kapasitesini de etkilemekte, bu da daha yüksek bir toplam titrasyon asitliğine ulaşmayı mümkün kılmaktadır. Unun enzimatik aktivitesinin bir göstergesi olan düşme sayısı değeri ne kadar düşük olursa unda bulunan amilaz aktivitesi de o kadar fazla olmaktadır. Bunun nedeni ise mikrofloranın substrat olarak kullanabileceği daha fazla serbest şeker bulunmasıdır (Decock ve Cappelle, 2005; Chavan ve Chavan, 2011).

2.1.3. Ekşi hamurların sınıflandırılması

Ekşi hamurlar, üretimlerinde uygulanan teknoloji türüne göre üç tip altında sınıflandırılmaktadır (De Vuyst ve Neysens, 2005):

- Tip I ekşi hamur (geleneksel ekşi hamur);
- Tip II ekşi hamur (hızlandırılmış ekşi hamur);
- Tip III ekşi hamur (kurutulmuş ekşi hamur).

2.1.3.1. Tip I ekşi hamurlar

Tip I ekşi hamurlar geleneksel tekniklerle üretilmektedir ve mikroorganizmaları aktif bir durumda tutabilmek için sürekli, günlük tazeleme işlemine gereksinim duyulmaktadır. İşlem, ortam sıcaklığında (20-30°C) gerçekleştirilmekte ve pH'sı yaklaşık 4.0 civarında olmaktadır. Bu ekşi hamurlar, ekşi hamur için tipik olan ve iyi adapte olmuş bir mikrofloradan oluşmaktadır. Stabil bileşimi korurlar, yüksek bir ekşime aktivitesine sahiptirler ve mikrobiyal kontaminasyona karşı dirençlidirler. Geleneksel olarak, buğday ve çavdar ekşi hamurlarının üretiminde 3-48 saat arasındaki fermantasyon süreleri kullanılmaktadır. Ön hamur veya starter tamamen geliştiğinde, sonraki ekme hamuru partisi için aşı görevi görmektedir. Mikrofloranın sürekliliği, önceki bir partiden ayrılan bir kısım hamurun, yeni bir partiye ardışık olarak yeniden aşılmasıyla (back-slopping) sağlanmaktadır. Mikroflora, hamurun asitlenmesinde ve mayalanmasında, ayrıca aroma oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (De Vuyst ve Neysens, 2005).

2.1.3.2. Tip II ekşi hamurlar

Ekme üretimlerinin sanayileşmesi sonucunda daha hızlı, daha verimli, kontrol edilebilir ve büyük ölçekli mayalama işlemlerine yönelik endüstriyel talep tip II ekşi hamurların geliştirilmesine vesile olmuştur (De Vuyst ve Neysens, 2005). Tip II ekşi hamurlar, fermantasyonu başlatmak üzere adapte olmuş suşların kullanıldığı endüstriyel bir maya türüdür. Bu ekşi hamurlar genellikle sıvı formdadır ve endüstriyel fırınlarda kolaylıkla pompalanabilmektedir (Decock ve Cappelle, 2005). Esas olarak hamur asitlendirici olarak işlev görmektedir. Tip II ekşi hamur oluşumu 2-5 gün sürmektedir, ancak işlemi hızlandırmak için genellikle yüksek fermantasyon sıcaklıkları (genellikle >30°C) uygulanabilmektedir. Bu ekşi hamurlar 24 saatlik fermantasyon sonunda yüksek bir asitliğe ulaşmakta ve pH'ları 3.5'a düşmektedir. Mikroorganizmalar genellikle geç durağan fazdadır ve bu nedenle sadece sınırlı metabolik aktivite sergilerler. Yüksek hamur verimine sahip olmaları, hamurun pompalanmasına izin vermektedir. Yerel fırınlarda da sıklıkla kullanılmaktadırlar. Kullanıma kadar taze kalabildiğinden (bir

haftaya kadar), büyük miktarlarda üretilebilirler. Endüstride, kurutulmuş hamur mayası ürünlerinin üretimi için de uygulanmaktadır (De Vuyst ve Neysens, 2005).

2.1.3.3. Tip III ekşi hamurlar

Tip III ekşi hamurlar, tanımlı starter kültürler tarafından başlatılan toz formunda kurutulmuş ekşi hamurlardır. Ekmek yapımında asitlendirici takviye ve aroma taşıyıcı olarak kullanılırlar. Çoğunlukla heterofermentatif *L. brevis* ve fakültatif heterofermentatif *P. pentosaceus* ve *L. plantarum* suşları gibi kurutmaya dirençli ve bu formda hayatta kalabilen LAB içerirler. Kurutma işlemi (püskürtmeyle kurutma veya tamburlu kurutma) ayrıca mayalı hamurun raf ömrünün uzamasına yol açar ve kültürü tekrar kullanılincaya kadar bir stok ürününe dönüştürür. Kurutulmuş ekşi hamurlar kullanım kolaylığı ve standart nihai ürünler elde edilebilmesi nedeniyle endüstriyel fırınlar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir (De Vuyst ve Neysens, 2005).

2.2. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), yoğurt, peynir, turşu, fermente et ürünleri ve içecekler gibi birçok fermente gıda üretiminde starter kültür olarak kullanıldığından süt ve pek çok gıda endüstrisi için son derece önemlidir (Doyle ve ark., 2013; Wang ve ark., 2020). LAB, yaygın metabolik ve fizyolojik özellikleri paylaşan Gram-pozitif, aside dayanıklı, genellikle spor oluşturmeyen, anaerobik, çubuk veya kok şeklindeki bakterilerdir (Lorenzo ve ark., 2018). LAB, insan gastrointestinal sistemi ve mikroflorası içinde faydalı etkileşimlere giren probiyotikleri içeren önemli bir bakteri grubudur. Yeterli miktarda tüketildiklerinde pek çok sağlık faydası sağlayabilirler (Mis Solval ve ark., 2019). Aynı zamanda laktik asit bakterilerinin, doğal gıda koruyucusu olarak kullanılan antimikrobiyal bileşiklerden bakteriyosinleri de ürettiği bilinmektedir (Tiwari ve Srivastava, 2008).

LAB arasında gıda endüstrisi için ekonomik açıdan en önemli bakteri gruplarından biri *Lactobacillus* cinsidir (Mis Solval ve ark., 2019). Laktobasiller, insanlığın ilk günlerinden beri normal insan diyetinin bir parçası olmuştur. Bugün, laktobasiller birçok farklı gıdada bulunmakta ve gıda güvenliğinin sağlanması konusunda mükemmel bir geçmişe sahiptirler. Gıda fermantasyonlarında starter kültürler olarak kullanılmalarının yanı sıra probiyotik olarak kullanımları da söz konusudur. Laktobasiller

birçok fermente gıdada, özellikle yoğurt, peynir ve fermente süt gibi süt ürünlerinde bulunmaktadır. Kore kimçisi ve Kafkas kefir gibi birçok geleneksel ve bölgesel fermente ürünler, aralarında *Lactobacillus* suşlarının da bulunduğu LAB ile fermente edilmektedir. Laktobasiller, turşu ve salamura gibi sebze fermantasyonlarında da önemli starter kültürlerdendir ve ekşi hamur ekmeği yapımında kullanılmaktadır. Laktobasillerden *L. sakei* genellikle fermente et ürünlerinde kullanılmaktadır. Bira ve şarap gibi alkollü içeceklerde, laktobasiller ürünün lezzetine katkıda bulunabildiği gibi aynı zamanda kontaminant olarak da yer alabilmektedir. Yukarıda bahsedilen insan diyetinde yer alan fermente gıdalara ek olarak, *Lactobacillus* fermantasyonu hayvan yemlerinde de kullanılmaktadır. *L. plantarum* ve *L. buchneri* gibi türler, fermente bir hayvan yemi olan silaj üretiminde kullanılmaktadır (Ibrahim ve Ouwehand, 2019).

Probiyotik laktobasillerin, diyet takviyesi olarak ticari kullanımları da mevcuttur. Yaygın olarak kapsül veya şase içerisinde ve probiyotik gıdaların içerisinde sunulmaktadır. Probiyotik gıdalar yoğurt gibi fermente gıdalarda ya da probiyotik dondurma, probiyotik atıştırmalıklar ve probiyotik meyve suları gibi fermente edilmemiş gıda ve içeceklerde de kullanılmaktadır. Klinik olarak belgelenmiş probiyotik *Lactobacillus* suşları arasında; *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* La-5, *L. casei* Shirota, *L. casei* DN-114 001, *L. reuteri* DSM 17938, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* HN001, *L. rhamnosus* GR-1, *L. paracasei* F19 ve *L. plantarum* 299v bulunmaktadır (Ibrahim ve Ouwehand, 2019)

LAB'nin taksonomisi, metabolizması ve moleküler biyolojisinin kapsamlı bir şekilde anlaşılması, oluşabilecek potansiyel risklerin önlenerek, teknolojik, beslenme ve sağlığı geliştirici yönlerinin tam olarak kullanabilmesi bakımından oldukça önemlidir (von Wright ve Axelsson, 2019). Ayrıca bu mikrobiyolojik araştırmaların sürekliliği için bakteriyel stok kültürlerinin canlılığını ve biyokimyasal özelliklerinin korunması en temel gerekliliktir (Suslow ve Schroth, 1981). Endüstriyel üretimlerde yaygın olarak kullanılan liyofilize LAB toz kültürleri halen *Lactobacillus* spp.'nin stabilitesini korumak için en etkili yöntem olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2020).

2.2.1. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum, sebze ve bitki fermantasyonlarından insan gastrointestinal sistemine kadar çeşitli ekolojik nişlerde bulunan çok yönlü bir bakteridir. Suşları fakültatif anaerobik ve Gram pozitifdir. *L. plantarum* hücreleri yuvarlak uçlu,

genellikle 3–8 µm uzunluğunda ve 0.9–1.2 µm genişliğinde çubuk şeklindedir. Hücrelerin mikroskopik görünümü, tek tek, çift veya kısa zincirler halinde, kamçısız ve hareketsiz çubuklar şeklindedir. Optimum büyüme sıcaklığı 30–35°C aralığındadır. Asit ve tuza karşı güçlü toleransı nedeniyle meyve ve sebzelerin fermantasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Hammes ve Vogel, 1995; Landete ve ark., 2010; Corsetti ve ark., 2016; Mao ve Yan, 2019). *L. plantarum*, fakültatif heterofermentatiftir; glikozu D ve L-laktik aside homofermentatif yolla, 5-karbonlu şekerleri ise D ve L-laktik asit ve asetik aside heterofermentatif olarak fermente etmektedir (Leifert ve ark., 1989).

L. plantarum, genetik olarak diğer *Lactobacillus* spp. ile karşılaştırıldığında 3.3 Mbp büyüklüğünde nispeten büyük bir genomu sahiptir (Darby ve Jones, 2017). Bu genom uzunluğunun *L. plantarum* tarafından deneyimlenen çeşitli çevresel nişlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Landete ve ark., 2010).

L. plantarum çoğunlukla fermente bitkisel gıdalarda kullanılmaktadır (Darby ve Jones, 2017). Diğer laktik asit bakterilerinden daha yüksek asit toleransına sahip olan *L. plantarum*'un, meyve ve sebzelerin fermantasyonunu tamamladığı bildirilmektedir (Fleming, 1984; Lu ve ark., 2003). Salatalık, lahana ve zeytin fermantasyonunda sıklıkla kullanılan ticari bir starter kültürdür. Özellikle *L. plantarum* ve *L. pentosus*, zeytin fermantasyonunda starter olarak kullanılan ana türlerdir (Hurtado ve ark., 2008). *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis* (*L. brevis* subsp. *Lindneri*) ve *L. brevis* ile birlikte ekşi hamurdan izole edilen en yaygın laktobasillerden biridir (Gobbetti, 1998). Ekşi hamurda *L. plantarum*, *L. brevis*, *Weissella cibaria* ve *Pediococcus pentosaceus* gibi LAB türlerinin baskın olduğu bildirilmiştir (Iacumin ve ark., 2009).

Birçok araştırmacı tarafından *L. plantarum*'un potansiyel bir probiyotik olduğu bildirilmiştir (Yoon ve ark., 2006; Georgieva ve ark., 2009; Zago ve ark., 2011; Janković ve ark., 2012; Park ve Lim, 2015). Probiyotik olarak kullanımının yanı sıra üretim kolaylığı, gastrointestinal sistemdeki olumlu etkileri ve genom diziliminin tamamına (*L. plantarum* WCFS1) genetik veri tabanlarından ulaşılabilir olması nedeniyle diğer LAB'lerine göre daha fazla tercih edilebileceği ileri sürülmüştür (Corsetti ve ark., 2016). *L. plantarum* gastrointestinal sistemin normal bakteri florasının bir üyesidir. Sıklıkla insan bağırsak lümeninden izole edilmektedir. Midenin düşük pH'ında ve onikiparmak bağırsağında canlı kalabilen, ince bağırsaktaki safra asitleri etkisine dirençli, bağırsak ve kolon mukozasına tutunarak gastrointestinal sistemde geçici olarak bulunan bir tür olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, *L. plantarum*'un enteral alımı ile *Veillonella* spp. ve *Clostridia* spp. gibi gaz üretme kabiliyetine sahip bakteri gruplarını azalttığı da görülmüştür. Tüm

laktik asit bakterileri, konakçı için sağlık yararı sağlama yeteneğine sahip değildir. Bu nedenle, ideal probiyotikler elde etmek için çok sayıda suşu taramak ve karakterize etmek gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinin probiyotik kapasitelerini ispatlayan in vitro ve in vivo testler, akademik ve endüstriyel çevreler için ilgi odağı olmaktadır. Hali hazırda bazı *L. plantarum* suşları, tek başına veya sinbiyotik formülasyonlarda probiyotik olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. *L. plantarum*'un huzursuz bağırsak sendromu, kardiyovasküler hastalıklar, solunum yolu enfeksiyonları, pankreatik ve jinekolojik etkiler, gastrointestinal sistemdeki bağışıklık modülasyonu ve metabolik ve dermatolojik etkiler üzerine pek çok pozitif etkisi olduğu bildirilmiştir. Hastalık durumlarında kullanımı ile *L. plantarum*'un etkinliğini gösteren kapsamlı bir araştırmada herhangi bir yan etki bildirilmemiştir. Bilhassa mide ve onikiparmak bağırsağı geçişindeki etkili canlı kalma yeteneği, *L. plantarum*'u klinik kullanım için çok çekici bir probiyotik adayı yaptığı belirtilmiştir (Darby ve Jones, 2017).

Organik asit üretimlerinin yanı sıra LAB, diğer mikroorganizmalara karşı aktiviteye sahip birçok inhibitör bileşik üretebilmektedir. Bunlardan bakteriyosinler, fenil laktik asit, peptitler ve yağ asitleri en aktif olanlardır ve gıdalar için biyokoruma sağlamaktadırlar (Corsetti ve ark., 2016). *L. plantarum* suşlarının, plantarisin A, B, C, C19, F, S, T, LC74, SA6 ve 149 gibi çok çeşitli bakteriyosin ürettiği tanımlanmıştır (Tiwari ve Srivastava, 2008). Plantarisinlerin üretimi pH ve sıcaklığa bağlıdır, maksimum verim üretici suşların genellikle nötr pH'da ve 30°C'de inkübe edilmesiyle elde edilmektedir. Bakteriyosin üreten *L. plantarum* suşları, tahıllar, maya, şarap, et ve süt ürünleri gibi çeşitli bitkisel ve hayvan matrislerinden izole edilmiştir (Corsetti ve ark., 2016).

Fenilalanin katabolizmasından türeyen fenil laktik asit ve 4-hidroksifenillaktik asit, *L. plantarum* dâhil olmak üzere bazı *Lactobacillus* türleri tarafından üretilen antifungal bileşiklerden en bilinenleridir. Bu bileşikler *Fusarium* spp. ve *Penicillium* spp. türlerine karşı ve *Aspergillus niger*'in miselyum gelişimini inhibe edici aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Fenil laktik asidin yanı sıra, kıımızdan izole edilen *L. plantarum* IMAU10014 suşundan ekstrakte edilen benzene asetik asit ve 2-propenil ester, geniş spektrumlu antifungal bileşikler olarak tanımlanmıştır (Corsetti ve ark., 2016).

LAB ayrıca yüksek miktarlarda ve çok çeşitli homo- ve hetero-ekzopolisakkaritler (EPS) üretmektedir. Bu bileşikler, doku, viskozite ve stabiliteyi geliştirmesi nedeniyle güvenli katkı maddeleri olarak fermente süt ürünlerinin imalatında önemli bir rol oynamaktadır. LAB tarafından üretilen EPS'ler, fermente gıda preparatlarının ağız

hissini, dokusunu ve reolojisini iyileştirmede önemli rol oynar (Corsetti ve ark., 2016). *Lactobacillus* türleri tarafından üretilen EPS'ler, su absorpsiyonuna yardımcı olarak yapının iyileşmesine katkı sağladığından ekşi hamur özelliklerini geliştirmekte ve fermente gıdaların raf ömrünü uzatmaktadır. Yine LAB türlerinden üretilen EPS'lerin antioksidan aktivitelere sahip olduğu ve toksik olmadığı, dolayısıyla da sentetik antioksidanların yerini alabileceği için büyük öneme sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca gıda katkı maddesi prebiyotik olarak kullanımının yanı sıra, antikanserojen, antitümör (tümör oluşumunu engelleyici), immünomodülatör aktivitesi ve kan kolesterolünü düşürücü etkisiyle fizyolojik de pek çok fayda sağlamaktadır (Adesulu-Dahunsi ve ark., 2018).

Bakteriyel EPS'lerin biyosentezi karmaşık ve kararsızdır ve çok sayıda gen görev almaktadır. EPS'leri kodlayan genleri karakterize etmek için kullanılan moleküler yaklaşımlar sonucu, *L. plantarum* için glikozil transferaz geninin sorumlu olduğu bulunmuştur. *L. plantarum*, genellikle büyümenin eksponansiyel fazı sırasında EPS üretmekte ve durağan fazın başlangıcında maksimum miktara ulaşmaktadır. Bazı *L. plantarum* suşları, moleküler ağırlığı ve şeker bileşimi bakımından farklılık gösteren birden fazla EPS türü üretebilmektedir. Yapılan bir çalışma ile, *L. plantarum* EP56 suşunun sırasıyla N-asetil galaktoz amin ve ramnoz içeriği farklılık gösteren 8.5×10^5 ve 4×10^4 Da'luk iki polimer ürettiğini ortaya koymuştur (Corsetti ve ark., 2016).

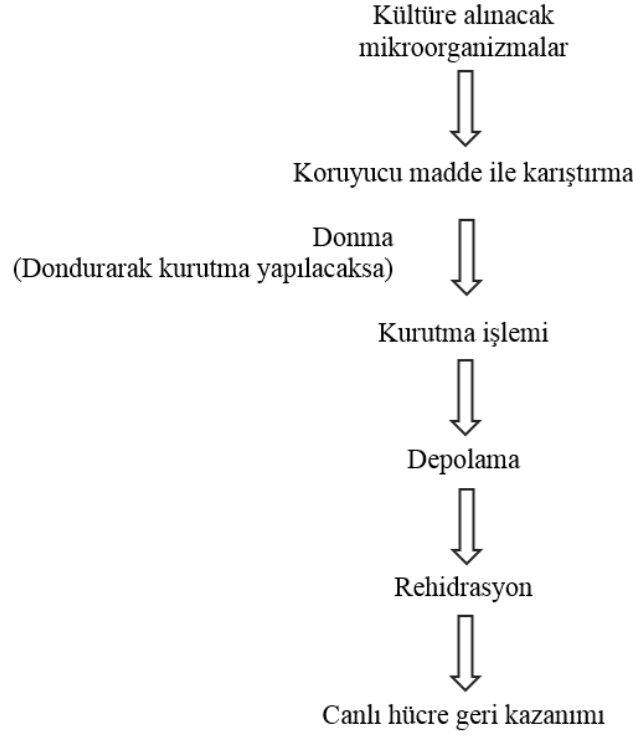
2.3. Kültür Korumanın Önemi

Çeşitli kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların muhafazası, mikrobiyoloji ve biyoteknoloji gibi birçok araştırma ve klinik bilim alanı için önemlidir. Mikroorganizmaları uzun süre yaşayabilir bir durumda muhafaza edebilmek, ulusal ve laboratuvar tabanlı mikrobiyal kültür koleksiyonlarının oluşturulması, endüstriyel kullanımlar ve mikroorganizma karışımları içeren numunelerin nakledilebilmesi için önemlidir. Tüm bu durumlarda, mikroorganizmaların özgünlüğünü, canlılığını ve üreme etkinliğini korumak ise mikrobiyoloji ve biyoteknolojinin temelini oluşturmaktadır (Malik, 1988a; Hays ve ark., 2005). Ancak mikroorganizmaların izolasyonu, karakterizasyonu, seçilmesi, araştırılması, geliştirilmesi ve patentlenmesi gibi prosesler oldukça yüksek maliyetler gerektirmektedir (Malik, 1988a). Ayrıca, bakteri suşlarının yaygın olarak kullanılan uygun bir kültür ortamına tekrar tekrar transfer edilmesiyle, büyük bir zaman, malzeme ve emek kaybının yanı sıra, belirli biyolojik, immünolojik ve

kültürel özelliklerin yitirilmesi de söz konudur (Morton ve Pulaski, 1938). Kültürlerin muhafazasının temel amacı, biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik, genetik vb. özelliklerinde değişme olmadan canlılıklarını koruyabilmektir (Malik, 1988b). Bu nedenle kısa ve uzun süreli muhafaza teknikleri tercih edilerek, rutin olarak kullanılmaktadır (Suslow ve Schroth, 1981).

Muhafaza tekniğinin belirlenmesinde, kültürlerin sürdürülebilirliği ve canlı kalma süresi rol oynamaktadır. Hâlihazırda, mikroorganizmaların depolanması için kullanılan yöntemlerin çoğu, özel depolama sistemleri, dayanıklı teknik ekipmanlar, önemli bilgi birikimi ve genellikle düşük sıcaklıktaki kontrollü ortamlar gerektirmektedir. Bu yöntemler genel olarak etkili olmakla birlikte, çoğunlukla pahalı, teknik açıdan zorlayıcı ve insan gücü yoğun yöntemlerdir (Hays ve ark., 2005).

Mikroorganizmaların kurutulularak korunması, kültürlerin uzun süreli depolanması için yıllar boyunca tercih edilen yöntem olmuştur. Hücre çeşitliliğini korumak amacıyla, bu kurutma yöntemleri kullanılarak oluşturulmuş kapsamlı kültür koleksiyonları mevcuttur. Kültür koleksiyonlarına ek olarak, gıda ve ilaç endüstrileri çok sayıda farklı gıda ve ilaç preparatında büyük ölçeklerde kullanmak üzere kurutma teknolojilerini tercih etmektedirler. Endüstride mikroorganizmaların sıvı kültür halinde kullanıldığı birçok uygulama vardır. Farmasötik, gıda, içecek ve sağlık gibi birçok endüstride mikrobiyolojik testler yapılmaktadır ve bu testlerin kalite kontrolü sırasında referans mikrobiyal suşların pozitif kontrol örnekleri kullanılmaktadır. Probiyotikler ve biyokontrol ajanları gibi gelişmekte olan alanlarda da mikroorganizmaların korunması önemlidir. Bu gibi nedenlerden dolayı, bakteri suşlarının ortam sıcaklıklarında sevkiyatı sırasında stabil kalabilmesi için kurutma tekniklerinden faydalanılmaktadır (Morgan ve ark., 2006). Kurutulmuş hücreler, depolama ve dağıtım sırasında düşük sıcaklıklar gerektirmediğinden önemli bir avantaja sahiptir ve bu nedenle daha ekonomik hale gelmektedir (Costa ve ark., 2000). Mikroorganizmaları kurutmak için birkaç farklı yöntem olmasına rağmen, ana hatlarıyla kurutma yöntemleri Şekil 2.1'de şematize edilmiştir:



Şekil 2.1. Genel bir kurutma prosesi (Morgan et al., 2006)

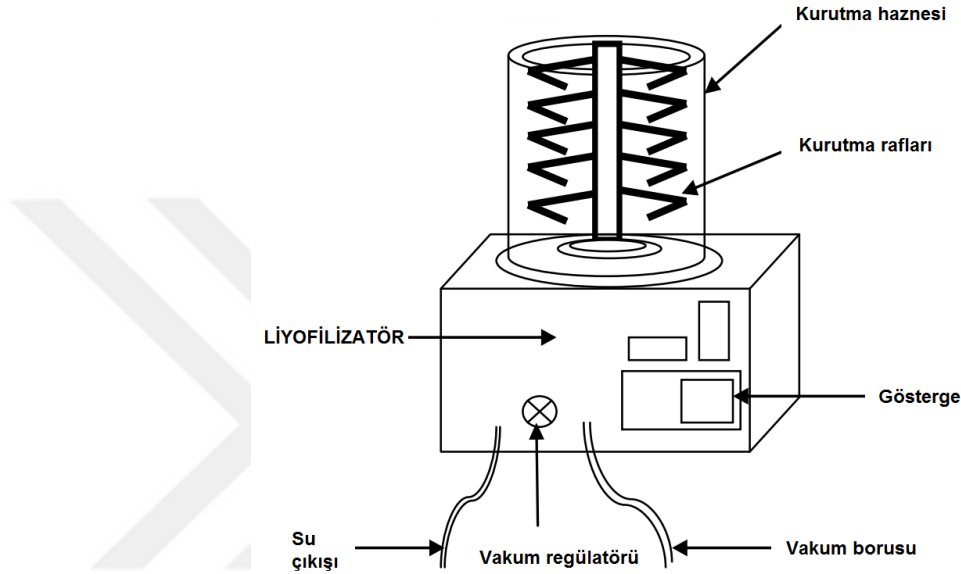
2.4. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon)

Dondurarak kurutma veya liyofilizasyon, mikroorganizmaların korunması ve uzun süreli saklanması için uygun bir yöntemdir (Malik, 1988b). Uzun vadede oldukça başarılı bir canlılık oranı sağlaması, depolama ve dağıtım işlemlerinin kolay olması gibi nedenlerden ötürü mikroorganizmaların korunmasında kullanılan en popüler yöntemlerden biridir (Miyamoto-Shinohara ve ark., 2000). Dondurarak kurutma yönteminin en belirgin özelliği, hücre yapısında minimum düzeyde bir büzülme neden olması ve kolayca rehidre edilerek tamamen çözünür hale gelmesidir. Ayrıca, süt ve gıda fermantasyonlarında yer alan laktik asit starter kültürlerini muhafaza etmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Costa ve ark., 2000).

Dondurarak kurutma işlemi sonrasındaki mikrobiyal hücre canlılığı, kültürün yaşı (Malik, 1988b), başlangıç konsantrasyonu (Bozoğlu ve ark., 1987), büyüme fazı ve büyüme koşulları, koruyucu ajanlar, rehidrasyon ve depolama koşulları gibi birçok faktöre bağlıdır (Costa ve ark., 2000; Morgan ve ark., 2006). Ayrıca, dondurarak kurutma işleminde gram-pozitif bakterilerin canlı kalma oranının, gram-negatif bakterilere göre genellikle daha fazla olduğu bilinmektedir (Malik, 1988b).

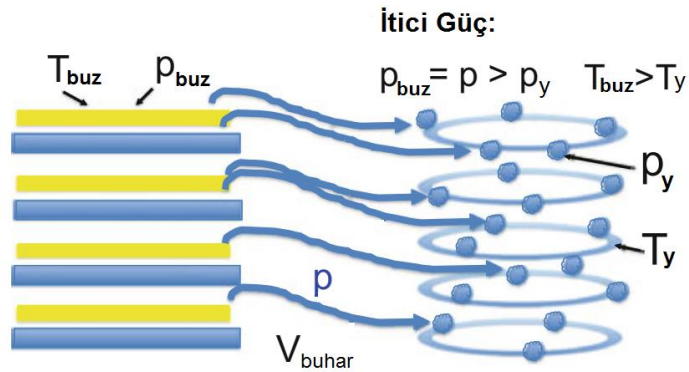
2.4.1. Dondurarak kurutma prosesi

Dondurarak kurutma (liyofilizasyon), materyal içindeki suyun dondurulmasının ardından, düşük basınç koşullarında süblimleştirilmesi sonucu oluşan su buharının soğuk bir yüzey üzerinde tekrar buz olarak yoğunlaştırıldığı bir kurutma yöntemidir. Şekil 2.2’de örnek bir liyofilizatör görülmektedir.



Şekil 2.2. Örnek bir liyofilizatörün şematik gösterimi (Maisnam ve ark., 2017)

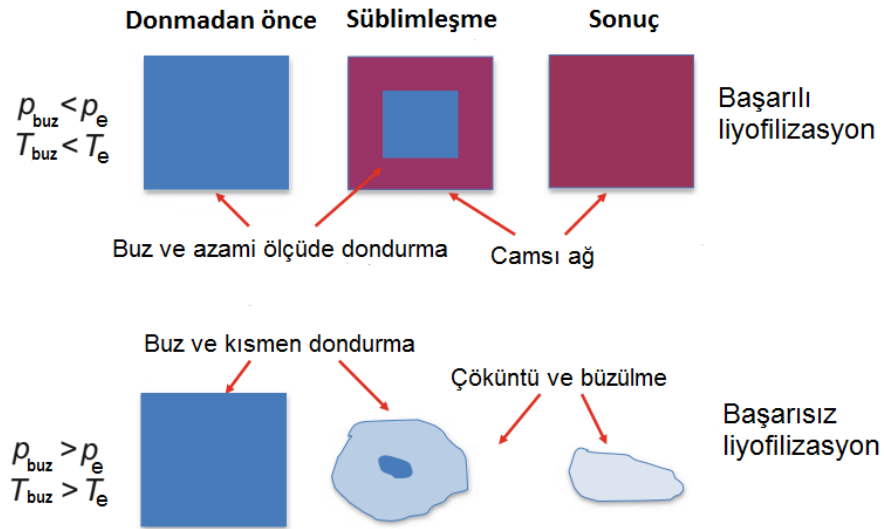
Bu koşullar, sıcaklığın düşürmesiyle veya buzun sıcaklığını kontrol etmek için kurutma haznesinin basıncını düşürecek bir vakum teçhizatı kullanılarak oluşturulmaktadır. Dondurarak kurutma işlemi Şekil 2.3’de açıklanmaktadır (Roos ve ark., 2017).



Şekil 2.3. Dondurarak kurutma prosesinin prensibi

Kurutma haznesinin basıncını (p) 1 mbar'ın altına düşürmek için vakum ekipmanı kullanılmaktadır. Bu gibi durumlarda, buz sıcaklığı (T_{buz}) çevredeki basıncın doğrudan bir fonksiyonudur. Öte yandan, yoğuşma (kondenser) yüzeyinin (T_y) sıcaklığını, süblimleşen buzunun sıcaklığının altına düşürmek için soğutma ekipmanı kullanılmaktadır. Böylece, kurutulan materyaldeki buzun buhar basıncının (p_{buz}) kondenser yüzeyinde (p_y) bulunandan daha yüksek olması sağlanmaktadır. Bu nedenle, buhar basıncı farkı ($\Delta p = p_{buz} - p_y$) süblimleşme için itici güç olarak tanımlanmaktadır. Δp 'deki artış, dondurarak kurutma işlemini hızlandırmaktadır (Roos ve ark., 2017).

Başarılı bir dondurarak kurutma işleminde, süblimleşme sırasında erimeyi önlemek için buharlaşma sıcaklığının, su-çözünen fazın erime sıcaklığından (T_e) daha düşük olması gerekmektedir. Başarılı ve başarısız bir dondurarak kurutma işleminde oluşan koşullar Şekil 2.4'te gösterilmektedir. Malzemeye uygulanan harici ön-dondurma aşamasında, donma esnasında arzu edilen boyutta buz kristalleri oluşumu ve donmayan katı fazın çevresinde bir dış duvar oluşumu sağlanmalıdır. Daha sonra, liyofilizatöre malzeme konana kadar $T_{buz} < T_e$ olmasını sağlamak için, buz sıcaklığı, erime sıcaklığının çok altına düşürülmeli ve buna karşılık gelen $p_{buz} < p_e$ buz buharı basıncı sağlanmalıdır. Aksi halde, buz eriyerek sıvı faz oluşmaya başlar ve donmamış su-çözünen faz içerisinde viskoz akışa neden olur. Bu koşullar, kurutma malzemesinin yapısının büzülmesine ve çökmesine neden olmakla birlikte, sıklıkla zayıf dehidrasyon yeteneğine ve kalite kaybına yol açar (Roos ve ark., 2017).



Şekil 2.4. Dondurarak kurutma işleminin kontrolü

2.4.2. Mikroorganizmaların dondurarak kurutulması

Tipik dondurarak kurutma işlemi üç adımdan oluşur (Fonseca ve ark., 2015):

- (1) Koruyucu içeren konsantre hücre süspansiyonunun dondurulması,
- (2) Buzun süblimleşerek uzaklaştırıldığı birincil kurutma ve
- (3) Donmamış suyun desorpsiyon yoluyla uzaklaştırıldığı ikincil kurutma.

Donma ile birlikte sıvı hücre süspansiyonu, bir buz ve çözünmüş madde karışımına dönüşmektedir. Donma işleminde, suyun çözeltiden buz kristalleri formunda uzaklaştığı düşünülürse “kurutmaya” benzemektedir. Bir hücrenin sitoplazması genellikle -10 ila -15°C'ye kadar donmamış halde kalır. Bu nedenle, donma sırasında ilk önce genellikle hücre dışı buz kristalleri oluşmaktadır. Bunun sonucunda, hücre dışı ozmotik basıncın yüksek olması nedeniyle hücresel suyun dışarı doğru göç etmesi söz konusudur (Santivarangkna ve ark., 2011).

Teorik olarak her bir LAB suşu için optimum bir soğutma hızı belirlenebilse de, bu yaklaşım genellikle çok zahmetlidir ve çok fazla zaman almaktadır. Uygulamada, konsantre hücre süspansiyonunu yavaş dondurmak için genellikle bir dondurucu (-30 veya -40°C) veya derin dondurucu (-80°C) kullanılırken, hızlı dondurmak için ise kuru buz-alkol karışımına (-78°C) veya sıvı azota (-196°C) daldırma işlemleri uygulanmaktadır (Santivarangkna ve ark., 2011).

Dondurarak kurutma işleminde, başlangıçta numune dondurulmakta ve içinde su süblimleştirilerek veya doğrudan bir vakum altında buzdan buhara dönüştürülerek kurutulmaktadır. Süblimleşme aşamasında, iyi özelliklere sahip bir ürün elde edebilmek için numune donmuş halde kalabilmelidir. Ön-dondurma sıcaklığı yeterince düşük olmazsa, numune tamamen donmayacak ve bir vakum altında süblimleşme işlemi sırasında kabarmaya ve köpüklenecektir. Bununla birlikte, aşırı düşük bir ön-dondurma sıcaklığı ise enerji tüketimini arttırmanın yanı sıra, dondurarak kurutmadan sonra bazı mikroorganizmaların canlılık oranlarını azaltmaktadır (Wang ve ark., 2020).

Dondurarak kurutulmuş laktik asit bakterilerinin inaktivasyonu, çoğunlukla dondurma adımıyla gerçekleşmektedir. Donma esnasındaki inaktivasyon mekanizmaları soğutma hızına bağlıdır. Soğutma hızı çok düşük olduğunda, hücre, içi ve dışı arasındaki ozmotik dengeyi sağlayana kadar hızla su kaybederek dehidrasyona uğramaktadır. Soğutma hızı çok yüksek olursa, hücreler hızlı bir şekilde su kaybedemezler, ancak bu

kez de ozmotik denge hücre içi buz oluşumu ile korunmaktadır (Santivarangkna ve ark., 2011).

Çoğu canlı hücre için genellikle 10°C/dak hızında bir soğutmanın uygun olduğu ileri sürülmüştür (Nakamura, 1996). Laktik asit bakterilerinde optimum dondurma hızının cinse göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Champagne ve ark., 1991). Fonseca ve ark. (2000) streptokokların genellikle laktobasillerin aksine donmaya karşı daha az duyarlı olduğu bildirmiştir. Wang ve ark. (2020), *L. plantarum* ile yaptıkları bir araştırmada, ön-dondurma sıcaklığının suşa bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Başka bir çalışmada, *L. plantarum* hücrelerinin soğutma hızından nispeten etkilenmediği ve canlılığını yüksek oranda koruduğu ileri sürülmüştür. *L. plantarum*'un, 5-30,000°C/dak soğutma hızı arasında canlılığında önemli bir değişiklik görülmemiştir. Bakterinin, 5°C/dak soğutma hızında %100 ve 250°C/dak soğutma hızında ise %87 oranında canlılık gösterdiği ve dolayısıyla oldukça kararlı olduğu bildirilmiştir (Dumont ve ark., 2004).

Daha önce bahsedildiği üzere, dondurarak kurutma sırasındaki temel aşamalar örnek sıcaklığının kontrolü, kurutma prosesinin belirlenmesi, ön-donma sıcaklığının ve soğutma hızının ayarlanması ve koruyucu tip ve konsantrasyonun seçiminden oluşmaktadır (Wang ve ark., 2020). Kültürlerin muhafazasının temel amacı ise, mikroorganizmaların biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik, genetik vb. özelliklerinde değişme olmadan ve canlılıklarını koruyabilmektir. Bu amaca ulaşmak için liyofilize edilecek mikrobiyal hücreler koruyucu bir ortamda süspanse edilmeli ve fiziksel donma ve kurutma seyirleri optimize edilmelidir. Etkili koruyucu maddelerle uygun bir dondurarak kurutma yöntemi ve doğru bir yeniden etkinleştirme protokolü kullanılarak, mikroorganizmaların iyi bir canlılık ve stabiliteye sahip olarak, başarılı bir şekilde liyofilize edilebileceği belirtilmiştir. Bunların yanında, kuruma, ışık, oksijen, sıcaklık, ozmotik basınç, yüzey gerilimi ve diğer benzer faktörlere duyarlı mikroorganizmaların liyofilizasyonu için bazı özel önlemler gerekebilmektedir (Malik, 1988b). Bakterilerde liyofilizasyon süreci Şekil 2.5'de gösterilmektedir.

Bakteriyel hücrelerin dondurarak kurutma ve depolama süresi boyunca canlılıklarını kaybetmelerine neden olan temel faktörler; termal şok, hücre duvarı geçirgenliğinin değişmesi ve metabolik hasardır. Termal şok, hücre zarı hasarı veya hücre içi buz oluşumu ile açıklanabilir. Hücre içindeki suyun buza dönüşmesi sonucu sitoplazmanın kalan kısımlarındaki çözünen madde konsantrasyonu artarak ve hücre içi pH ve iyonik güçlerde bir değişikliğe neden olmaktadır. Bu durum hasar verici kimyasal reaksiyonların oranlarını artırabilmektedir. Metabolik hasar ayrıca hücre zarı

geçirgenliğinde de bir artışa neden olabilmektedir. Ayrıca metabolik hasara uğrayan hücrelerin, büyüme gereksinimleri de değişmektedir (Bozoğlu ve ark., 1987).



Şekil 2.5. Bakterilerin liyofilizasyon sürecinin gösterimi.

Hücreleri bu tip hasarlardan koruyabilmek için kriyoprotektif katkı maddelerinin (koruyucu) önemli bir rolü vardır. İyi bir kriyoprotektan, dondurma işlemi sırasında hücreleri termal şoktan korumalı, kolayca kurutulmalı ve iyi bir matris oluşturarak stabilite ve rehidrasyon kolaylığı sağlamalıdır (Costa ve ark., 2000). İyi bir koruyucu formülasyonu oluşturmak, kurutma işlemi sırasında hücreleri stabilize etmek için önemli bir adımdır. Uygun koruyucuların kullanımı ile dondurarak kurutma ve saklama sırasındaki stres azaltılmaktadır (Chen ve Hang, 2019). Koruyucu maddelerin mikroorganizmaları koruma yeteneği genellikle suyu bağlama ve hücre içi veya hücre dışı buz kristali oluşumunu engelleme kapasitelerine bağlıdır. Koruyucu etkilerinin, hücre duvarının yapısal elemanları etrafındaki mikro çevreye katkıda bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Bozoğlu ve ark., 1987).

Polioller, polisakkaritler, disakaritler, amino asitler ve protein hidrolizatları, proteinler, mineraller, organik asitlerin tuzları ve vitaminler ve kompleks ortamlar dahil olmak üzere çeşitli madde gruplarının koruyucu etkileri test edilmiştir. Ancak, kullanılan belirli bir katkı maddesinin sağladığı koruma, mikroorganizma türlerine göre değişmektedir (Costa ve ark., 2000). Genel olarak bakıldığında, yağsız süt tozu, serum, trehaloz, gliserol, betain, adonitol, sükroz, glikoz, laktoz, dekstran, silikajel ve polietilen glikol gibi polimerler pek çok mikroorganizma için koruyucu ajan olarak kullanılabilir (Morgan et al., 2006). Koruyucu ajanlar hücre adaptasyon yeteneğini arttırmak için kültür ortamına dondurma ya da kurutma işleminden önce ilave edilebilir. Koruyucu madde içeren hücrelerin canlılık oranı yaklaşık %70 oranına

ulaşabilmektedir (Morgan ve ark., 2006; Chen ve Hang, 2019). Ancak her bir materyalin etkinliğinin büyük ölçüde bakteri türüne, saklama süresine ve koşullarına bağlı olduğu bildirilmektedir (Suslow ve Schroth, 1981).

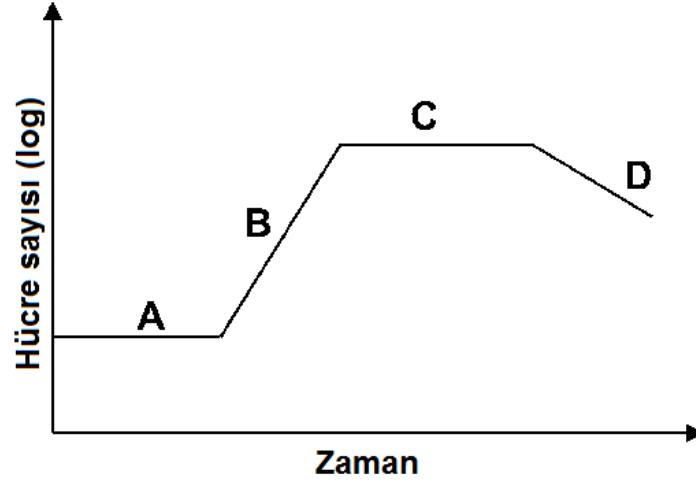
Günümüzde gliserol, kullanılan en yaygın ve en etkili kriyoprotektif ajanlardan biridir. Bir bakteri kültürünün gliserol ile süspansiyonu sonrasında dondurulması ve saklanması geleneksel yöntemler arasında yer almaktadır. Bu tür yöntemlerle, sıcaklık sabit kaldığında ve çoklu donma çözülme döngülerinden kaçınıldığında, suşların uzun süreli canlı kalması sağlanmaktadır (Cody ve ark., 2008). Ancak gliserol, dondurarak kurutmada düşük koruma sağlamaktadır. Bununla birlikte, gliserol normal depolama sıcaklıklarında (4°C) sıvı halde kalmakta ve dolayısıyla dondurarak kurutma için pek uygun olmamaktadır (Champagne ve ark., 1991).

Alternatif olarak, yağsız süt bakteriler için tercih edilen en yaygın kriyoprotektif ajandır. Kriyoprezervasyon için genellikle %1–10 konsantrasyonundaki yağsız süt (yağsız kuru madde) kullanılmıştır, ancak daha sıklıkla diğer kriyoprotektif ajanlarla birlikte, birçok mikroorganizmanın dondurarak kurutulmasında kullanılmıştır (Hubálek, 2003). Sulandırılmış yağsız süt tozu, hücreler üzerindeki kriyoprotektif etkileri nedeniyle starter kültürlerinin dondurulması veya dondurarak kurutulması için en faydalı süspansiyon ortamları arasındadır, ayrıca farklı koruyucu maddelerle birlikte kullanımları yağsız sütün kriyoprotektif etkisi artırılabilir. Yağsız süt ile birlikte gliserol, mannitol, sorbitol, trehaloz, sükröz, maltoz, laktoz, früktoz, glikoz, betain, monosodyum glutamat, bal ve amino asitler ve bunların tuzları dâhil olmak üzere çok sayıda bileşiğin kriyoprotektan olarak kullanılması bir çok çalışmada değerlendirilmiştir (Roos ve ark., 2017). Şekerler, karbonhidratların tipik camsı yapı oluşturma özelliğini sergiler ve donma, dondurarak kurutma ve depolama üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu nedenle de donma ve dondurarak kurutmada kullanılan kriyoprotektan molekülleri genellikle glikoz, sükröz ve fermantasyon ortamına bağlı olarak laktoz gibi küçük şekerlerdir. Yağsız süt ve/veya sükröz, trehaloz ve dekstran kombinasyonları yaygın olarak kriyoprotektan olarak kullanılmaktadır. Günümüzde, LAB hücreleri genellikle şeker ve polimerlerin varlığında dondurarak kurutulmaktadır. Şeker ve polimerler tarafından oluşturulan yüksek viskoziteli amorf matris, moleküllerin hareketliliğini azaltmakta ve böylece difüzyonun neden olduğu bozunma reaksiyonunu sınırlandırmaktadır. Şekerlerin, kurutma sürecinde zarar göreceği olan biyolojik moleküller ile hidrojen bağları oluşturarak suyun yerini alması nedeniyle hücreler üzerinde koruyucu etki yaptığı düşünülmektedir (Chen ve Hang, 2019).

Uygun bir ticari kültür üretebilmek için, yüksek oranda canlı kurutulmuş hücre elde edilmesi önemlidir. Bazı çalışmalar, başlangıçtaki bakteriyel yükün, uygulama sonrasında canlı kalma oranını etkilediğini göstermektedir. Bozoğlu ve ark. (1987), laktik asit bakterilerinin yüksek başlangıç hücre yoğunluğuyla dondurarak kurutulduğunda daha yüksek canlı kalma oranı elde edildiğini bildirmiştir. Bunun da, dış ortamın zorlayıcı koşullarına karşı mikroorganizmaların ortak bir koruma kalkanı oluşturmasıyla olabileceğini ifade etmişlerdir. Yüksek hücre konsantrasyonlarının önerilmesinin nedeni, hücrelerin çoğunun uzun süreli depolama sırasında ölmesi sonucu, kalan yeterli sayıdaki hücrenin canlılığın devamını sağlamasına dayanır. Başka bir deyişle, yıllardır yapılan çalışmalar, başlangıçtaki hücre konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa ($>1 \times 10^8$ hücre/ml), dondurarak kurutulmuş örnek içindeki canlı hücrelerin daha uzun süre dayanabildiğini göstermiştir (Morgan ve ark., 2006). Miyamoto-Shinohara ve ark. (2000), dondurarak kurutmadan önce hücre konsantrasyonunun 10^6 – 10^{10} hücre/ml olması gerektiğini ve bu şekilde bakterilerin canlılığının 20 yıldan fazla korunabileceğini bildirilmişlerdir.

Dondurarak kurutulmuş mikroorganizmaların rehidrasyonu, kurutulduktan sonra hücrelerin yeniden canlanması için son kritik adımdır. Ölümcül yaralanmalara maruz kalan hücreler, uygun olmayan koşullar altında rehidre edildikleri takdirde oluşan hasarı onaramayabilirler. Koruyucu ortamlarda olduğu gibi, pek çok olası rehidrasyon ortamı vardır ve hepsi değişken sonuçlar gösterir. Ortamın tipi, molaritesi ve rehidrasyon koşulları, mikroorganizmaları geri kazanım hızını önemli ölçüde etkilemektedir (Costa ve ark., 2000; Morgan ve ark., 2006).

Kesikli kültür ortamında (batch), bakterilerin büyümesi dört farklı fazda gözlemlenir; lag fazı (A), log fazı veya eksponansiyel faz (B), durağan faz (C), ve ölüm fazı (D) (Şekil 2.6). Durağan fazda, karbon açlığı ve mevcut gıda kaynaklarının tükenmesi, hücre popülasyonunun canlı kalması için stres oluşturmaktadır. Çoğunlukla bu stresin hücreyi, kuruma ve uygun olmayan sıcaklıklar gibi olumsuz koşullara karşı koruduğu bildirilmektedir. Ancak yine de, bir kuruma prosesinde bakterilerin canlı kalabilmesi için en uygun büyüme fazının, büyük ölçüde organizmaya bağlı olduğu bildirilmiştir (Morgan ve ark., 2006).



Şekil 2.6. Kesikli kültür ortamında mikrobiyal bir kültürün tipik büyüme eğrisi.

Depolama yöntemi ve paketleme ambalajının türü, kurutulmuş ürünlerin raf ömrünü etkilemektedir. Çoğu bozulabilir üründe olduğu gibi, oksijen, nem, ışık, mikrobiyal kontaminasyon ve yüksek sıcaklıklar gibi reaktiflerden kaçınılması önerilmektedir. Dondurarak kurutulmuş kültürler, çoğunlukla ampuller veya cam şişeler içinde saklanmakla birlikte, yüksek bariyer özellikli plastik torbalar ve blister ambalajlar gibi başka seçenekleri de mevcuttur (Morgan ve ark., 2006). Dondurarak kurutulmuş hücrelerin stabilitesini etkileyen en önemli iki faktör sıcaklık ve ambalaj atmosferidir. Çoğu LAB starter kültürü, 4°C’de 6 ay boyunca korunabilmekte ve genellikle dondurarak kurutulmuş kültürlerin vakum altında veya kuru azot altında düşük sıcaklıklarda saklanması önerilmektedir (Costa ve ark., 2002). Bozoğlu ve ark. (1987) vakum veya azot altında depoladıkları kültürlerin, hava altında depolananlara göre daha fazla canlılık gösterdiğini; hava şartlarında düşük canlılık görülme nedeninin, kuru hücrelerin ara yüzey alanı boyunca oksijen difüzyonuna maruz kalmasından dolayı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Wang ve ark. (2004) yapmış oldukları bir çalışmada, 4 ay süreyle 4°C’de depolanan laktik asit ve bifido bakterilerin 25°C’de depolananlara göre daha yüksek oranda canlı kaldıklarını görmüşlerdir.

2.5. Mikrobiyal Büyüme Kinetiği

Mikrobiyal büyüme kinetiği genel olarak, bir kültürde zamanın bir fonksiyonu olarak biyokütle artışının eş zamanlı takibidir. Aynı zamanda genel ilkeleri kantitatif olarak formüle edilmesini, mikrobiyal büyüme süreçlerini tanımlanmasını ve tahmin

edilmesini, daha ileri deneyler için bir temel sağlayan matematiksel modeller oluşturulmasını sağlayan parametrelerin belirlenmesidir. Bu nedenle büyüme kinetikleri sadece endüstriyel ve çevresel biyoteknolojinin uygulamalı alanlarında değil, aynı zamanda mikrobiyal genetik, fizyoloji ve ekoloji gibi temel alanlarda vazgeçilmez bir araçtır (Egli, 2009). Kinetik modeller, doğru ve tekrarlanabilir ayrıntılı deneyler ile matematiksel modeller kullanarak mikrobiyal büyüme davranışı hakkında gelişmiş bilgiler sağlamaktadır ve biyoteknolojik süreçlerin tasarımı ve kontrolünde oldukça faydalıdır (Rezvani ve ark., 2017). Doğrudan veya dolaylı ölçümlerle hücre büyüme parametrelerini tahmin etmek için çeşitli yöntemler mevcuttur. Hücre kuru ağırlığı, hücre optik yoğunluğu ve bulanıklığı, hücre solunumu, metabolitler ve metabolik hız, hücre büyümesini, substrat kullanımını ve ürün oluşumunu analiz etmek için sıklıkla tercih edilen metotlardır (Najafpour, 2007).

2.5.1. Kesikli kültürde (batch) hücre büyümesi

Kesikli kültür ortamı, besinin sabit bir sıvı ortam içinde hazırlandığı, ortama herhangi bir substrat veya mikroorganizma giriş veya çıkışının olmadığı kapalı bir sistemdir. Kültür ortamına aşıl原因an mikroorganizmalar yavaş yavaş büyüyerek çoğalır. Hücreler çoğaldıkça, besinler tükenir ve son ürünler oluşur. Mikrobiyal büyüme, hücre kuru ağırlığı (g/L) ve hücre optik yoğunluğu (tanımlı bir dalga boyundaki ışık saçılımı, OD) ile belirlenmektedir (Najafpour, 2007). Büyüme eğrisi, Şekil 2.6'da gösterildiği gibi temelde dört aşamaya ayrılır. Bunlar:

- A. İnkübasyon (gecikme) fazı (lag fazı)
- B. Eksponansiyel (logaritmik) faz (log fazı)
- C. Durağan (stasyonel) faz
- D. Letal faz (ölüm fazı)'dır (Morgan ve ark., 2006; Najafpour, 2007).

Hücrelerin fermantasyon ortamına aktarılmasıyla başlayan gecikme fazında belirgin bir hücre büyümesi gözlenmez. Bu faz, hücre replikasyonu gerçekleşmeden ve herhangi bir büyüme belirtisi olmadan, mikroorganizmaların yeni ortama adaptasyonu için gerekli olan süredir. Gecikme fazının uzunluğu, başlangıç hücre yoğunluğuna, yaşına ve ortamın koşullarına bağlıdır. Çok miktarda hücre varlığında ve çok hızlı bir şekilde

büyüdüklerinde, hücre sayısı katlanarak artar. Ekspansiyonel büyüme fazı olarak bilinen bu evrede, bir kültürün optik hücre yoğunluğu kolayca saptanabilmektedir. Hücre sentezi belirgin bir şekilde artmakta; karbon kaynakları hızla kullanılmakta ve son ürünler oluşmaktadır. Substratların hızlı bir şekilde kullanımı ve ürün birikimi, hücre yoğunluğunun sabit kaldığı durağan fazın başlamasına öncülük eder. Bu aşamada, hücre büyüme hızı ölüm oranı ile dengelenirken, hücreler ölmeye başlayabilir. Hücrelerin yaşlandıkça biyokatalitik aktivitelerinin kademeli olarak azalabileceği ve nihayetinde otolizin meydana gelebileceği iyi bilinmektedir. Fermantasyon sıvısındaki ölü hücreler ve hücre metabolitleri, toksisite oluşturarak kalan canlı hücreleri etkisizleştirir. Toksik sekonder metabolitlerin oluşumu ile canlı hücre yoğunluğunun büyük ölçüde düşmesiyle bir ölüm fazı gelişir. Ölüm fazında, ortamdaki canlı hücre sayısında üssel bir azalma görülmektedir (Najafpour, 2007).

2.5.2. Bakteri büyümesinin ölçülmesi ve büyüme kinetiklerinin belirlenmesi

Biyolojik büyüme, hem hücresel bileşenlerin (biyokütle) sentezi hem de hücrelerin yeni hücreler üretmek için tek tek çoğalmasındır. Basitçe, bir hücre bütün hücre bileşenlerini iki katına çıkarır, uzunluğunu artırır ve bölünerek iki özdeş hücreye ayrılır. Bu otokatalitik sürecin sonucunda 'özdeş' hücrelerin sayısında (N), $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow 2^4 \rightarrow 2^5 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n$ benzeri bir geometrik artış görülür. Belirli bir zaman diliminde bir kültürdeki hücrelerin ikiye bölünmesi ile hücre sayısındaki artışı gösteren denklem aşağıda verilmiştir (Egli, 2009; Tunail, 2009):

$$N_t = N_0 \cdot 2^n \quad (2.1)$$

N_0 : Başlangıçta hücrelerin sayısı
 N_t : Geçen t zaman sonra hücrelerin sayısı
 n : Bölünme sayısı (t zaman periyodundaki)

Bir popülasyondaki hücreler sabit zaman aralıklarıyla bölünmektedirler; yani sabit bir bölünme hızıyla çoğalmaktadırlar. Bir kültürdeki biyokütle artışı genellikle matematiksel olarak bir diferansiyel denklem ve bir "büyüme hızı" ile ifade edilmektedir (Eşitlik 2.2) (Egli, 2009).

$$dX/dt = \mu \cdot X \quad (2.2)$$

Eşitlik (2.2)'nin çözümü üstel bir fonksiyondur, eşitlik (2.3) ve (2.4)'deki gibi ifade edilebilir:

$$X_t = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (2.3)$$

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t} \quad (2.4)$$

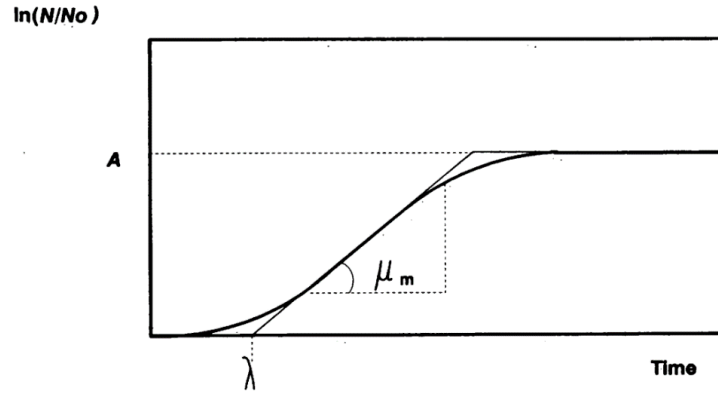
Burada;

X : Hücre konsantrasyonu (biyokütle, g/L) veya hücre sayısı (adet/mL)

t : Zaman (saat)

μ : Özgül büyüme hızı (h^{-1})'dir.

Hücre sayısının doğal logaritmasının zamana karşı çizilen grafiğinde üssel olarak artan çizginin eğimi özgül büyüme hızını (μ) vermektedir (Şekil 2.7). Genellikle bu parametre, grafiğin yaklaşık olarak doğrusal olarak artan kısmının, lineer regresyon kullanılarak eğiminin hesaplanmasıyla belirlenmektedir (Zwietering ve ark., 1990).



Şekil 2.7. Logaritmik olarak büyüyen hücrelerin özgül büyüme hızlarının hesaplanması.

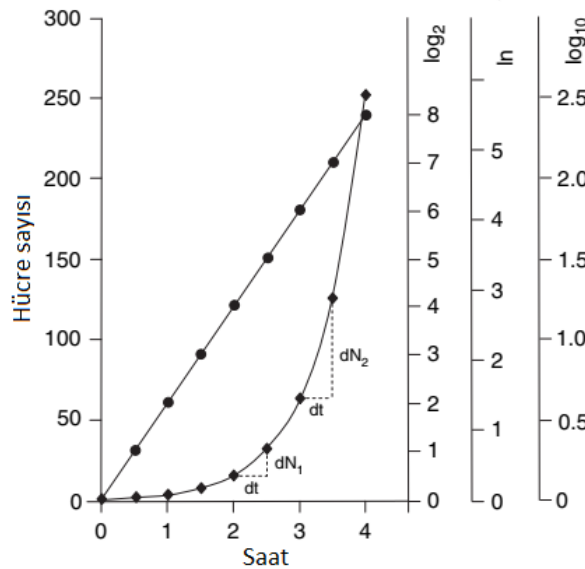
Bir hücrenin bölünerek yeni bir nesil üretmesi için gereken süreye jenerasyon süresi (g) veya ikilenme süresi (t_d) denmektedir. Hücre sayısının 2 katına ulaşmasıyla, $X_1 = 2X_0$ olacaktır. Bu eşitlik, özgül büyüme hızı denkleminde uygulandığında, ikilenme süresi (t_d) hesaplanmaktadır:

$$\mu = \ln 2 / g = 0.693 / t_d \quad t_d = 0.693 / \mu \quad (2.5)$$

Yeterli besin maddesinin bulunduğu bir gelişme ortamında ve pH, sıcaklık vb. parametlerin sabit kaldığı çevresel koşullar altında bir mikroorganizmanın jenerasyon süresi sabittir ve logaritmik hücre sayısının zamana karşı grafiğinde düz bir çizgi haline gelir (Şekil 2.8). Bu fonksiyonun doğrusallığı, kullanılan logaritmanın tabanından bağımsızdır (Egli, 2009).

Jenerasyon sayısı olan n değeri, logaritmik büyüme periyodunda geçen sürenin, jenerasyon süresine oranlanmasıyla elde edilmektedir:

$$n = t/g \qquad n = \Delta t/g = \Delta t/t_d \qquad (2.6)$$



Şekil 2.8. Bir mikrobiyal popülasyonun eksponansiyel büyüme grafiği.
(♦) hücre sayısı; (●) log (hücre sayısı).

Mikrobiyal biyokütle üretiminin tahmini, mikrobiyal aktivitenin genel bir indeksi olarak kabul edilmektedir ve özellikle büyüme oranlarını hesaplamak için kullanılmaktadır. Aynı zamanda, biyokütle üretimi, mikroorganizmaların rol aldığı proseslerin hızlarını en iyi tahmin etme yöntemidir (Kirchman, 2001). Kuru ağırlık olarak ifade edilen biyokütle, genel fizyolojik araştırmaların yanı sıra mikrobiyal proseslerin verim analizi ve iyileştirilmesi için kritik olan büyüme kinetiği ve verim faktörünün belirlenebilmesi için gerekli bir parametredir. Geleneksel standart yöntemle biyokütle, numunenin bir fırında sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmasıyla doğrudan belirlenebilmektedir. Modern biyokütle tahmin teknikleri ise, üretilen fiziksel (optik

yoğunluk, bulanıklık, kapasitans) veya metabolik (oksijen alımı, CO₂ evrimi) değerleri, toplam kuru biyokütle ile ilişkilendirmektedir. Biyokütle üretkenliği aşağıdaki denklikle hesaplanabilmektedir (Li ve Mira de Orduna, 2010). Burada A , birim zamanda ve hacimde oluşan biyokütle ağırlığını ifade etmektedir.

$$\varphi_{biyokütle} = (A_{bk1} - A_{bk0}) / (t_1 - t_0) \quad (2.7)$$

2.6. Sütçülük Yan Ürünleri

Süt, esasen yeni doğanın büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan yağ, protein, karbonhidrat, mineral ve minör bileşenlerden oluşan bir karışımdır. Doğal veya fermente halde tüketilen en eski içeceklerden biridir. Sütün belki de en büyük dezavantajı bozulabilir doğasıdır. Bu sebeple, depolama ömrünü uzatmak ve güvenilirliği sağlamak için geleneksel koruma teknikleri uygulanmaktadır (Kelly ve ark., 2009).

Teknolojik gelişmeler, sütü oluşturan bileşenlerin, biyolojik, fiziksel ve fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Bu bileşenleri konsantre etmek veya izole etmek için teknolojilerin geliştirilmesi ile, bir çok faydalı gıda ve içecek bileşeni üretilmiştir, böylece süt önemli bir değer kazanmıştır. Üreticiler süttten daha fazla fayda sağlamak için çabaladıkça, süttten elde edilen bileşenlerin sayısı ve çeşitliliği artacaktır (Kelly ve ark., 2009).

Birçok süt bileşeninin üretimi, sütün çeşitli fraksiyonlarına ayrılarak dehidre edilmesiyle elde edilmektedir. Sütün doğal olarak sıvı halde bir gıda olması, çeşitli bileşenlerin büyük ölçeklerde fraksiyonlarına ayrılmasını verimli hale getirmektedir. Süt bileşenlerinin üretiminde kullanılan ayırma, konsantre etme ve genellikle dehidratlama proseslerinde, bu bileşenlerin çözünürlük, enzimatik duyarlılık, pH bağımlılığı, vb. fizikokimyasal özelliklerinden faydalanılmaktadır. Süt bileşenlerinin su ve gıda sistemlerinde bulunan diğer bileşenlerle olan işbirliği, çeşitli gıdaların yapısal, dokusal veya organoleptik özelliklerini geliştirmesi, stabilize etmesi veya değiştirmesi bakımından bu bileşenleri çok değerli bir araç haline getirmektedir (O'Kennedy, 2009).

Süt dinamik bir malzemedir ve ineğin ırkı ve yaşı, beslenmesi, sağlık durumu, laktasyon evresi ve hayvanın yaşadığı çevre gibi nedenlerle özellikleri çok farklı olabilmektedir. Ancak genel olarak yağ, protein ve süt şekeri laktozdan oluşan yaklaşık %13 kuru madde içermektedir. Karışık bir koloidal dispersiyon olmasına rağmen süt son

derece stabildir ve herhangi bir destabilizasyon belirtisi olmadan ısıtılabilir, dondurulabilir ve kurutulabilir (O’Kennedy, 2009).

İşlenmemiş sütte 1–10 µm çapında olan yağ globülleri, bazıları biyolojik aktiviteye sahip olan protein, fosfolipit, lipoprotein, serebrosit ve sterollerin bir karışımından oluşan doğal bir membran tarafından çevrenmektedir. Fosfolipidler yüzey aktif bileşenlerdir ve bu nedenle yağ ile yağ globüllerinin süspanse edildiği su arasında bir bariyer oluşturabilirler. Steroller (en iyi bilineni kolesteroldür) suda çözünmezler ve fosfolipidlerle bağlantılıdır. İnek sütünde bulunan esas proteinler kazein ve peynir altı suyu proteinleridir. Kazein, sütün %2.5–2.8’ini (a/a) oluşturan, genellikle kazein miselleri olarak adlandırılan 200 nm çapında küresel parçacıklar halinde bulunur. Kazein misellerinin yapısı, protein ve kalsiyum fosfat arasındaki etkileşim ile belirlenir. Net nötr yük noktalarında (pH 4.6) çözünmezdir ve bu özellik bazı gıdaların oluşumu için büyük önem taşımaktadır. Peynir altı suyu proteinleri sütün yaklaşık %0.5’ini (a/a) oluşturur ve kazeinin peynir mayası ile veya asitlendirme yoluyla pıhtılaşmasından sonra çözelti içinde kalan proteinler olarak sınıflandırılır. Bu protein grubu ısıya dayanıksızdır ve bazı gıda uygulamalarında fonksiyonelliği geliştirmek amacıyla kasıtlı olarak ısı ile denatüre edilmektedir. Süt şekeri laktoz (%4.6, a/a), gerçek çözelti halindedir. Glikoz ve galaktozdan oluşan indirgen bir disakkarittir. Süt içerisinde, asidifikasyon veya gaz üretimi ile fermantasyon veya bozulma gerçekleştiren pek çok mikroorganizma için önemli bir besin kaynağıdır. Başlıca çözünür tuzlar içerisinde potasyum, sodyum, kalsiyum, magnezyum, klorür ve fosfat bulunmaktadır. Organik anyon olan sitrat da bu çözünür tuz çözeltisinin ayrılmaz bir parçasıdır (O’Kennedy, 2009).

2.6.1. Yağsız süt tozu

Sütün süt tozuna dönüştürülmesi, sütün taşınması ve daha sonraki kullanımlar için uygun bir biçimde muhafaza edilmesine olanak sağlamaktadır. Sütün kurutulması, başlangıçta sütteki besin maddelerini koruduğu için ihtiyaç fazlası sütleri değerlendirme aracı olarak kullanılmaktaydı. Bu şekilde süt tozu, sulandırılarak tüketicilerin taze süte benzeyen sıvı bir süt ürünü elde etmesini sağlamıştır. Sıvı süt ürünlerinin toza dönüşümü, diğer süt yan ürünlerinin etkili kullanımının da önünü açmıştır. (Augustin ve Margetts, 2003).

Süt tozu mikrobiyolojik olarak stabil bir üründür. Mikroorganizmaların gelişebilmesi için çok düşük olan 0.3–0.4 su aktivitesine sahiptir. Bununla birlikte, süt

tozu sulandırıldıktan sonra, pastörize sütüne benzer şekilde mikrobiyal gelişmeye ve bozulmaya karşı hassas hale gelmektedir. Süt tozu kullanımdan önce nemden korunursa, mevcut mikroorganizmaların sayısı depolama sırasında genellikle azalır, ancak spor sayısı sabit kalabilir. Süt tozu mikroorganizmaların büyümesini desteklemese de, mikrobiyolojik içerik tozun sonraki kullanımında önemli bir husustur (Augustin ve ark., 2003).

Yağsız süt tozu, rekombine süt ürünlerinin imalatında süt proteinlerini sağlamak için kullanılan en yaygın bileşendir. Yağlı süt tozu, hem yağsız kuru madde hem de süt yağı için bir kaynak olarak kullanılabilir, ancak yağ fazındaki duyu bozulmaya yol açan oksidatif değişiklikler, uygulama alanlarını sınırlandırmaktadır (Kneifel, 2003).

Yağsız süt tozu üretiminde, süt önce santrifüjlü seperatör ile yağsız süt ve kremaya ayrılır. Yağsız sütün yağ içeriği $<0.1\%$ olmalıdır. Yağı alınan süte bir ön ısıtma işlemi uygulandıktan sonra bünyesindeki suyun bir kısmı evapore edilerek konsantre haline getirilir. Daha sonra homojenize edilen süt konsantresi genellikle sprey kurutularak yağsız süt tozu elde edilir (Augustin ve Margetts, 2003). Yağlı ve yağsız süt tozunun genel kompozisyonu Çizelge 2.1'de verilmiştir:

Çizelge 2.1. Yağsız ve yağlı süt tozunun bileşimi (Augustin ve Margetts, 2003)

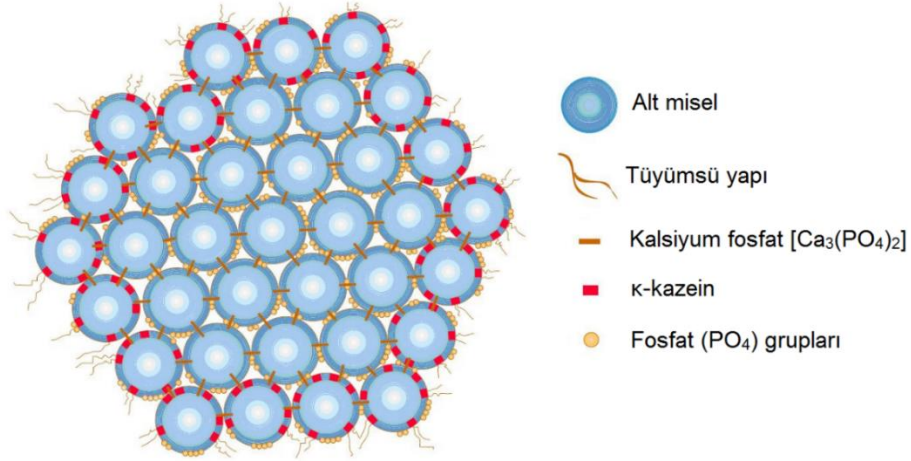
Bileşen (%)	Yağsız süt tozu	Yağlı süt tozu
Nem	3.0	2.25
Yağ	0.7	26.75
Protein	36.0	26.0
Laktoz	51.2	38.0
Kül	8.2	6.0
Kalsiyum	1.31	0.97
Fosfor	1.02	0.75

2.6.2. Kazeinler

Sütün sıvı yapısı ve çeşitli bileşenler arasındaki fiziko-kimyasal farklılıklar nedeniyle, süt endüstrisi bu bileşenleri aktif olarak farklı şekillerde fraksiyonlara ayırır. Sütte bulunan proteinler genel olarak kazein ve peynir altı suyu proteinleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Kazein ve peynir altı suyu proteinleri arasındaki çözünürlük farklılıkları ve kalsiyum fosfatın doğal pH'a bağlı çözünürlük özellikleri, kazeinin ayrılmasını ve birçok kazein bazlı bileşenin üretimini kolaylaştırmaktadır (Southward, 2003a; O'Kennedy, 2009).

Kazein, sütte hem kantitatif hem de besinsel olarak en önemli protein bileşenidir ve sütün toplam azotunun yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Kağıt, tekstil, boya, deri, elyaf ve diğer endüstrilerde kullanılmaktadır. Yenilebilir kazein ve kazeinatlar da birçok gıdada uzun zamandır kullanılan süt yan ürünleridir. Kazein, sistein hariç, çok zengin bir esansiyel amino asit kaynağıdır. Kovalent olmayan etkileşimlerle bir arada tutulan üç farklı $-\alpha_{s1}$, $-\alpha_{s2}$ ve $-\beta$ kazein polipeptit zincirinden, proteolitik olarak elde edilen κ -kazeinden ve birkaç minör protein ve peptitten oluşmaktadır. Bir fosfoprotein olan kazein, serin ester bağıyla kazeine kovalent olarak bağlı %0.7–0.9 oranında fosfor içerir. Sütte, kalsiyum, inorganik fosfat ve sitrat ile kombinasyon halinde bulunmaktadır. Kazein molekülünün yapısı Şekil 2.8'de verilmiştir. Kazein fraksiyonları, çapı 20–300 nm arasında değişen iki değerlikli katyonlar (kalsiyum ve daha az miktarda magnezyum) içeren misel kümelerinden oluşmaktadır. Bu yapı, hidrofobik fraksiyonların koloidal bir halde oldukça kararlı bir şekilde dağılmasına izin vermektedir (Southward, 2003a; O'Regan ve ark., 2009; Sarode ve ark., 2016).

Bir protein olarak kazein, süt sisteminin pH'sına bağlı olarak her biri pozitif veya negatif bir yüke sahip olabilen yüzlerce ayrı amino asitten oluşmaktadır. Sütün pH değeri yaklaşık 6.6'dır, burada kazein miselleri net bir negatif yüke sahiptir ve oldukça stabildir. Ancak bazı pH değerlerinde, kazein üzerindeki tüm pozitif ve negatif yükler dengede kalarak, protein üzerindeki net yük sıfır olmaktadır. Kazein için 4.6 olan bu pH değeri, izoelektrik nokta (İEN) olarak adlandırılmaktadır. İEN, proteinin en az çözünür olduğu pH'dır (Sarode ve ark., 2016). Kazeinler, çiğ sütün pH 4.6'ya asitlendirildiğinde çöken proteindir, peynir altı suyu proteinleri ise çözelti içinde kalmaktadır.



Şekil 2.9. Bir kazein miseli (Anonim, 2020d).

2.6.2.1. Asit kazein

Sütün pH'sının 6.6–6.7'den (doğal pH) 4.6'ya düşmesi, kazeinlerin makroskopik ölçekte topaklanmasına neden olmaktadır. Sütteki kazein bileşeninin pH ile ilgili bu davranışı, kazeinin yoğunlaşarak toplanmasına ve sütteki diğer bileşenlerin (laktoz, peynir altı suyu proteinleri ve çözünür mineraller) ayrılarak uzaklaştırılmasına olanak sağlamaktadır (O'Kennedy, 2011). Asit kazein üretiminde, çoğunlukla hidroklorik asit veya sülfürik asit gibi mineral asitler kullanılarak sütün, ~4.2–4.6 pH'ya ulaşılan kadar asitlendirilmesiyle kazeinin çökmesi sağlanmaktadır. Mineral asitlerin dışında laktik asit bakterileri kullanılarak gerçekleştirilen mikrobiyal asitlendirme de yaygın olarak tercih edilen yöntemler arasındadır (Huppertz ve ark., 2018). Bu pH'da yağsız sütün diğer tüm bileşenleri (laktoz, peynir altı suyu proteinleri ve koloidal kalsiyum fosfat dâhil mineraller) çözünebilir olduğundan, yüksek kazein içerikli tozlar üretmek için etkili bir yöntemdir (O'Kennedy, 2011). Ancak tüm bu işlemler esnasında peynir altı suyu proteinlerinin minimal denatürasyonuna neden olabilecek başlangıçtaki sıcaklık işlemi önemlidir. Isı ile denatüre olan peynir altı suyu proteinleri, kazeinden ayrı olarak veya kazein ile birlikte bu asidik pH'da pıhtılaşabilmektedir. Bu nedenle 72°C'de 15 saniye uygulanacak bir pastörizasyon önerilmiştir (O'Kennedy, 2009). Gerekli pH değerine ulaşıldıktan sonra, laktoz, peynir altı suyu proteinleri ve mineralleri içeren peynir altı suyunun ayrılmasını sağlamak için önce ısıl işlem uygulanmakta ve sonrasında kazeinin saflığını arttırmak için su ile yıkanmaktadır. Elde edilen asit kazein pıhtısı daha sonra kurutulmakta ve öğütülerek toz haline getirilmektedir. Asit kazein tozu suda çözünmez

özelliğindedir ve çözünür olması için genellikle nötralizasyon işlemi gerektirir (Southward, 2003a; Huppertz ve ark., 2018).

Alternatif olarak, yıkanmış asit kazein peyniri kazeinat üretimi için kullanılmaktadır. Kazeinat üretiminde, yaş asit kazein pıhtısı öğütülerek, sodyum, potasyum, kalsiyum veya magnezyum hidroksit gibi bir alkali ile pH~7.0'ye nötrleştirilmesinin ardından spreyle veya silindir (vals) ile kurutma yapılmaktadır. Kazeinatlar tipik olarak suda yüksek çözünürlüğe sahiptir (Huppertz ve ark., 2018).

2.6.2.2. Rennet kazein

Rennet kazein üretimi peynir üretiminin ön basamağıdır. Proteolitik bir enzim olan rennet enzimi (kimozin olarak da adlandırılmaktadır) etkisiyle, kazein miselinden κ -kazeinin bir kısmı ayrılmakta ve para- κ -kazein ve glikomakropeptit oluşmaktadır. Bunun sonucunda, miseller artık kalsiyum iyonlarının varlığında stabilitesini kaybetmekte ve koagüle olarak üç boyutlu bir jel veya teleme oluşmaktadır. Kazeinin enzimatik pıhtılaşması durumunda, sütün pH'ı değişmez (Southward, 2003a; O'Kennedy, 2011; Sarode ve ark., 2016). Asit kazein üretiminde olduğu gibi, oluşan kazein telemesine uygulanan ısı işlemi ardından peynir altı suyu proteini, laktoz ve çözünür tuzları uzaklaştırmak için yıkanmakta ve daha sonra kurutulmaktadır. Hem rennet hem de asit kazein üretiminde aynı temel ayırma teknolojileri kullanılmaktadır. Her iki yöntemde de, pıhtılaşan kazeinin çözünebilir serum fazından ayrılması ile protein oranı yüksek kazein eldesi mümkün olmaktadır (Southward, 2003a; O'Kennedy, 2009; Huppertz ve ark., 2018).

Asit ve rennet kazein arasındaki en büyük farklar aşağıdaki gibi sıralanabilir (O'Kennedy, 2009, 2011; Huppertz ve ark., 2018):

- (i) Asit kazeinde κ -kazein bozulmamış halde bulunurken, rennet kazein kümelenmiş para- κ -kazein miselleri içerir ve bu özelliği nedeniyle suda çözünmez.
- (ii) Rennet kazein, üretiminde kolladidal misel kalsiyum fosfatın üründe tutulması nedeniyle daha yüksek mineral içeriğine sahiptir.
- (iii) Asit kazein pH ayarlamasıyla suda çözünürken, rennet kazein ise sitrat veya fosfat tuzları gibi kalsiyum şelatlama ajanı ilave edilmesiyle çözünmektedir.

Asit ve rennet kazeinin genel kompozisyonu Çizelge 2.2'de verilmiştir:

Çizelge 2.2. Kazein ürünlerinin bileşimi (Southward, 2003a)

Bileşen (%)	Asit Kazein	Rennet Kazein
Nem	11.5	11.5
Yağ	1.1	0.4
Protein (Azot × 6.38)	86.2	81.3
Kül	1.8	8.2
Laktoz	0.1	0.1

2.6.3. Peynir altı suyu tozu

Peynir altı suyu tozu (PAST), çikolata ve şekerleme, fırıncılık, çorbalar ve soslar, bebek mamaları vb. farklı gıda sektörlerinde birçok uygulamada gıda bileşeni olarak kullanılmaktadır (Early, 2012). Asit kazein üretimi sırasında ilave edilen asit eykisiyle ya da peynir üretimi esnasında kullanılan rennet proteazının etkisiyle kazeinin pıhtılaşmasının ardından kalan sulu maddeye peynir altı suyu denmektedir. Peynir altı suyunun bileşimi, sütün kaynağına ve üretim sürecine bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir (Zadow, 2003). Rennet ile pıhtılaştırılmış peynir üretimi sırasında elde edilen peynir altı suyu “tatlı peynir altı suyu” (pH~6.3) olarak, süzme peynir veya asit kazein üretimi sırasında elde edilen peynir altı suyu ise “asit peynir altı suyu” (pH <5.1) olarak sınıflandırılır. Asit peynir altı suyu, tatlı peynir altı suyundan daha yüksek mineral içeriğine sahiptir (Augustin ve Margetts, 2003). PAST bileşimleri Çizelge 2.3’te verilmiştir.

Peynir altı suyunun kurutulması yüksek laktoz içeriği nedeniyle karmaşık hale gelmektedir. Laktoz, α - ve β - olmak üzere iki farklı izomerik formda bulunmaktadır. α -laktoz, monohidrat olarak kristalleşirken katı β -laktoz hiçbir kristalizasyon suyu içermez. Bununla birlikte, peynir altı suyu çözeltileri hızlı bir şekilde kurutulduğunda, α -laktozun monohidrat olarak oluşması için yeterli zaman olmadığı takdirde, α -laktoz amorf olarak oluşur. α -laktoz hidrat ve β -laktoz higroskopik olmamasına rağmen, amorf α -laktoz oldukça higroskopiktir ve havadan nemi emerek, amorf formdan daha fazla yer kaplayan bir hidrat oluşturur. Bu etki, birçok peynir altı suyu tozunda yaygın olarak gözlemlenen topaklanmaya ve kekleşmeye neden olmaktadır (Zadow, 2003).

PAST üretiminde, temel olarak peynir altı suyu önce ısıtılmakta, içerisindeki su buharlaştırılmakta ve sonrasında da kurutulmaktadır. Kurutma işlemini kolaylaştırmak ve higroskopik olmayan PAST üretebilmek için peynir altı suyu konsantresindeki laktoz

önceden kristallendirilmektedir (Augustin ve Margetts, 2003). Bu amaçla laktozu aşırı doyurmak için %60–70 kuru maddeye ulaşana kadar buharlaştırılan peynir altı suyu konsantresi, ardından 30°C'ye soğutulmakta ve bu noktada α -laktoz kristalleri oluşmaktadır. Daha sonra 15°C'ye kadar soğutulurken, β -laktozun, α -laktoza mutarotasyonu sağlanmakta ve laktoz kristalleri %75–80 oranına artırılmaktadır. Daha sonra peynir altı suyu konsantresi püskürtülerek kurutulmaktadır. Bu işlemler sonucunda, laktozun %20'ye kadar olan kısmı, higroskopik özellikte olan amorf durumda kalmaktadır (Early, 2012).

Demineralize edilmemiş peynir altı suyu tozu çeşitli gıda uygulamalarında kullanılabilir, ancak mineral tuz içeriği besinsel olarak sıkıntı yaratan bebek gıdaları gibi ürünlerde, tuz miktarının ayarlanması gerekli olmaktadır. Peynir altı suyundaki kuru maddenin yaklaşık %10'u mineral tuzlardan oluşmaktadır. Mineral içeriğinin problemli olabileceği uygulamalarda, minerali alınmış peynir altı suyu tozu kullanılmaktadır. Peynir altı suyunun çeşitli işleme yöntemleri kullanılarak mineral içeriğini %30–90 arasında azaltmak mümkün olmaktadır. Bir membran ayırma tekniği olan nanofiltrasyon, peynir altı suyunda bulunan minerallerin (sodyum, potasyum ve klorür iyonları) %40'ını gidermek için kullanılmaktadır. Katyonları ve anyonları uzaklaştırmak için iyon seçici membranlar kullanan elektrodializ yöntemiyle de %90'a kadar demineralizasyon sağlanmaktadır. Demineralizasyon seviyeleri, iyon değiştirme prosesinde kullanılan iyon değiştirme reçineleri ile de elde edilmektedir (Early, 2012).

Çizelge 2.3. Peynir altı suyu tozlarının (PAST) bileşimi (Zadow, 2003)

Bileşen (%)	Tatlı PAST	Asit PAST
Nem	3.2	3.5
Yağ	1.1	0.5
Ham Protein	12.9	11.7
Kül	8.4	10.8
Laktoz	74.4	73.4

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, *L. plantarum* izolasyonu için kullanılan 10 farklı ekşi hamur örneği Konya'da üretim yapan yerel fırınlardan temin edilerek +4°C'de laboratuvar ortamına getirilmiştir. Laboratuvarda gerçekleştirilen ekşi hamur üretimlerinde kullanılan tam buğday unu Ova Un Fab. A.Ş. (Konya) ve rafine un ise Selva Gıda San. A.Ş. (Konya)'den alınmıştır.

Bakteri kültürü için kullanılan MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) agar ve sıvı besiyerleri, seyreltmelerde kullanılan MRD (Maximum Recovery Diluent) ve izolatların depolanması sırasında kullanılan gliserol Merck (Almanya)'ten, maya gelişimini engellemek için MRS agara eklenen sikloheksimit ise Sigma-Aldrich (Almanya)'ten temin edilmiştir.

Kriyojenik koruyucu madde olarak kullanılan yağsız süt tozu, rennet ve asit kazein tozu, PAST ve DPAST, Enka Süt A.Ş. (Konya)'den alınmıştır.

3.2. Ekşi Hamur Örneklerinin Toplanması ve Üretimi

Yerel fırınlardan 10 farklı ekşi hamur örneği +4°C'de laboratuvar ortamına getirilmiştir. Tam buğday unu ve rafine un kullanılarak 2 farklı ekşi hamur ise laboratuvar ortamında geleneksel yöntemle üretilmiştir. Bu ekşi hamurların bazı kalite analizleri yapılarak, hamurlardan laktik asit bakterilerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

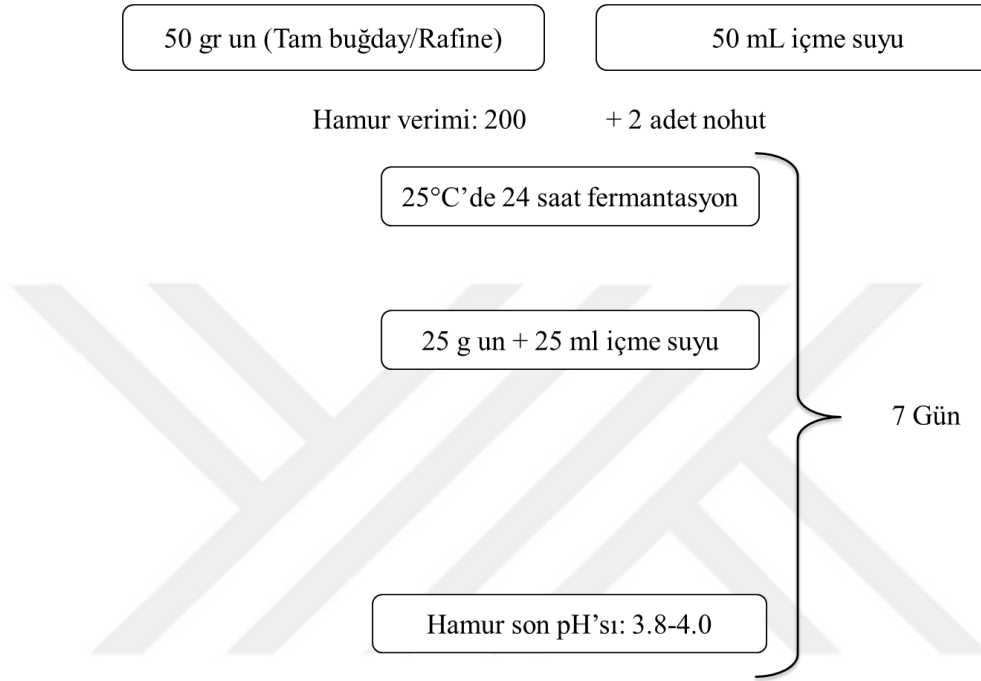
3.2.1. Ekşi hamur üretimi

Laboratuvarda üretilen ekşi hamurlar hamur verimi 200 olacak şekilde hazırlanmıştır. Hamur verimi aşağıdaki denklikten hesaplanmaktadır.

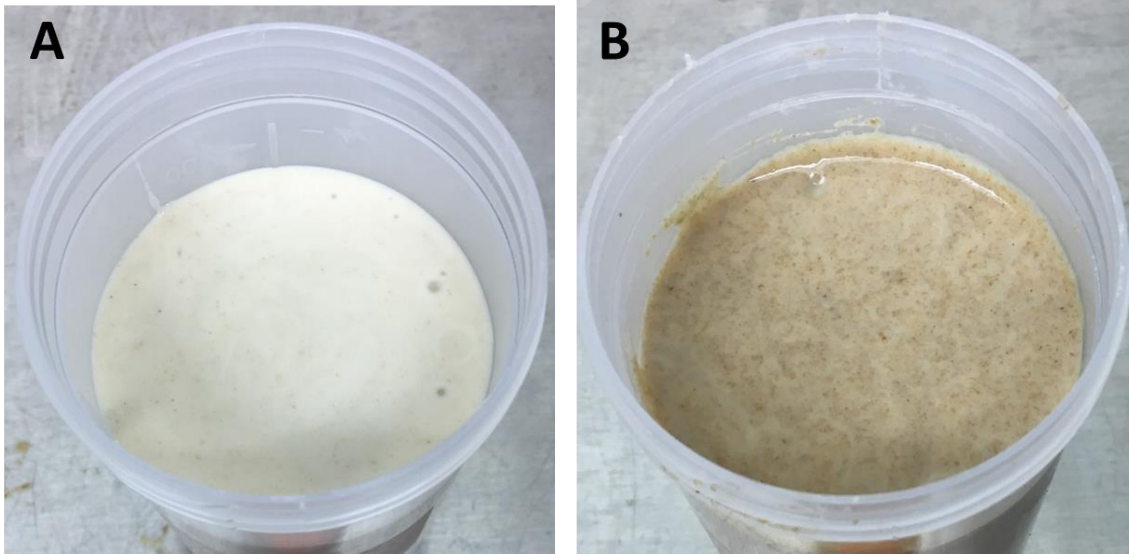
$$\text{Hamur verimi} = \frac{\text{un miktarı} + \text{su miktarı}}{\text{un miktarı}} \times 100 \quad (3.1)$$

Buna göre 50 g unu, 50 mL içme suyu ve 2 adet nohut cam bir kavanozun içinde tahta kaşıkla karıştırıldıktan sonra üstü temiz bir bezle örtülerek 1 gün oda sıcaklığında

bekletilmiştir. Ertesi günlerde hamurun üzerine 25 g un, 25 mL içme suyu eklenerek tekrar karıştırılmış ve üstü örtülerek 1 gün oda sıcaklığında dinlendirilmiştir. Bu besleme işlemine hamur pH'ları 3.8–4.0 olana kadar devam edilmiştir. Proses 7 gün sürmüştür. Ekşi hamur üretim süreci Şekil 3.1'de özetlenmiştir. Şekil 3.2'de laboratuvar ortamında üretilen ekşi hamur örneklerine ait görseller verilmiştir.



Şekil 3.1. Ekşi hamur üretimi akış şeması



Şekil 3.2. Laboratuvar ortamında üretilen ekşi hamur örnekleri
(A: rafine buğday unundan, B: tam buğday unundan üretilen ekşi hamurlar)

3.3. Ekşi Hamur Örneklerinde Yapılan Analizler

Fırınlardan alınan ve laboratuvar ortamında üretilen toplam 12 ekşi hamur örneğinde titrasyon asitliği, pH, kuru madde, su aktivitesi ve renk analizleri ile laktik asit bakterileri (LAB) sayımı yapılmış olup, LAB sayımında farklı görünüme sahip koloniler izole edilerek dondurarak kurutma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Toplam titrasyon asitliği

10 g ekşi hamur örneği 90 mL saf su ile bir homojenizatör (WiseTis HG-15D, Almanya) yardımıyla homojenize edildikten sonra fenolftaleyn indikatörü damlatılarak 0.1 N NaOH ile titre edilmiş ve sonuçlar mL NaOH olarak verilmiştir. Asitliğin laktik eşit eşdeğeri aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

$$\text{Asitlik (g/L)} = \frac{V \times N \times E \times 1000}{M} \quad (3.2)$$

Burada;

V: Titrasyonda harcanan alkali (mL),

N: Alkalinin normalitesi,

E: Laktik asidin miliekivalan ağırlığı (0.009g),

M: Alınan örnek miktarıdır.

3.3.2. pH

10 g hamur örneği 90 mL saf su ile bir karıştırıcı yardımıyla homojenize edildikten sonra pH'sı doğrudan bir pH metre (Mettler-Toledo, S213, İsviçre) kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.3. Renk değerleri

Ekşi hamur örneklerinin L^* , a^* ve b^* renk değerleri otomatik renk tayin cihazı (Konica Minolta, CR-400, Japonya) ile cihaz standart kalibrasyon plağı ile kalibre edildikten sonra doğrudan ölçüm aparatı kullanılarak belirlenmiştir.

3.3.4. Su aktivitesi

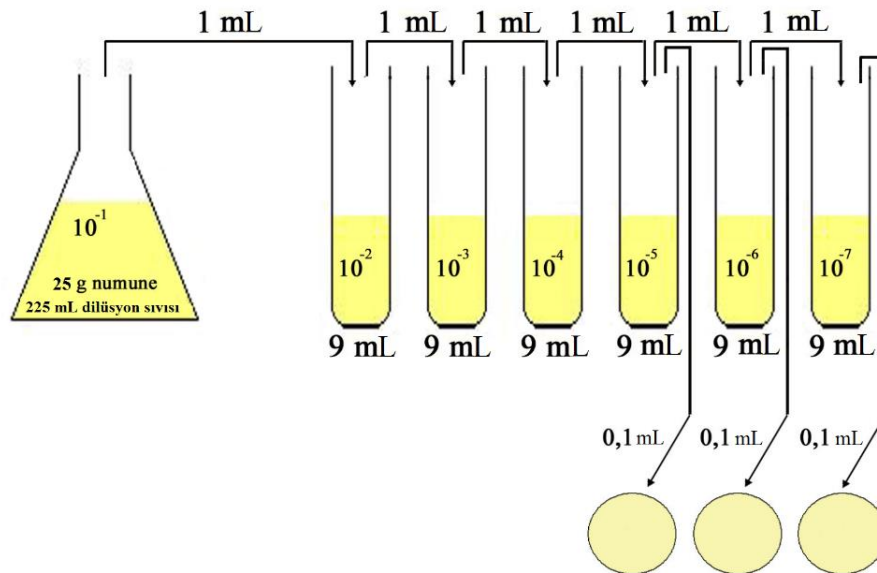
Ekşi hamur örneklerinin su aktivite değerleri, otomatik su aktivite tayin cihazı (Novasina, Lab touch- aw, İsviçre) kullanılarak belirlenmiştir.

3.3.5. Nem miktarı

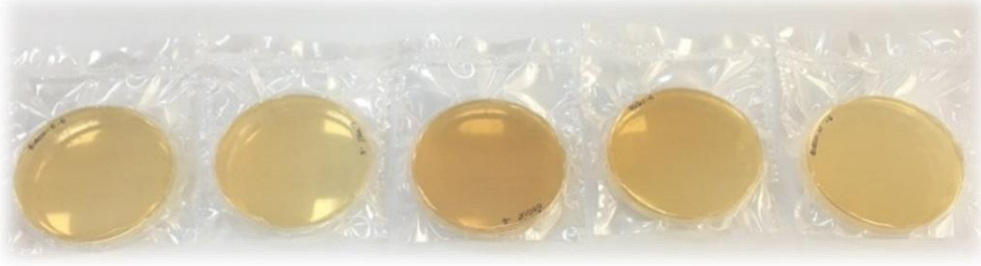
Ekşi hamur örneklerinin nem içeriği AACC'ye (Metod No: 44-19.01) göre 135°C'de 2 saat kurutularak belirlenmiştir (AACC, 1999).

3.3.6. Laktik asit bakterisi (LAB) sayısı

25 g ekşi hamur örneği, 225 mL steril MRD (Merck, 146809, Almanya) ile homojenize edilerek 10^{-1} – 10^{-7} oranlarında dilüsyonlar hazırlanmıştır. Tüm dilüsyonlardan 50 µg/L sikloheksimit (CAS 66-81-9, Sigma-Aldrich, Almanya) içeren MRS agar (Merck, 110660, Almanya) üzerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petri kutuları, vakum ambalaja alınarak içerisindeki oksijenin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Anaerobik koşullarda 30°C'de 3 gün inkübe edildikten sonra koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar koloni oluşturan birim (kob)/g olarak verilmiştir.



Şekil 3.3. Dilüsyon hazırlama tekniği ve ekimler



Şekil 3.4. Vakum ambalaja alınan petrilerin görüntüleri

3.4. Ekşi Hamurlardan LAB İzolasyonu

LAB kültürel sayımından sonra, farklı morfolojik görünümlere sahip koloniler seçilmiştir. Seçilen koloniler en az 3 ve en fazla 7 kez olmak üzere alt kültüre alınarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu saflaştırma işlemi MRS agar üzerine sürme yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). İzole edilen kültürlerle, 1. ve 3. saflaştırma işleminden sonra biyokimyasal tanımlama yapılmıştır. Yapılan testler sonucunda Gram pozitif, katalaz negatif ve çubuk şeklindeki koloniler tespit edilerek, MRS sıvı besiyeri (Merck, 110661, Almanya) içerisinde 37°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra, %20 gliserol (Merck, Almanya) içeren bir ortamda -80°C’de moleküler tanımlama için saklanmıştır.

3.4.1. Biyokimyasal tanımlama

Ekşi hamur örneklerinden izole edilen bakterileri kolonilerinden *Lactobacillus* türlerini ayırmak amacıyla, izolatların kültürel (koloni morfolojisi), biyokimyasal (gram boyama ve katalaz testi), morfolojik (kok, çubuk gibi) özelliklerine bakılarak ön tanımlama yapılmıştır.

3.4.1.2. Koloni morfolojisi

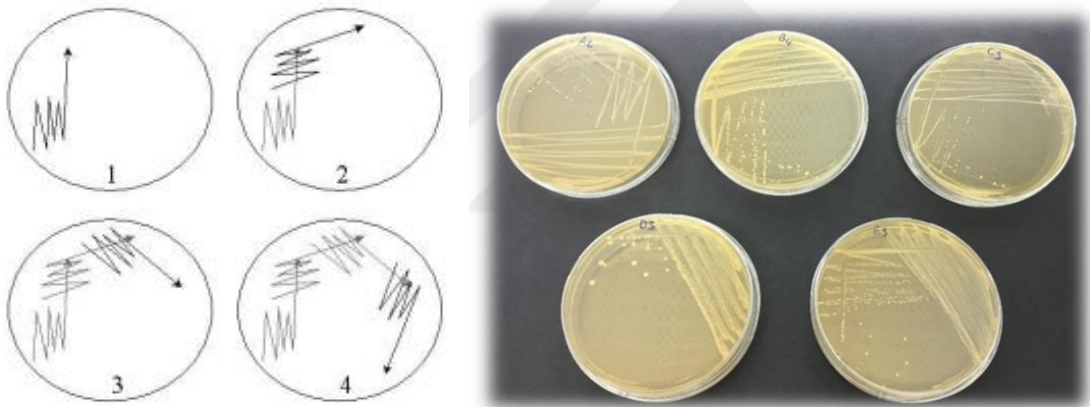
İnkübasyondan sonra petrilerdeki koloniler görünüşlerine, rengine ve şekline bakılarak değerlendirme yapılmıştır ve birbirinden farklı olduğu düşünülen koloniler alınarak saflaştırma işlemi uygulanmıştır.

3.4.1.3. Gram boyama

İzole edilen farklı morfolojik görüntüye sahip kolonilerin ilk saflaştırma işleminden sonra Gram boyama tekniği ile boyanmıştır. Preparatlar, lam üzerinde saf su ile karıştırılan bir koloninin, kuruduktan sonra fikse edilmesiyle hazırlanmıştır. Gram boyama işlemi boyama kitindeki (Merck, 111885, Almanya) prosedürlere göre yapılmıştır.

3.4.1.4. Katalaz testi

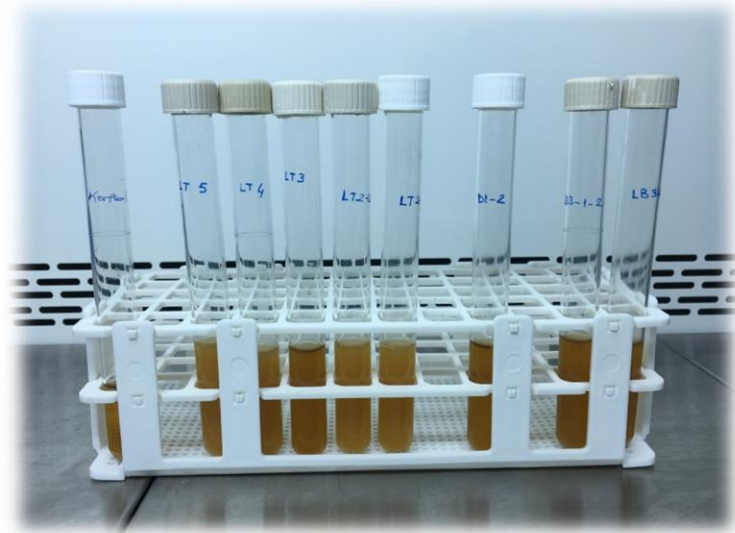
İlk saflaştırma işleminden sonra kolonilerin üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılarak gaz kabarcığı oluşumu gözlemlenmiştir ve gaz oluşturan örnekler katalaz pozitif, oluşturmayanlar ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.5. Sürme tekniği ile saf koloni eldesi

3.4.2. Hücre konsantrasyonunun optik dansitesi (OD_{600})

Saf hale getirilmiş LAB'den öze yardımıyla 1 adet koloni 10 ml MRS sıvı besiyeri içerisinde $37^{\circ}C$ 'de 24 saat kültüre alınarak, inkübasyon sonrasında (Şekil 3.6) spektrofotometre (Biochrom Libra S22, İngiltere) ile 600 nm'deki bulanıklık değerleri belirlenmiştir.



Şekil 3.6. MRS sıvı besiyerinde gelişerek bulanıklık oluşturan kültürler

3.5. İzole edilen LAB'nin Genetik Tanımlanması

3.5.1. LAB'nden DNA izolasyonu

-80°C'de muhafaza edilen bakteriyel kültürlerin aktive edilmesi amacıyla tüm isolatlar 10 mL MRS sıvı besiyeri içerisinde 37°C'de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her bir örnek 10.000 g'de 10 dk. santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelletlerden ticari bir izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak genomik DNA'nın izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA ekstraksiyonları üreticinin protokolüne göre yapılmıştır.

3.5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ve DNA dizi analizi

DNA'ları ekstrakte edilen suşlarının farklılaşmasını sağlamak için, primer M13 kullanılarak RAPD-PCR analizi yapılmıştır. 1 µl kalıp DNA, 10 µl 5×PCR tamponu, 0.4 µl dNTP'ler (Bioline, İngiltere), 2 µl 20 mM primer M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), 0.25 µl 5 U Taq polimeraz (Promega, ABD) ve 36.35 µl steril dH₂O karıştırılarak toplam 50 µl PZR reaksiyon miksi hazırlanmıştır. PZR, amplifikasyonu, 94°C'de 3 dk ile ilk ayrıştırma ile başlamış, daha sonra denatürasyon 94°C'de 1 dk, primer yapışması 40°C'de 20 sn, sentez (uzama) 72°C'de 2 dk süreyle 35 döngü olmak üzere gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel tanımlama, 16S rRNA dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir.

DNA Dizi Analizi GEN Plaza Biyoteknoloji Merkezi'nde hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Sekansların sonuçları, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritması kullanılarak NCBI veri tabanındaki sekanslarla karşılaştırılmıştır. %98 ve üzeri benzerlik gösteren örnekler değerlendirmeye alınmıştır. *L. plantarum* olarak tespit edilen tüm suşlar, 24 saat 37°C'de MRS sıvı besiyeri içinde inkübe edilmiştir. En yüksek popülasyon ve OD₆₀₀ değerine sahip olan suş seçilerek büyüme kinetiği araştırılmış ve liyofilize kültürleri üretilmiştir.

3.6. *L. plantarum* Gelişmesine Ait Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

L. plantarum MRS sıvı besiyeri içerisine %1 seviyesinde aşılansarak (yaklaşık 1.5×10^6 organizma) 37°C'deki 28 saat boyunca inkübe edilmiştir. Gelişimi sırasında belirli zaman aralıklarında kültürel sayımları yapılarak canlı bakteri popülasyonu belirlenmiş ve 600 nm'deki optik yoğunlukları (OD₆₀₀) ölçülerek toplam biyokütle miktarı tahmin edilmiştir. Sonuçlar zamana karşı grafiğe aktarılmıştır. Elde edilen sonuçlardan büyüme kinetiği parametreleri hesaplanmıştır (Büyüme parametrelerinin hesaplanması ile ilgili detaylar bölüm 2.5.3'te anlatılmıştır.). Özgül büyüme hızını gösteren μ değeri *L. plantarum*'un logaritmik gelişme evresinde elde edilen relatif popülasyon büyüklüğünün doğal logaritması [$y = \ln(X/X_0)$] ile zaman arasında çizilen grafiğin eğiminden bulunmuştur. Ayrıca aşağıdaki matematiksel ifade kullanılarak hesaplanmaktadır:

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t} \quad (3.3)$$

Jenerasyon süresini belirten g değeri (çoğunlukla t_d ; ikilenme süresi olarak da bilinmektedir.) aşağıdaki denklikten hesaplanmıştır:

$$t_d = \frac{0,693}{\mu} \quad (3.4)$$

Jenerasyon sayısı, n değeri ise logaritmik büyüme evresi süresinin jenerasyon süresine oranlanması ile elde edilmiştir:

$$n = \frac{\Delta t}{g} = \frac{\Delta t}{t_d} \quad (3.5)$$

Üretkenlik (φ), birim zamanda (saat) üretilen biyokütle miktarı olarak değerlendirilir ve aşağıdaki denklikten hesaplanmıştır:

$$\varphi_{biyokütle} = \frac{A_{bk1} - A_{bk0}}{t_1 - t_0} \quad (3.6)$$

burada A , birim zamanda ve hacimde oluşan biyokütle ağırlığını ifade etmektedir. OD_{600} değerlerinin karşılık geldiği biyokütle ağırlığına göre hesaplanmıştır.

3.7. *L. plantarum*'un Biyokütle Özellikleri

3.7.1. *L. plantarum* biyokütlesinin toplanması ve kuru ağırlığının belirlenmesi

Lactobacillus kültürlerinin kurutulmasında en iyi canlılığın, büyümenin durağan fazında elde edildiği bakterilerin stres koşullarına daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Strasser ve ark., 2009). Bu nedenle bu çalışmadaki *L. plantarum* hücreleri, büyüme periyodunda durağan fazın başında toplanmıştır. Büyüme grafiğinden de görüleceği gibi bu süre 20 saat olarak belirlenmiştir. Dondurulmuş *L. plantarum* kültüründen %1 oranında MRS sıvı besiyerine eklenerek, 37°C'de 20 saat süreyle inkübe edilmiştir. Aktifleşen kültürler aynı koşullar altında ikinci bir transfer ile MRS sıvı besiyerine yeniden aşılansın inkübe edilerek biyokütle miktarının artırılması sağlanmıştır. 20 saatlik inkübasyon sonunda gelişen kültür, 4°C'de 3000 g'de 15 dk (Nüve, NF 800, Türkiye) santrifüjlenmiştir ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Santrifüj ile toplanan hücreler iki kez steril salin çözeltisi (%0.85 NaCl) ile yıkanarak biyokütle elde edilmiştir. Kuru ağırlık, biyokütlenin 80°C'de 24 saat kurutulmasıyla gravimetrik olarak belirlenmiştir.

3.7.2. Biyokütlenin parçacık boyutu dağılımı

Biyokütlenin ortalama parçacık boyutu dağılımı, sıvı dispersiyon numune ünitesi ile donatılmış bir Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak lazer kırınımı ile ölçülmüştür. Analiz esnasında, biyokütle,

hücre lizisini önlemek için izotonik salin içerisinde seyreltilmiştir ve ‘obscuration’ değeri %5’e ulaşana kadar ilave edilmiştir. Çözücü ve biyokütle için kırılma indileri sırasıyla 1.33 ve 1.40 olarak ayarlanmıştır. Ortalamalar 3 tekrar halinde 5 okuma ile hesaplanmıştır. Parçacık ortalama boyutunu gösteren $D_{3,2}$ (hacim/yüzey alanı ortalama çapı) ile $D_{4,3}$ (hacimsel ortalama çapı) değerleri karşılaştırılmış ve parçacık boyut dağılımlarından D_{50} ve D_{90} değerleri ile yöntemin doğruluğu tartışılmıştır.

3.7.3. Biyokütlenin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri

48 saat boyunca 40°C'de kurutulan hücrelerin morfolojisi, ince bir altın tabakası ile kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskobu (Hitachi, SU 1510, Japonya) ile 5000 ve 10000× büyütme oranlarında incelenmiştir. Mikrograftaki hücrelerin boyutu ImageJ (versiyon 1.52a) yazılımı (NIH, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

3.8. *L. plantarum* Kullanarak Ekşi Hamur Denemesi

3.8.1. Ekşi hamur denemesi için sıvı inokülümün hazırlanması

MRS sıvı besiyeri içerisine %1 (h/h) oranında aşılana *L. plantarum* kültürü, 37°C'de 20 saat inkübe edilmiştir. Çoğalan kültür 4°C'de 3000 g'de 15 dk boyunca santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet iki kez steril salin çözeltisi (%0.85 NaCl) ile yıkanmıştır. Daha sonra 600 nm'deki optik dansitesi (OD_{600}) 2.00 olacak şekilde salin çözeltisi ile yeniden sulandırılarak süspansiyon haline getirilmiştir. Oluşturulan bu *L. plantarum* hücre süspansiyonunun canlı hücre sayısı MRS agar ile yapılan kültürel sayımlarda yaklaşık 4.5×10^8 kob/mL olarak hesaplanmıştır.

3.8.2. Hamurun hazırlanması

Hamurlar AACC 10-09-01 yöntemine (AACC, 1999) göre hazırlanmış olup; 100 g rafine un (protein %11.7, kül %0.64, nem %14.5), 1 g tuz, 5 g şeker ve 50 ml seyreltilmiş hücre süspansiyonu karıştırılarak bir mikser (Hobart, N50, Kanada) ile 10 dk boyunca yoğrulmuştur. 30°C'de ve %80 bağıl nemde fermente edilen hamurların 1., 15., 20. ve 25. saat sonundaki toplam titrasyon asitliği, pH, toplam LAB sayısı, renk ve hamur yapışkanlık değerleri belirlenmiştir. Örnekler, her bir fermantasyon deneyi için bağımsız

inokülömlar kullanılarak iki tekerrür halinde hazırlanmıştır. Sonuçlar ortalama değeri ± standart sapma olarak sunulmuştur.

3.8.3. Hamur analizleri

3.8.3.1. Hamurların pH ve toplam titrasyon asitliği

10 g hamur 100 mL saf su ile karıştırılarak homojenize (WiseTis HG-15D, Almanya) edilmiştir. Daha sonra süspansiyonun pH'sı, pH metre (Mettler-Toledo, S213, İsviçre) ile ölçülmüştür. Toplam titrasyon asitliği (TTA) belirlemek için süspansiyon, pH 8.5 olana kadar 0.1 N NaOH ile titre edilmiştir ve sonuçlar ml NaOH olarak verilmiştir.

3.8.3.2. Hamurların toplam LAB sayısının belirlenmesi

10 g hamur örneği, 90 mL steril %0.85 (a/h) NaCl çözeltisi içinde süspansiyon edilerek, homojenize edilmiştir. Elde edilen hamur süspansiyonları seri olarak 10 ve katları şeklinde seyreltilmiş ve uygun dilüsyonların MRS agar üzerine yayma yöntemi ile ekimleri gerçekleştirilmiştir. 30°C'de 3 gün süreyle inkübe edilerek, gelişen LAB kolonileri sayılarak sonuçlar kob/mL olarak ifade edilmiştir.

3.8.3.3. Hamurların renk ölçümleri

Hamurların renkleri Konica Minolta renk ölçüm cihazı (CR-400, Osaka, Japonya) kullanılarak CIELAB renk skalasına göre belirlenmiştir. Renk parametrelerinden L^* (beyazlık veya parlaklık/karanlık), a^* (kırmızılık/yeşillik), b^* (sarıklık/mavilik) ve ΔE^* (toplam renk değişimi) değerleri ölçülmüştür. ΔE^* , $Y=94.00$, $x=0.3158$, $y=0.3222$ renk koordinatlarına sahip beyaz standart kalibrasyon plakasından olan farklılığı ifade etmektedir.

3.8.3.4. Hamurlarda hacim artışının belirlenmesi

20 g hamur örneği 50 ml'lik mezürler içerisine yerleştirilerek 30°C ve %80 bağıl nem ortamında fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyonun 1., 15., 20., ve 25. saatlerinde hamurlarda meydana gelen hacim artışı % olarak ifade edilmiştir.

3.8.3.5. Hamurların işlenebilirlik özelliklerinin belirlenmesi

Hamur işleme özellikleri, (Chen ve Hosney, 1995) tarafından tarif edilen bir hamurun yapışkanlığını ölçen bir düzenek (A/DSC) ile TA.XT2 Tekstür Analiz Cihazı (Stable Micro Systems, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçüm sırasında 25 mm çapında bir silindirik prob kullanılmıştır. Ön test hızı ve test hızı 0.5 mm/s, test sonrası hız 10 mm/s, uygulanan kuvvet 40 g, temas süresi 0.1 s olarak ayarlanmıştır. Hamurlar test hücreye yerleştirilerek, gözeneklerden 1 mm çıkana kadar sıkıştırılmıştır. Mekanik stresi ortadan kaldırmak için 30 saniye dinlendikten sonra her hamurla sekiz ölçüm yapılmıştır. Hamurların, yapışkanlık (stickiness), adezyon işi (work of adhesion) ve iç yapışkanlık (cohesiveness) parametreleri belirlenmiştir.

3.9. *L. plantarum* Liyofilize Kültürlerinin Üretilmesi

3.9.1. Mikroorganizma inokulumunun hazırlanması

İnokulum hazırlığı için, 0.1 µL dondurulmuş *L. plantarum* kültüründen, 10 mL MRS sıvı besiyerine eklenerek statik şartlar altında 20 saat süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir. Aktifleştirilen kültürler daha sonra 1000 mL MRS sıvı besiyerine alt kültürlenerek 20 saat boyunca aynı koşullar altında inkübe edilmiştir. Hücreler, 4°C'de 15 dk süreyle 3,000 g de santrifüjlenerek, süpernatant atılmış ve hücreler steril salin solüsyonu ile iki kez yıkanmıştır.

3.9.2. Koruyucu ortamların hazırlanması

Liyofilizasyon işlemi için kontrol medyum olarak %10 kuru maddeli (k.m.) yağsız süt kullanılmıştır. Bu kültürlerle kriyoprotektan ajan olarak %5 (a/h) oranında ayrı ayrı asit kazein, rennet kazein, peynir altı suyu tozu (PAST) ve %50 demineralize peynir altı suyu tozu (DPAST) ilave edilmiştir. Kontrol numunesi yağsız süt tozundan hazırlanmış olup, %10 kuru madde içerecek şekilde manyetik karıştırıcı ile 10 dk karıştırılarak hazırlanmıştır. Asit ve rennet kazein ilk olarak, manyetik bir karıştırıcıyla oda sıcaklığında yarım saat boyunca yağsız süt ortamında rehidre edilmiştir. Karışım sıcaklığı kademeli olarak 60°C'ye yükseltilerek çözünmesini sağlamak amacıyla için 1.5 saat daha karıştırılmıştır. PAST ve DPAST ise, %5 (w/v) oranında yağsız süt ortamına ilavesi

doğrudan yapılarak, manyetik karıştırıcı ile 15 dk karıştırılarak hazırlanmıştır. Tüm nihai karışımlar sterilizasyon için 90°C'ye ısıtılarak 30 dk tutulmuş ve ardından oda sıcaklığına soğutulmuştur.

3.9.3. Liyofilizasyon işlemi

Aktifleştirilen ve MRS sıvı besiyerine alt kültürlenerek çoğaltılan *L. plantarum* hücrelerinin santrifüjlenerek ayrılması ve steril salin solüsyonu ile iki kez yıkanmasının ardından elde edilen biyokütle, hazırlanan koruyucu ortamlara doğrudan ilave edilip, karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilen kültürler, -80°C'de 24 saat boyunca dondurulduktan sonra 48 saat süreyle vakum altında liyofilize (Operon, FDB-5503, Kore) edilmiştir.

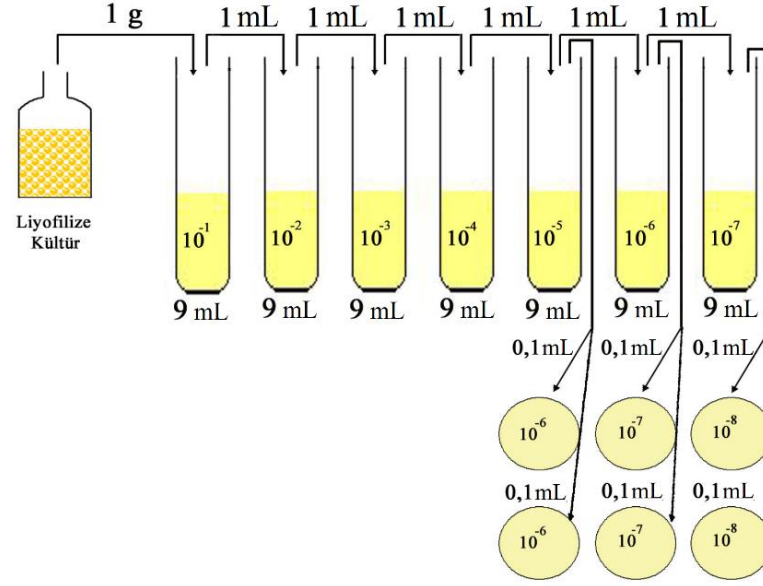
Liyofilize edilen kültürler, bir kahve öğütücüsünde (Fakir, Aromatic, Almanya) 1 dk süreyle öğütülerek, toz haline getirilmiştir ve toplam 20 hafta boyunca +4°C'de ışık geçirmeyen vakumlu paketler içerisinde depolanmıştır. Hem liyofilizasyondan önce ve sonra, hem de 30, 60, 90, 120 ve 150 günlük depolama sürelerinde kültürleride canlılık analizleri yapılmıştır. Ayrıca depolama boyunca kültürlerin bazı fiziksel özellikleri belirlenmiştir. Çalışma 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. *L. plantarum*'un yalnızca yağsız süt içerisinde dondurularak kurutulmasıyla elde edilen kültür "kontrol" örneği olup, bu ortama %5 oranlarında asit kazein ilave elde edilen kültür "AK", rennet kazein ilave elde edilen kültür "RK", PAST ilave elde edilen kültür "P" ve %50 demineralize PAST ilave edilen kültür ise "DP" olarak kısaltılmıştır.

3.10. Liyofilize Kültürlerde Yapılan Analizler

3.10.1. Canlı hücre sayımı

Kültürlerdeki canlı hücre sayısı kültürel sayım metodu ile belirlenmiştir. Ekimler için MRS agar, dilüsyon sıvısı olarak da FTS (%0.85 NaCl) kullanılmıştır. Depolanan kültürler ekim işleminden önce oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra dilüsyon sıvısı içerisine alınarak seyreltme işlemi yapılmıştır. 100 µl uygun kültür dilüsyonu MRS agar besiyerine yayma yöntem ile ekildikten sonra petrilere 30°C'de 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. Şekil 3.7'de kültürlerden oluşturulan dilüsyon ve ekim işlemi gösterilmiştir.

İnkübasyon sonunda oluşan LAB kolonileri sayılarak sonuçlar kob/mL olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.7. Liyofilize kültürlerde uygulanan canlı hücre sayımı yöntemi

Liyofilizasyon işleminin hücrelerin logaritmik olarak canlılığına etkisi her bir koruyucu ajan için aşağıdaki denklemle hesaplanmıştır:

$$\text{Canlılık kaybı (\%)} = \frac{\text{LÖ hücre sayısı} - \text{LS hücre sayısı}}{\text{LÖ canlı hücre sayısı}} \times 100 \quad (3.7)$$

Burada;

LÖ hücre sayısı: Liyofilizasyondan önce logaritmik canlı hücre sayısını (log kob/g),

LS hücre sayısı: Liyofilizasyondan önce logaritmik canlı hücre sayısını (log kob/g) ifade etmektedir.

Depolama süresince kültürlerin canlı kalma oranları ise aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$\text{Canlı kalma oranı (\%)} = \frac{\text{Depolama periyodundaki canlı hücre sayısı (kob/g)}}{\text{Depolama öncesi canlı hücre sayısı (kob/g)}} \times 100 \quad (3.8)$$

3.10.2. Nem içeriği

Dondurarak kurutulanan tozların nem içeriği, 102°C'de sabit ağırlığa ulaşılana kadar etüvde kurutma yoluyla gravimetrik olarak belirlenmiştir (IDF 26/ISO 5537, 2004).

3.10.3. Su aktivitesi

Liyofilize kùltürlerin su aktiviteleri değerleri 25°C'de 30 dk stabilize edildikten sonra otomatik su aktivite tayin cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

3.10.4. Su sorpsiyon özelliği

Dondurarak kurutulanan toz numuneleri (yaklaşık 1 g) 25°C'de NaCl doymuş çözeltisi ile hava geçirmez bir cam kaba yerleştirilerek yaklaşık 7 gün sonra numuneler tartılmıştır. 100 g kuru madde başına adsorbe edilen nem g cinsinden (g/100g) belirlenmiştir.

3.10.5. Renk analizi

Kùltürlerin L^* , a^* ve b^* renk değerleri otomatik renk tayin cihazı (Konica Minolta, CR-400, Japonya) ile cihaz standart kalibrasyon plağı ile kalibre edildikten sonra doğrudan ölçüm aparatı kullanılarak belirlenmiştir. Depolama boyunca meydana gelen renk değişimleri ise aşağıdaki denkliklerden hesaplanmıştır:

$$\Delta L^* = L^* - L_0^* \quad (3.9)$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^* \quad (3.10)$$

$$\Delta b^* = b^* - b_0^* \quad (3.11)$$

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (3.12)$$

3.10.6. Toz kùltürlerin parçacık boyutu dağılımı

Kùltürlerin ortalama parçacık boyutu dağılımı, sıvı dispersiyon numune ünitesi ile donatılmış bir Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, İngiltere)

cihazı kullanılarak lazer kırınımı ile ölçülmüştür. Toz kültür örnekleri saf su içerisinde ve ‘obscuration’ değeri %5’e ulaşana kadar seyreltilmiştir. Saf suyun ve partikülün kırılma indisleri sırasıyla 1.33 ve 1.53 olarak ayarlanmıştır. Ortalamalar 3 tekrar halinde 5 okuma ile hesaplanmıştır. Hacim/yüzey alanı ortalama çapını veren $D_{3,2}$, hacimsel ortalama çapını veren $D_{4,3}$ değerleri ile parçacık ortalama boyutları ve D_{10} , D_{50} ve D_{90} değerleri ile parçacık boyut dağılımları belirlenmiştir.

3.10.7. Toz kültürlerin taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelenmesi

Dondurarak kurutulmuş kültürlerin yüzey morfolojik özellikleri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) (Hitachi, SU 1510, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Toz halindeki parçacıklar, çift taraflı yapışkan bant yardımıyla, alüminyumdan yapılmış standart bir SEM numune aparatına monte edilerek altın ile kaplanarak, çeşitli büyütme oranlarında incelenmiştir.

3.10.8. Termal analizler

Dondurarak kurutulmuş kültürlerin termal kararlılığı bir termal analizör (Setaram LabSys Evo, Caluire, France) kullanılarak 25–400°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilen TGA ve DSC analizleri ile belirlenmiştir. Analizler 20 mL/dk hızındaki azot gazı akışı altında 10°C/dk sıcaklık artışıyla yapılmıştır.

3.11. İstatistiki Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 (SPSS Inc., New York, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır. Ortalama değerler arasındaki istatistiksel anlamlı farklar, Tukey’in çoklu karşılaştırma testleri ile $p < 0.05$ güven aralığında belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Ekşi Hamur Analiz Sonuçları

Farklı fırınların üretimlerinde kullandıkları 10 farklı ekşi hamur (A–K) örneği ile geleneksel yöntemle iki farklı un kullanarak laboratuvarında üretilen 2 ekşi hamur (LR, LT) örneklerinde yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Toplanan ve hazırlanan hamurların, üretim yöntemleri (ekşi hamur tipi), işleme koşulları ve fermantasyon şartları (sıcaklık, süre, nem, vb.) ile hamurlarda kullanılan hammadde çeşidi, sayısı (un tipi vb.) ve miktarlarının (hamur verimi vb.) farklı olması nedeniyle analiz sonuçlarının benzerlik göstermediği görülmektedir. Bu çeşitlilik farklı tiplerde ve kalitede son ürünlerin oluşmasını sağlamaktadır.

4.1.1. Hamurların toplam titrasyon asitliği (TTA) ve pH sonuçları

Asitlik, ekşi hamur fermantasyonunun önemli biyokimyasal özelliklerinden biridir. Hamurun asitliğini, fermantasyona katılan LAB veya maya tür ve sayısı, fermantasyon sıcaklığı ve süresi, hamurun verimi ve kullanılan unun tipi (içerdiği kül miktarı) gibi faktörler etkilemektedir. TTA değeri ekşi hamur fermantasyonu sırasında üretilen toplam organik asit miktarını ifade etmektedir (Decock ve Cappelle, 2005). Bu çalışmada piyasadan alınan hamurların TTA değerleri, 4.87-25.7 mL NaOH aralığında tespit edilmiştir. Geleneksel yöntemle rafine ve tam buğday unuyla üretilen ekşi hamurların TTA değerleri ise sırasıyla 15.47 ve 19.67 mL NaOH olarak bulunmuştur. Ekşi hamur fermantasyonu sırasında laktik asit bakterileri tarafından üretilen organik asitler, hamur pH’sının düşmesine yol açarken, hem hamurun reolojik özelliklerinde hem de son ürünün kalitesinde önemli bir rol oynamaktadır (Yan ve Zhang, 2019). Toplanan ve üretilen 12 farklı ekşi hamur örneğinin pH değerlerinin 3.43–5.49 arasında değiştiği görülmüştür. Ekşi hamurların pH’sının tipik olarak 3.5–4.0 arasında olduğu bildirilmektedir (Katina ve Poutanen, 2013). Buna göre pH’sı sırasıyla 5.39 ve 5.49 olan B ve H ekşi hamur örneklerinin bu sınırın çok üstünde olduğu görülmektedir. De Vuyst ve Neysens (2005) ekşi hamurların başlangıçta 5.0–6.2’lik bir pH’ya sahip olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla B ve H hamurlarına nispeten daha yakın bir zamanda besleme yapıldığı ve henüz fermantasyonunun yeterince ilerlemediği düşünülebilir.

Çizelge 4.1. *L. plantarum* izolasyonunda kullanılan ekşi hamur örneklerine ait TTA, pH, a_w , nem, renk ve LAB sayısı değerleri†

Ekşi Hamur Örnekleri	TTA (mL NaOH)	Asitlik (g laktik asit/L)	pH	L^*	a^*	b^*	a_w	Nem (%)	LAB (log kob/g)
A	11.40±0.79 ^e	10.3±0.72 ^e	4.29±0.28 ^{cde}	79.75±0.40 ^f	0.12±0.18 ^{bc}	14.41±0.72 ^{ab}	0.921±0.009 ^c	43.13±0.18 ^{bc}	7.70±0.06 ^b
B	5.37±0.32 ^a	4.8±0.29 ^a	5.39±0.03 ^f	68.02±0.49 ^b	3.19±0.10 ^f	20.21±0.46 ^f	0.918±0.001 ^c	50.78±0.32 ^e	8.48±0.04 ^{de}
C	11.40±0.53 ^e	10.3±0.48 ^e	3.88±0.03 ^b	81.48±0.37 ^h	0.25±0.03 ^{cd}	20.26±0.46 ^f	0.912±0.001 ^{bc}	41.28±0.06 ^a	7.44±0.01 ^b
D	6.70±0.17 ^b	6.0±0.16 ^b	4.60±0.27 ^e	80.47±0.73 ^{fgh}	0.88±0.03 ^e	14.29±0.25 ^{ab}	0.917±0.001 ^c	48.91±0.67 ^d	8.82±0.01 ^f
E	13.23±0.21 ^f	11.9±0.19 ^f	3.95±0.03 ^{bc}	77.18±0.39 ^d	0.62±0.16 ^{de}	17.05±0.26 ^d	0.905±0.002 ^b	41.51±0.40 ^a	8.73±0.01 ^{ef}
F	10.13±0.15 ^d	9.1±0.14 ^d	4.09±0.01 ^{bcd}	80.38±0.55 ^{fgh}	-0.27±0.21 ^{ab}	15.74±0.73 ^c	0.940±0.006 ^d	41.54±0.48 ^a	5.52±0.08 ^a
G	8.57±0.49 ^c	7.7±0.44 ^c	4.36±0.10 ^{de}	80.03±0.67 ^{fg}	-0.69±0.19 ^a	18.53±0.36 ^e	0.943±0.005 ^d	43.16±0.24 ^c	8.61±0.18 ^{def}
H	4.87±0.29 ^a	4.4±0.26 ^a	5.49±0.03 ^f	78.39±0.42 ^e	0.00±0.20 ^{bc}	15.26±0.36 ^{bc}	0.947±0.001 ^d	51.24±0.83 ^e	7.99±0.01 ^c
J	12.40±0.20 ^{ef}	11.2±0.18 ^{ef}	3.85±0.01 ^b	80.07±0.22 ^{fg}	-0.02±0.34 ^{bc}	14.47±0.66 ^{ab}	0.891±0.001 ^a	49.38±0.15 ^d	8.51±0.09 ^{de}
K	25.27±0.47 ^k	22.7±0.43 ^j	3.81±0.01 ^b	69.50±0.45 ^c	3.12±0.20 ^f	19.33±0.24 ^{ef}	0.885±0.006 ^a	42.03±0.04 ^{ab}	8.42±0.01 ^d
LR	15.47±0.42 ^g	13.9±0.37 ^g	3.43±0.01 ^a	81.18±0.36 ^{gh}	0.12±0.09 ^{bcd}	13.64±0.30 ^a	0.941±0.001 ^d	53.50±0.11 ^f	9.45±0.08 ^g
LT	19.67±0.32 ^h	17.7±0.29 ^h	3.95±0.03 ^{bc}	63.04±0.56 ^a	5.82±0.25 ^g	19.30±0.62 ^{ef}	0.939±0.001 ^d	53.06±0.06 ^f	9.38±0.05 ^g

†Aynı sütundaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$). TTA: Toplam titrasyon asitliği, L^* : Parlaklık renk değeri, a^* : Kırmızı-yeşil renk değeri, b^* : Sarı-mavi renk değeri, LAB: Toplam laktik asit bakterisi, LR: Laboratuvarda rafine unla yapılan ekşihamur örneği, LT: Laboratuvarda tam buğday unuyla yapılan ekşihamur örneği.

LAB tarafından üretilen birincil metabolik ürünler, L-laktik, asetik asit ve az miktarda sitrik ve malik asit olmakla birlikte bunlar içerisinde LAB tarafından üretilen en temel metabolit laktik asittir. Asetik asit ise heterofermentatif LAB tarafından üretilen son ürünlerden biridir. Ekşi hamurların içerdiği laktik asit miktarının, asetik asit miktarına oranının, nihai ürünün aroması üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Salim-ur-Rehman ve ark., 2006). Çalışmadaki TTA sonuçlarından, hamurların içerdiği laktik asit miktarı 4.4–22.7 mL aralığında hesaplanmıştır. Hamurların pH ve titrasyon asitliği miktarları arasında doğrusal bir korelasyon olmadığı; bunun, hamurların toplam asitliğini belirleyen farklı organik asit türlerini değişik miktarlarda içeriyor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ekşi hamurlardaki ortalama pH ve titrasyon asitliği değerlerinin literatürdeki diğer çalışmalarla benzer olduğu görülmektedir (Gül ve ark., 2005; Şimşek ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2011; Dertli ve ark., 2016). Laboratuvarında rafine unla yapılan ekşi hamur örneğinin, tam buğday unuyla yapılabildiğine göre daha düşük asit miktarına ve pH değerine sahip olduğu görülmüştür. Kepek fraksiyonu, LAB'nin gelişmesi için önemli olan mineral ve mikro besin öğelerini yüksek oranda içermektedir. Ayrıca ekşi hamurların içerdiği kül miktarının, fermantasyon sisteminin tamponlama kapasitesini etkilemekte olduğu ve yüksek bir toplam titrasyon aktivitesine neden olduğu bildirilmektedir (Chavan ve Chavan, 2011).

4.1.2. Ekşi hamurların renk değerleri

CIELAB renk ölçümüne göre, L^* (lightness); açıklık-koyuluk, a^* ; yeşilden ($-a$) kırmızıya ($+a$), b^* ; maviden ($-b$) sarıya ($+b$) renk geçişini göstermektedir (Dar ve ark., 2014). Tam buğday unundan ve kepekli undan üretilen LT, B ve K ekşi hamurlarının sırasıyla 63.04, 68.02 ve 69.50 ile en düşük L^* değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Yine bu hamurların en yüksek a^* değerine (sırasıyla 5.82, 3.19 ve 3.12) sahip olduğu tespit edilmiştir. Kepek ve tam buğday unu kullanımının hamurların kırmızılığını artırdığı görülmektedir. Hamurların renklerinde oluşan bu değişiklikler, buğday kepeğinin sahip olduğu polifenol ve karotenoid gibi farklı renklere sahip doğal pigmentlere atfedilebilir (Song ve ark., 2013). Ekşi hamurların b^* değerleri ise 13.64–20.26 arasında olup sarılık özelliklerinin baskın olduğu söylenebilir.

4.1.3. Ekşi hamurların su aktivitesi, nem miktarı ve LAB sayım sonuçları

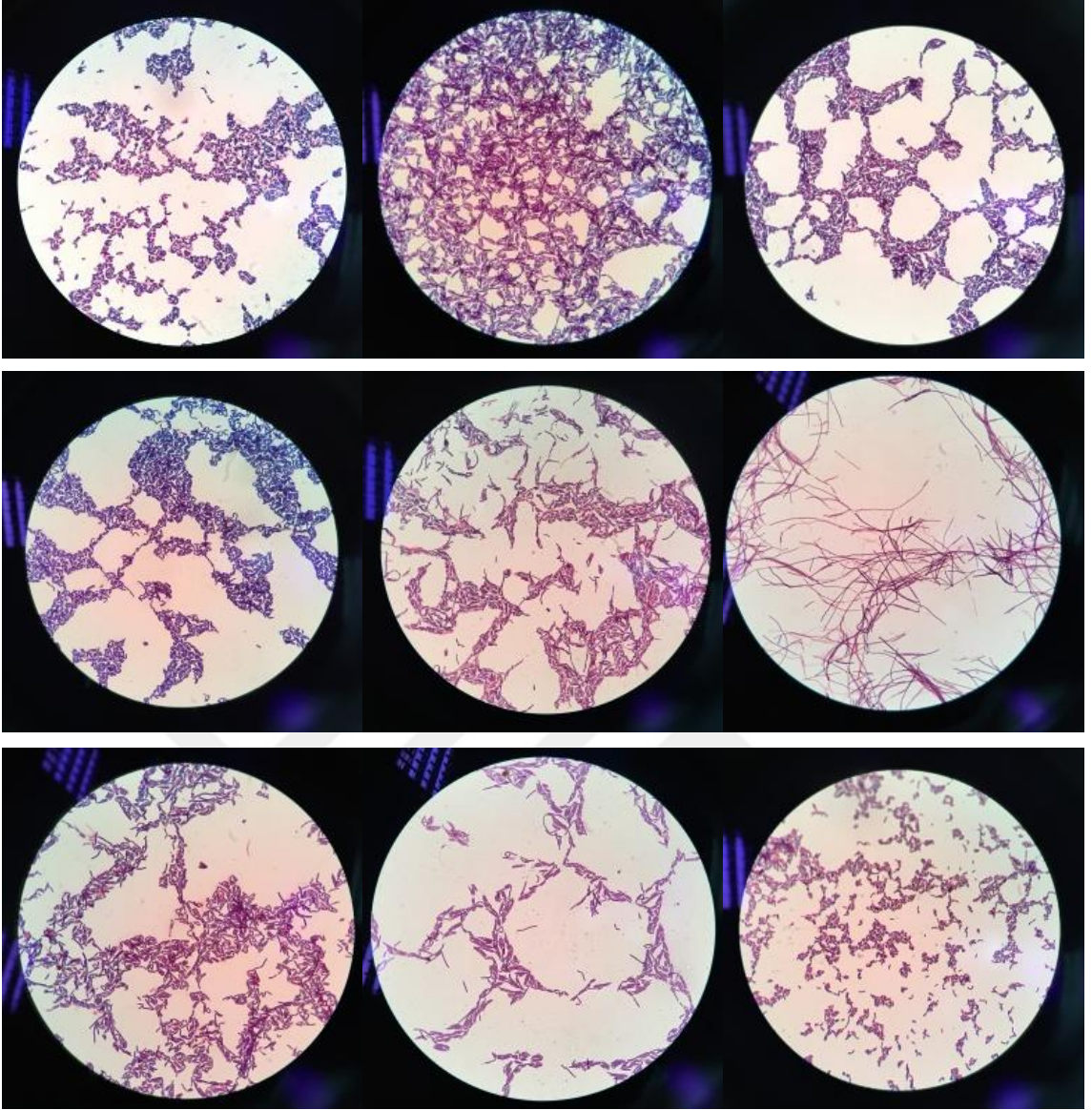
Ekşi hamurlardaki su aktivitesi (a_w) değerinin en yüksek 0.947, en düşük 0.885 olduğu tespit edilmiştir. Hamurların nem içeriği ise %41.28 ila %53.50 arasında farklılık gösterirken, ortalama %46.63 olarak hesaplanmıştır. Hamur verimi 200 olacak şekilde üretilen LR ve LT ekşi hamurlarının sırasıyla %53.50 ve %53.06 ile en yüksek nem değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmadaki sonuçlara benzer olarak Gül ve ark. (2005), farklı fırınlardan topladığı on dört ekşi hamur numunesinin nem içeriklerini %38.7–61.7 olarak tespit etmişlerdir. Hamur veriminin, nem miktarını ve su aktivitesi değerini doğrudan etkilediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda LAB ve mayaların, daha fazla su tutma kabiliyetine sahip metabolitler (örn., ekzopolisakkaritler) üretmeleri ve ayrıca fermantasyon sırasında makromoleküllerin oligomerlere (şekerler, peptitler, aminoasitler, vb.) hidrolitik olarak parçalanması su miktarındaki artışa katkıda bulunabilmektedir (Cevoli ve ark., 2015). Su miktarının artmasıyla, asitlenme hızının da artması beklenmektedir (Decock ve Cappelle, 2005; Chavan ve Chavan, 2011).

Ekşi hamurların toplam laktik asit bakterisi en düşük F hamurunda ve 5.52 log kob/g olarak sayılmıştır. B, D, E, G, J, K, LR ve LT hamurlarında ise 8.00 log kob/g'ın üzerinde laktik asit bakterisi bulunmaktadır. Kendiliğinden mayalanmış hem buğday hem de çavdar ekşi hamurlarında baskın olan mikroorganizmaların 3×10^8 – 3×10^9 kob/g seviyesinde bulunan homofermentatif laktobasil ve pediokoklar olduğu bildirilmiştir (Katina, 2005). Literatürde de piyasadan toplanan çeşitli ekşi hamurlardaki laktik asit bakterisi sayıları 5.28–9.66 kob/g aralığında olduğu görülmektedir (Gül ve ark., 2005; Şimşek ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2011; Dertli ve ark., 2016). Ekşi hamur fermantasyonlarında, 10^8 kob/g'ı aşan bir hücre yoğunluğu beklenmektedir (De Vuyst ve Neysens, 2005). Corsetti (2013), fırıncılık uygulamalarında kullanılan başarılı bir ekşi hamurun metabolik olarak aktif 10^7 – 10^9 cfu/g arası LAB içerdiğini belirtmiştir. En yüksek LAB sayısı 9.45 ve 9.38 log kob/g ile laboratuvarında hazırlanan ekşi hamur örneklerinde bulunmuştur.

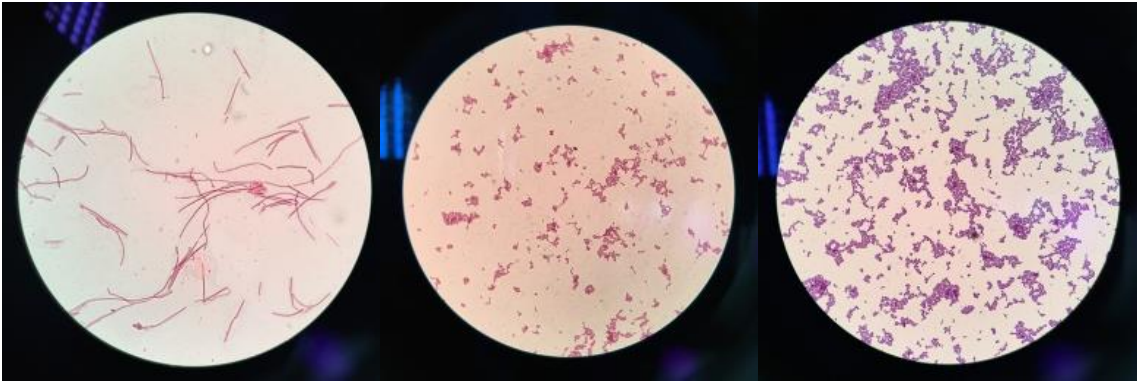
4.2. Ekşi Hamurlardan LAB İzolasyonu ve LAB'nin OD₆₀₀ Ölçüm Sonuçları

Tüm ekşi hamur örneklerinde sayımı yapılan LAB'nden morfolojik olarak farklı görünümüne sahip olduğu düşünülen toplamda 79 LAB kolonisi seçilerek izole edilmiştir. İzole edilen her bir koloni, MRS agar üzerinde sürme yöntemiyle yapılan ilk saflaştırma işleminden sonra Gram boyama ve katalaz testine tabi tutulmuş ve mikroskopik olarak morfolojileri incelenmiştir. Gram pozitif, katalaz negatif veya basil görünümlü olan 47 koloni belirlenmiştir. En az 3, en fazla 7 defa saflaştırma işlemi uygulanan bu kolonilerin, daha sonra DNA'ları ekstrakte edilerek RAPD-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin bakteriyel tanımlaması için 16S rRNA gen sekans analizi yaptırılmıştır. Şekil 4.1'de saflaştırma işlemi uygulanan, Şekil 4.2'de ise değerlendirmeye alınmayan suşlardan bazılarının mikroskop görüntüleri görülmektedir.

OD ölçümleri, bakteri biyokütlesinin oluşturduğu bulanıklığın (türbidite) belirlenmesine dayanan bir tekniktir. Geleneksel kültürel petri sayımlarına alternatif olarak, bakterilerin büyüme parametrelerini tahmin etmek için kullanılmaktadır. Mikrobiyolojideki tahmine dayalı yeni eğilimlerin, gıda ortamlarındaki bakteri aktivitesi değişkenliğinin ölçülmesine odaklanmaya başlamasıyla bu tekniğin kullanımı artmıştır. Bu, özellikle mikrobiyolojik risk değerlendirme çalışmaları için oldukça önemlidir. Bulanıklık, gelen ışık yoğunluğunun, kültür tarafından dağıtılan ışığın yoğunluğuna oranıdır. Yüksek hücre yoğunluklarında ($10^{6.0}$ ila $10^{7.5}$ kob/mL arasında) ölçülen bulanıklık, Beer-Lambert yasasına uygun olarak, hücre konsantrasyonu ile orantılı olmaktadır. Bu orantı, bakterilerin boyutuna ve şekline bağlıdır (Métris ve ark., 2003). Seçilen 47 koloni ve belirlenen OD₆₀₀ değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bakterilerin OD₆₀₀ değerleri en düşük 0.304, en yüksek ise 2.574 olarak okunmuştur. OD₆₀₀ ölçümlerinin, bakterilerin farklı türlerde olmasına, inkübasyon ortamına uyum sağlama becerilerine ve büyüme yeteneklerine göre farklılık gösterdiği düşünülmektedir. 44 koloninin OD₆₀₀ değeri >1.0, 12 koloninin ise >2.0 olduğu tespit edilmiştir. OD₆₀₀ ölçüm sonuçlarına bakılarak, izole edilen suşların büyük bir çoğunluğunun oldukça yüksek canlılık ve üreme kabiliyeti gösterdiği söylenebilir.



Şekil 4.1. Saflaştırma işlemi uygulanan şuslardan bazılarının mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.2. Değerlendirmeye alınmayan şuslardan bazılarının mikroskop görüntüleri.

Çizelge 4.2. Ekşi hamurlardan izole edilen 74 koloni arasından seçilerek saflaştırılan 47 koloninin OD₆₀₀ ölçüm sonuçları*.

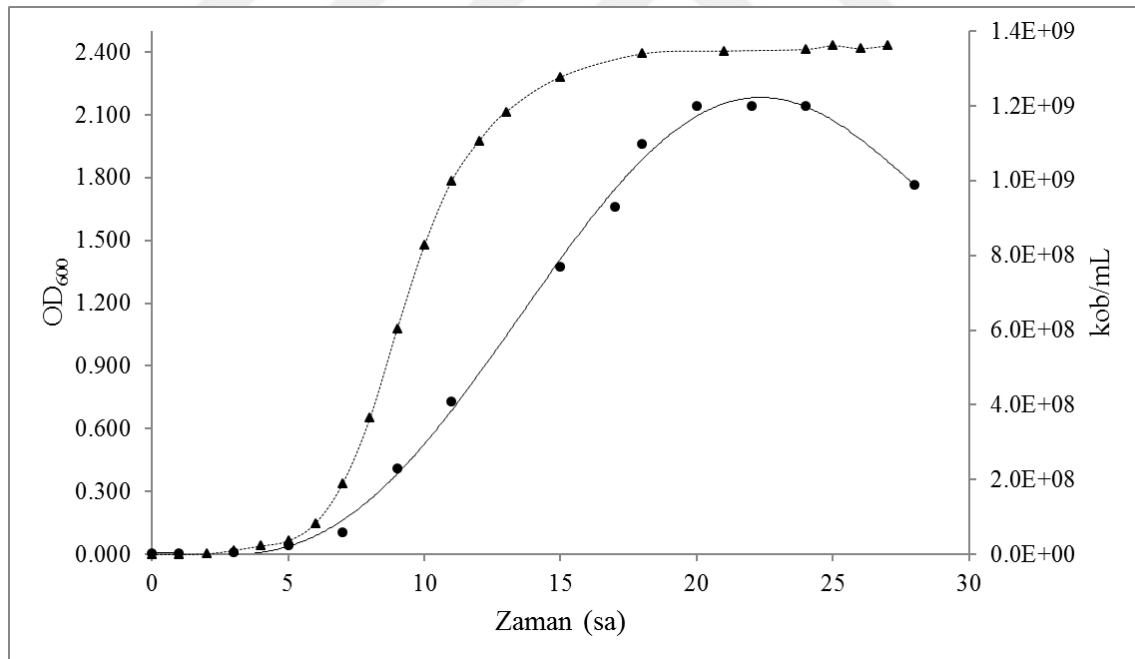
Hamur	İzolat	OD ₆₀₀	Hamur	İzolat	OD ₆₀₀	Hamur	İzolat	OD ₆₀₀	Hamur	İzolat	OD ₆₀₀				
A	A1	1.851±0.006	B	B1-1	1.828±0.011	C	C1	1.709±0.008	D	D1-1	1.049±0.055				
	A2			B1-2	1.762±0.004					D1-2		1.752±0.007			
	A3-1			B2	1.714±0.006					D2-1-1		1.793±0.007			
	A3-2			B3						D2-2-2		1.307±0.014			
	A4			B4-1	1.744±0.009					C2-2		1.927±0.003	D2-2	1.503±0.006	
	B4-2	1.764±0.006	C3		D3										
										D4-1					
										D4-2					
E	E1-1	0.316±0.002	F	F1	2.574±0.006	G	G1	0.712±0.004	H	H1	2.559±0.007				
	E1-2									F2	2.541±0.011	G2	0.304±0.004	H2-1	1.352±0.003
	E2-1													F3	1.472±0.010
	E2-2									F4	1.472±0.010	G4	0.304±0.004		
	E3-1-1													F5	1.472±0.010
	E3-1-2									F5	1.472±0.010	G4	0.304±0.004		
	E3-2-1														
	E3-2-2													H4-2	1.074±0.008
E4															
J	J1	1.421±0.007	K	K1	2.309±0.007	LR	LR1	1.797±0.002	LT	LT1	2.503±0.012				
	J2	1.657±0.006		K2	1.587±0.013					LR2		1.842±0.001	LT2-1	2.521±0.003	
	J3	2.359±0.003		K3						LR3-1-1			1.797±0.002	LT2-2	1.584±0.004
	J4	1.744±0.002		K4						LR3-1-2		1.842±0.001	LT3	2.539±0.006	
	J5	1.478±0.016		K5	1.349±0.020					LR3-2			LT4	2.510±0.004	
	J6	2.437±0.002		K6-1	2.387±0.005					LR4					
	J7			K6-2	1.561±0.007					LR5					
				K6-3-1	1.535±0.005										
				K6-3-2	2.433±0.007										
				K7											

*ortalama değer ± standart sapma, n=3.

4.3. *L. plantarum*'un Büyüme Kinetiği

16S rRNA gen sekanslama sonuçlarına göre *L. plantarum* olarak belirlenen suşlar, 37°C'de 24 saat süreyle MRS sıvı besiyerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yapılan kültürel sayım sonucunda en yüksek canlı hücre popülasyonuna ve aynı zamanda OD₆₀₀ değerine sahip olan suş seçilerek büyüme kinetiği, biyokütle özellikleri ve ekşi hamur oluşturma kabiliyeti araştırılmıştır. Ayrıca bu suşun yağsız süt ortamında farklı kriyoprotektanlar eşliğinde dondurarak kurutulmasıyla toz kültürleri elde edilmiştir.

MRS sıvı besiyerinde 37°C'de *L. plantarum* gelişimi 28 saat boyunca takip edilerek, belirli zaman aralıklarında kültürel sayımları ve optik yoğunlukları belirlenmiştir. Elde edilen verilerle zamana karşı çizilen *L. plantarum*'un gelişme ve OD₆₀₀ eğrileri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Grafikten de görüleceği gibi, *L. plantarum* gelişimi; yaklaşık 3–4 saatlik bir lag (gecikme) fazının ardından 18 saat süren eksponansiyel (logaritmik) faz ve daha sonra da 4 saat süren durağan (stasyoneryer) faz ile özetlenebilir.



Şekil 4.3. MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 28 saat boyunca anaerobik şekilde inkübe edilen *L. plantarum*'a ait büyüme ve OD₆₀₀ eğrileri (---▲---OD₆₀₀, • cfu/ml, — polinom uyumlaması(fit))

Yeni hazırlanmış bir besiyerine inoküle edilen hücreler, bu yeni ortama adapte olana kadar hücre kütlelerinde ve sayısında artış gözlenmemektedir. Hücrelerin ortama adaptasyonu sırasında geçen bu süre gecikme veya lag fazı olarak adlandırılmaktadır. Lag

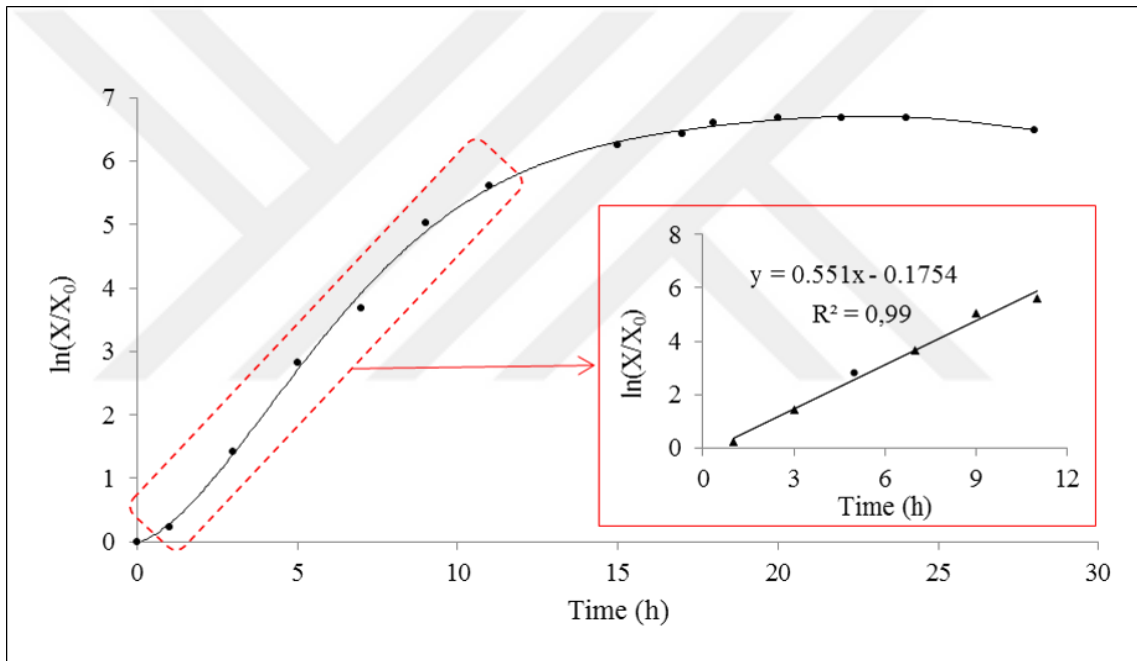
fazının uzunluğu, mikroorganizmanın yaşı ve hasarlı olup olmadığı gibi fiziksel durumunu etkileyen faktörlere, daha önce saklandığı ortam koşullarına ve yeni inoküle edildiği besiyerinin doğasına bağlı olarak değişebilmektedir (Tunail, 2009). Kültüre alınan mikroorganizma metabolik olarak aktifse, yani ekspanansiyel fazda ise lag fazının süresi daha kısa olmaktadır. Şayet mikroorganizma daha düşük aktiviteye sahipse, yani durağan fazındaysa lag fazının süresi uzamaktadır (Mellefont ve ark., 2003).

Bu çalışmada kullanılan *L. plantarum* suşu, dondurulmuş kültürden alındıktan sonra 18-20 saat boyunca aktifleştirilerek termal şok oluşumu en aza indirilmeye çalışılmıştır. Aktifleşen kültürlerin, tekrar yeni kültür ortamına aktarılması sonucunda 3-4 saatlik bir lag fazı sergilediği görülmüştür. Bu, hücrelerin yeni ortama adaptasyonu için gerekli olan süredir. Endüstriyel üretimler için uzun bir süre gibi görünse de, ortama aktif kültürler ilave edilerek lag fazının kısaltılması veya sürekli kültür ortamında lag fazına ihtiyaç kalmadan log fazına geçilmesi mümkün olmaktadır.

Büyüme hızının kademeli olarak arttığı kısa bir dönemi takiben, hücrelerin sabit ve maksimum bir büyüme gösterdiği süreç, log veya ekspanansiyel faz olarak bilinmektedir. Ekspanansiyel faz sırasında, hücreler iki katına çıkarak gelişmektedirler. Zamana bağlı oluşan yeni organizma sayısı, mevcut popülasyonla orantılıdır. Başka bir deyişle, biyokütle konsantrasyonundaki artış, başlangıçtaki biyokütle konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu aşamadaki büyüme oranı, mikroorganizma türüne ve gelişme koşullarına (besin konsantrasyonu, havalandırma vb.) bağlıdır (Prado Barragán ve ark., 2016; Stanbury ve ark., 2017). Bu çalışmada *L. plantarum*'un lag fazı ile durağan fazı arasında 18 saatlik bir gelişme evresi olduğu gözlenmiştir. Ancak bu süre zarfı içerisinde 10 saat boyunca hücre popülasyonunun sabit hızla arttığı tespit edilmiş ve buna göre kinetik hesaplamaları yapılmıştır.

L. plantarum'un durağan fazı yaklaşık olarak 4 saat sürmüş ve sonrasında ölüm fazına geçtiği görülmüştür (Şekil 4.3). Durağan fazda, besin maddelerinin konsantrasyonunun azalması ve bakteriler tarafından sentezlenen metabolitler, bakteri gelişimini durdurmaktadır ve bunun sonucunda gelişme eğrisinde yatay ve oldukça düz bir çizgi oluşmaktadır. Yetersiz besin ortamı popülasyonun gelişimini oldukça azaltmaktadır. Bunun yanı sıra, bakterilerin karbonhidrat kaynaklarını fermente ederek, laktik asit ve diğer organik asitleri sentezlemeleri sonucunda oluşan bu asitlik ile kendi gelişimlerini inhibe etmeleri söz konusudur. Ayrıca, bilhassa fermantasyon yapan anaerobik bakterilerin çok çeşitli toksik maddeler üretmesi ve oluşan tüm bu metabolitlerin statik kültürlerde uzaklaştırılmasının mümkün olmaması nedeniyle

öncelikli olarak duyarlı hücrelerin ölümü gerçekleşmektedir. Daha dayanıklı olan hücreler, depo maddelerini ve proteinleri kullanarak yaşamlarını sürdürebilecek kadar az bir enerji sağlayıp canlı kalmaktadırlar. Bu nedenledir ki, bu fazda, hücre bölünmesi ile hücre ölümü arasında kurulan denge ile toplam mikroorganizma sayısı uzunca bir süre değişmeden sabit bir şekilde kalmaktadır (Tunail, 2009). Büyüme eğrisinin son aşaması, net bir hücre kaybı ile karakterize edilen ölüm aşamasıdır. Ölüm aşamasında bile, metabolize olan ve bölünen bireysel hücreler olabilmekte, ancak çok daha fazla canlı hücre kaybı söz konusudur. Ölüm fazı çoğunlukla logaritmiktir, ancak hücre ölüm hızı eksponansiyel fazdaki büyüme hızından genellikle daha yavaş olmaktadır (Maier ve Pepper, 2015).



Şekil 4.4. MRS sıvı besiyerindeki 37°C'de 28 saat boyunca izlenen *L. plantarum* gelişiminin doğal logaritması ve μ değerinin (spesifik büyüme oranı) hesaplanması (\bullet : $\ln(X/X_0)$, $-$: polinom uyumu).

e (Euler sayısı, $e=2.71828\dots$) temelli logaritmik fonksiyonlar doğa bilimlerinde daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir e -fonksiyonuna matematiksel olarak "doğal logaritmik fonksiyon" denmektedir (Widdel, 2007). Bu amaçla, *L. plantarum*'un relatif popülasyon büyüklüğünün doğal logaritması alınarak zamana karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 4.4). Logaritmik büyüme fazındaki eğrinin eğimi *L. plantarum*'un spesifik (özgül) büyüme hızını vermektedir ve μ_{\max} 0.551 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır. Buna dayanarak; *L. plantarum*'un ikilenme (jenerasyon) süresi (g veya t_d) aşağıdaki denklikten 1.26 sa olarak hesaplanmıştır:

$$X_1 = 2X_0 \quad \mu = \frac{\ln 2}{t_d} \quad t_d = \frac{0.693}{0.55 \text{ s}^{-1}} \quad t_d = 1.26 \text{ sa}$$

Bu, *L. plantarum* hücrelerinin, metabolik olarak en aktif olduğu yani büyüme hızının en fazla olduğu fazda, 1.26 saatte (~76 dk) bir bölündüğü anlamına gelmektedir. Oluşan yeni hücrelerin tekrar olgunlaşıp bölünmesi için geçen süre jenerasyon süresini vermektedir. Bu süre sonunda hücre popülasyonunun 2 katına çıktığı yorumu yapılabilir. Log fazındaki jenerasyon sayısı (n), yaklaşık 10 sa süren toplam logaritmik faz süresinin, 1.26 sa süren jenerasyon süresine oranlanması ile 8 olarak hesaplanmıştır:

$$n = \frac{\Delta t}{g} = \frac{\Delta t}{t_d} = \frac{10 \text{ s}}{1,26 \text{ s}} \quad n \cong 8$$

MRS sıvı besiyeri ortamında ve 37°C sıcaklıkta, *L. plantarum* eksponansiyel fazı süresince 8 jenerasyon üremiştir. Yani başka bir deyişle, bu süre zarfında mevcut popülasyon 8 defa iki katına çıkmıştır. Mikroorganizmaların bölünme ve gelişme hızı aynı olmamaktadır, her bir mikroorganizma için aynı koşullar sağlansa bile, cinslerin veya türlerin genetik özelliklerine bağlı olarak gelişme hızı da değişmektedir (Tunail, 2009). Çizelge 4.3'te bazı mikroorganizmaların optimum koşullardaki gelişme hızlarına örnekler verilmiştir.

Çizelge 4.3. Bazı mikroorganizmaların optimum koşullardaki gelişme hızları (Tunail, 2009).

Mikroorganizma	Jenerasyon süresi
<i>Escherichia coli</i>	20 dk
Pek çok toprak bakterisi	60–150 dk
Hızlı gelişen ve asit oluşturan <i>Rhizobium</i> türleri	2–4 sa
Yavaş gelişen ve alkali oluşturan <i>Rhizobium</i> türleri	6–7 sa
<i>Nitrosomonas</i> ve <i>Nitrobacter</i> türleri	5–10 sa
<i>Mycobacterium</i>	12–18 sa

Eksponansiyel faz sırasında fazla besin içeren ortamlarda mikroorganizmalar maksimum spesifik büyüme hızında (μ_{\max}) büyürler. μ_{\max} değerinin kinetik ölçümünün yapıldığı geçerli koşullar altındaki maksimum büyüme hızı olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle μ_{\max} değeri besiyeri bileşimi, pH ve sıcaklık gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Stanbury ve ark., 2017). *Lactobacillus* türlerinin optimum gelişimi için,

bir karbon kaynağının, amino asitlerin, peptitlerin, yağ asitlerinin, vitaminlerin ve nükleik asitlerin bulunduğu bir büyüme ortamı gerekmektedir. Bu ortam, de Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) olarak bilinen standart bir laboratuvar besiyeri ile sağlanabilmektedir. Temel azot kaynağı olarak sığır eti, maya özü ve pepton içeren MRS ortamı, laboratuvar çalışmaları için *Lactobacillus* cinsi de dahil olmak üzere laktik asit bakterilerinin büyümesini desteklemek için kullanılmaktadır (Mis Solval ve ark., 2019). Bu çalışmada, araştırılan *L. plantarum* türüne ait büyüme kinetiği sonuçlarının kaynak olabilmesi amacıyla, gelişimi esnasında optimum besiyeri ortamını sağlayacak MRS besiyeri kullanılmıştır. *L. plantarum* için elde edilen bu sonuçlar referans olarak kabul edilerek, gelecek çalışmalarda besiyeri ortamında veya gelişme sıcaklıklarında yapılacak değişiklikler ile farklı kinetik modellerin oluşturulmasına temel sağlayacaktır.

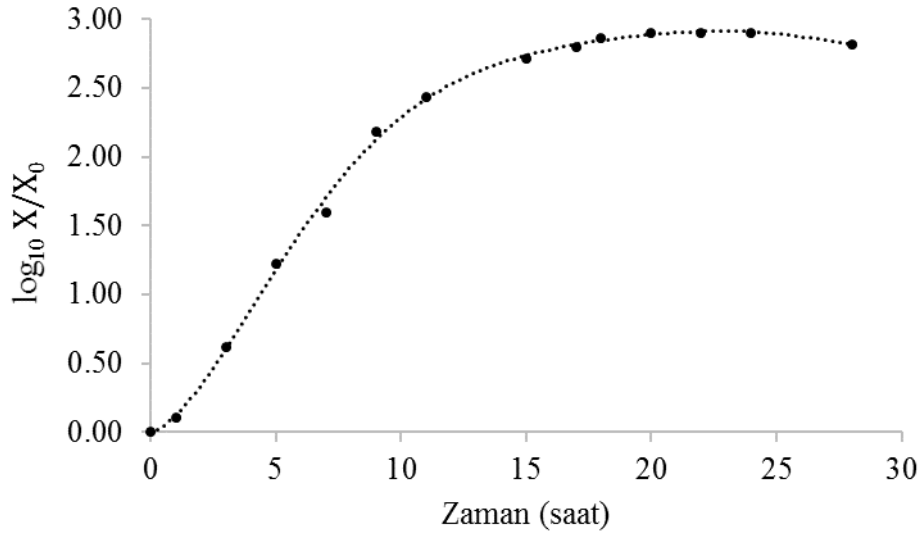
Mikrobiyal büyüme sırasında hücre sayısı konsantrasyonundaki artışın kuru biyokütle konsantrasyonundaki artışa eşdeğer olması beklenmektedir. Ancak, hücre sayımı ve biyokütle ölçümlerinden elde edilen büyüme parametreleri genellikle eşdeğer olmamaktadır (Egli, 2009). Bu durum, büyük hücre popülasyonlarında hücrelerin gelişimi sırasında protein, DNA, RNA ve ortalama hücre hacmi gibi değişkenlerin artış hızlarının farklı olmasıyla açıklanabilir. Aynı zamanda, bölünme aşamasına ulaşan tek bir hücrenin daha büyük boyutlarda ve yeni oluşan hücrelerin daha küçük boyutlarda olmasından da etkilenebilmektedir. Ayrıca hücre büyümesinin ölçülme tekniğinin büyüme eğrisinin şeklini etkilediği de görülmektedir. Örneğin, büyüme kültürel plak sayımları yerine optik yoğunluk ile ölçüldüğünde (Şekil 4.3'teki iki eğri karşılaştırıldığında), ölüm fazının başlangıcı kolayca tespit edilememektedir. Bu yaklaşımların, hücre gelişimini ölçmek için yaygın olarak kullanılmasının nedeni ise, mikrobiyologların en çok ilgi duydukları büyüme fazlarının, lag fazı, log fazı ve durağan fazın başlangıcı olmasıdır (Maier ve Pepper, 2015).

4.4. *L. plantarum*'un Biyokütle Özellikleri

4.4.1. Biyokütle üretkenliği

Lactobacillus plantarum durağan faza ulaştığında bakteri sayısındaki maksimum artış $2.9 \log_{10}$ kob/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.5). MRS sıvı besiyerinde 37°C 'de 28 saat süren inkübasyon boyunca üretilen biyokütleyle ait özellikler Çizelge 4.4'te özetlenmiştir. 24–28 saatlik inkübasyon sonunda *L. plantarum* tarafından üretilen toplam

biyokütle ortalama 9.19 g/L olarak belirlenmiştir. *L. plantarum*'un biyokütle üretkenliği (φ), 20 saatlik kültivasyon için 0.460 g/L·sa olarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.6). Yine aynı eşitlikten, yalnızca logaritmik büyüme fazındaki biyokütle üretkenliği, yani maksimum özgül üretkenlik ise 1.08 g/L·sa olarak hesaplanmaktadır.



Şekil 4.5. *L. plantarum*'un logaritmik (\log_{10}) relatif büyüme eğrisi

Mechmeche ve ark. (2017) MRS sıvı besiyeri içerisinde *L. plantarum* biyokütle konsantrasyonunu 2.024 g/L, özgül büyüme hızını 0.363 sa^{-1} ve biyokütle üretkenliğini ise $0.252 \text{ g/L}\cdot\text{sa}$ olarak bulmuşlardır. Bu çalışmaya benzer bir şekilde Giraud ve ark. (1991), *L. plantarum*'un büyüme hızını 0.57 sa^{-1} , nihai biyokütle konsantrasyonunu 9.5 g/L ve üretkenliğini ise $1.05 \text{ g/L}\cdot\text{sa}$ olarak bildirmişlerdir, ancak bu sonuçları 30°C 'de 20 saatlik bir inkübasyon sonucunda elde etmişlerdir. Mikroorganizmaların logaritmik büyüme hızı, besin konsantrasyonu, pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu ve hücreler tarafından üretilen metabolitler gibi birçok faktöre bağlı olmaktadır (Najafpour, 2007). Bu nedenle, bakterilerin cinsi ve türü, kültür ortamının içeriği ve pH'sı, inkübasyon süresi ve sıcaklığı doğrudan büyüme kinetiği verilerini değiştirebildiği görülmektedir. *Lactobacillus bulgaricus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*'un büyüme kinetiklerinin araştırıldığı bir çalışmada, peynir altı suyu ile zenginleştirilmiş bir kültür ortamında 24 saat inkübasyon sonunda üretilen biyokütle miktarı sırasıyla 4.2, 3.9, 3.1, 2.4 ve 2.5 g/L olarak bulunmuştur. Bu bakterilerin 12 saatlik fermantasyonundaki maksimum spesifik büyüme hızlarının ise, sırasıyla 0.250, 0.231, 0.183, 0.183 ve 0.324 sa^{-1} olduğu bildirilmiştir (Rezvani ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, farklı karbon

kaynakları ilave edilmiş MRS sıvı besiyerinde *L. plantarum*'un maksimum spesifik büyüme hızı en yüksek 0.627 sa^{-1} olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada, biyokütle üretkenliği 24 saatlik kültivasyon süresince $0.148\text{--}0.240 \text{ g/L}\cdot\text{sa}$ arasında değişiklik göstermiştir (Georgieva ve ark., 2009). İrlanda kahverengi deniz yosunu içeren MRS sıvı besiyeri ortamında 37°C 'de 24 saat boyunca fermente edilen *L. plantarum* sayısındaki maksimum artış 3.9 log cfu/mL olarak tespit edilmiştir (Gupta ve ark., 2011). Literatürden anlaşılacağı üzere, MRS ortamına yapılan çeşitli katkıların *L. plantarum* büyüme hızını etkilediği görülmektedir.

Çizelge 4.4. *L. plantarum*'un büyüme kinetiği parametreleri ve biyokütle özellikleri

Büyüme Kinetiği Parametreleri			Biyokütle Özellikleri*			
μ_{max}	(sa^{-1})	0.551	Üretim	Yaş ağırlık	(g/L)	9.19 ± 1.12
	g	1.26		Kuru madde	(%)	23.33 ± 0.42
	n	8		Kuru hücre ağırlığı	(g/L)	2.14 ± 0.26
φ	(g/L·sa)	0.460	Partikül boyutu	D _{3,2}	(μm)	2.48 ± 0.18
	φ_{max}	1.080		D _{4,3}	(μm)	4.38 ± 0.92
				D ₅₀	(μm)	4.36 ± 0.43
				D ₉₀	(μm)	9.01 ± 1.57

* ortalama \pm standart sapmadır (n = 3).

4.4.2. Biyokütlenin partikül boyut dağılımı

Partikül boyut ölçümleri genellikle lazer kırınımı ve dinamik ışık saçılımı (DLS) gibi ışık saçılmasını esas alan yöntemlerle yapılmaktadır (Jonasz ve Fournier, 2007). Sulu süspansiyondaki küçük parçacıkları karakterize etmek için kullanılan DLS'nin sık kullanılan biyofiziksel teknikler arasında olduğu bildirilmiştir. Brownian hareketini model alan DLS sistemleri, bir süspansiyondaki parçacıklar tarafından sabit bir açıyla dağılan ışığın yoğunluğunu ölçmeye dayanmaktadır. Mie ışık saçılımı teorisini kullanan lazer kırınım yönteminde ise, saçılan ışığın yoğunluğundaki açısal değişim ölçülmektedir. Her iki yöntem de parçacığın boyutlarına ve optik özelliklerine, dolayısıyla bileşenlerin yapısına ve kırılma indisine bağlıdır (Anonim, 2015; Sarra ve ark., 2020). Kırılma indisi, faz kontrast mikroskopisi ve akış sitometrisi gibi biyolojik ölçümler için de önemlidir. Işık saçılma teknikleri kullanılarak inorganik ve organik partiküllerin boyutlarının belirlenmesi için bir kırılma indisi tahmini gereklidir (Hart ve Leski, 2006).

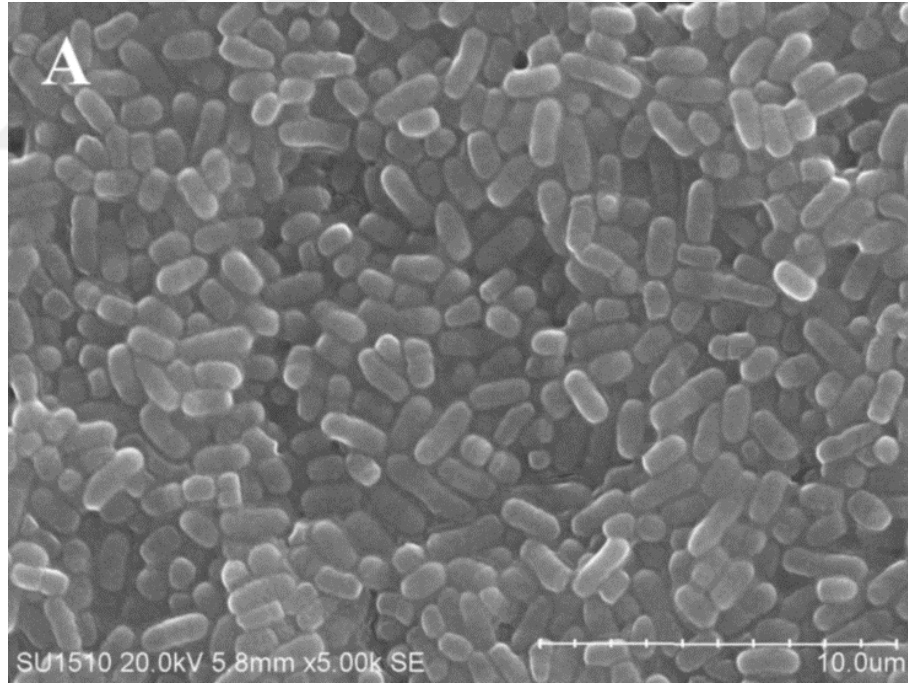
Bakterilerin kırılma indekslerini belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *Bacillus cereus*, *B. mycoides* ve *B. megaterium* vejetatif hücrelerinin ve sporlarının kırılma indislerini sırasıyla 1.386–1.400 ve 1.512–1.540 aralığında bulunmuştur (Ross ve Billing, 1957). Liu ve ark. (2014) *E. coli*'nin kırılma indisini 1.388 olarak bildirmiştir. *L. plantarum*'un kırılma indisine literatürde rastlanmamıştır. Bununla birlikte, Ross (1955, 1957), *L. bulgaricus*'un ortalama kırılma indisinin 1.404 olduğunu bildirmiştir. *L. plantarum*'un *L. bulgaricus* ile aynı cins olması nedeniyle bu çalışmadaki partikül boyut analizi için kırılma indisi 1.404 olarak kabul edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan partikül boyut analizörü, yukarıda bahsedilen lazer kırınımı tekniği ile çalışmaktadır. Biyokütle parçacık boyutu ölçümü tahmininde kullanılan, yüzey alanı ortalama çapı ($D_{3,2}$), hacim ortalama çapı ($D_{4,3}$), hacme dayalı medyan (D_{50}) ve D_{90} değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Medyan değeri, popülasyonun yarısının boyutunun bu noktanın üzerinde ve yarısının ise bu noktanın altında olduğu değer olarak tanımlanmaktadır. $D_{3,2}$ değeri (aynı zamanda Sauter Ortalama Çapı olarak da adlandırılır) ortalama yüzey alanını vermektedir. $D_{4,3}$ değeri ise (De Brouckere Ortalama Çapı olarak da adlandırılır) parçacıkların hacimsel ortalama çapını göstermektedir. Boyut dağılımındaki ince partiküllerin oranının belirlenmesinde, hassasiyetin yüksek olması nedeniyle $D_{3,2}$ ölçümü önerilmiştir. Diğer taraftan, kaba partiküllerin oranının belirlenmesi için $D_{4,3}$ daha uygun bir ölçümdür (Anonim, 2015). *L. plantarum* biyokütlesinin yüzey alanı ortalama çapı, $D_{3,2}$ ve hacim ortalama çapı, $D_{4,3}$ sırasıyla 2.48 ve 4.38 μm olarak bulunmuştur. *L. plantarum* hücrelerinin boyutunun 0.9–0.12 μm genişliğinde ve 3–8 μm uzunluğunda olduğu belirtilmiştir (Hammes ve Vogel, 1995; Landete ve ark., 2010; Corsetti ve ark., 2016). Elde edilen $D_{4,3}$ değerinin literatürde belirtilen *L. plantarum* boyutları ile daha uyumlu olduğu görülmektedir. Partikül boyutu dağılımındaki D_{50} değeri 4.36 μm olarak ölçülmüştür. Bu, popülasyonun %50'sinin bu değer altında, %50'sinin ise bu değer üstünde olduğu anlamına gelmektedir. Bu noktada, popülasyonun çoğunluğu hakkında bilgi vermesi nedeniyle D_{90} ölçümü önemli bir hale gelmektedir. Biyokütlenin D_{90} değerinin, yani hücre popülasyonunun %90'ının, 9.01 μm 'den daha küçük olduğu tespit edilmiştir. Partikül boyutu ölçüm sonuçlarının, *L. plantarum*'un hücre boyutu sınırları içinde olduğu görülmektedir. Bakteriyel biyokütlenin hücre boyutlarının belirlenmesi için parçacık boyutu dağılım analizinin kullanımına literatürde rastlanmamıştır. $D_{4,3}$ değerinin hücre boyutunun belirlenmesinde daha doğru sonuçlar verdiği düşünülmektedir. Sonuç olarak, ortalama hücre büyüklüğünü belirlemek için lazer kırınımı yöntemiyle parçacık

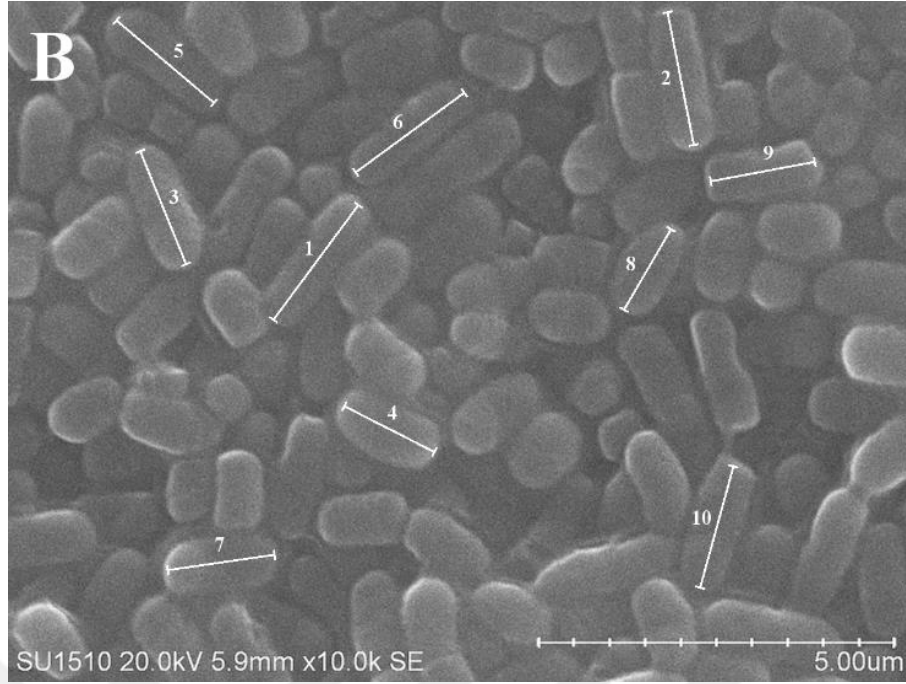
boyutunun analiz edilmesi, kullanım kolaylığı nedeniyle uygulanabilir bir yöntem olarak önerilebilir. Bununla birlikte, bu yöntemin farklı mikroorganizmalar ile test edilmesi ve diğer hücre boyutu belirleme yöntemleriyle karşılaştırılarak doğrulanması gerekmektedir.

4.4.3. Biyokütlenin SEM görüntüsü ve boyut ölçümü

L. plantarum'a ait SEM mikrografları Şekil 4.6 ve 4.7'de gösterilmiştir. Görüntülerde, literatürde belirtildiği gibi yuvarlak uçlu çubuk şeklinde olduğu açıkça görülmektedir (Hammes ve Vogel, 1995; Landete ve ark., 2010; Corsetti ve ark., 2016). Görüntü B'den rastgele seçilen 10 farklı hücrenin büyüklüğü ölçülmüştür ve 1.318–2.004 μm aralığında bulunmuştur. Bu sonuçlar, ortalaması $1.685 \pm 0.229 \mu\text{m}$ olan *L. plantarum* hücrelerinin kuruması sonucunda yaklaşık % 19–38 oranında küçüldüğünü göstermektedir. Yine bu çalışmada bakteri biyokütlesinin kuru madde miktarı %23.33 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.6. (A) Kurutulmuş *L. plantarum* hücrelerinin 5000x büyütme oranında SEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 10 μm .



Şekil 4.7. (B) Kurutulmuş *L. plantarum* hücrelerinin 10000x büyütme oranında SEM görüntüsü*. Ölçek çubuğu: 5 μm

*Şekil 4.9 de ölçülen bakteri büyüklükleri

Ölçüm μm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2.004	1.900	1.715	1.429	1.795	1.894	1.525	1.318	1.496	1.770

Bratbak ve Dundas (1984) tarafından bakteri hücrelerinin kuru ağırlık/yaş ağırlık oranının belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada, bakteriyel kuru ağırlığın yaklaşık %20 olduğu ve bakteriyel peletlerdeki toplam suyun %60'ından fazlasını hücreler arası suyun oluşturduğu bildirilmektedir. Ayrıca bu varsayıma dayanarak, bakteri hücrelerinin kuru madde içeriğinin kabaca yaklaşık %38 olarak hesaplanacağını belirtmişlerdir. Bu çalışmadaki SEM mikrograflarından elde edilen ölçüm sonuçları da bu bilgiyi destekler niteliktedir.

4.5. *L. plantarum* ile Yapılan Tip II Ekşi Hamur Denemesi Analiz Sonuçları

4.5.1. Hamur asitliği ve pH'sı

L. plantarum inoküle edilerek oluşturulan hamurlar 30°C ve %80 bağıl nem ortamında 1, 15, 20 ve 25 saat boyunca fermente edilmiş ve hamurların asitlik gelişimi takip edilmiştir. Hamurlara ait pH ve TTA değişimleri Çizelge 4.5 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Hamur pH'sının başlangıçta 6.24 iken, 15. saatin sonunda 4'ün altına

düştüğü görülmektedir. 15. saatten sonra pH'da önemli bir değişiklik olmadığı için, ekşi hamurun sadece pH'ya dayanan 15 saatlik bir fermantasyon ile üretilebileceği varsayılabilir. Bununla birlikte, pH ölçümlerini TTA sonuçları ile birlikte yorumlamak daha makul bir yaklaşımdır. Hamurun TTA değeri 15 saatte %8'lik bir artış göstererek, 2.0 ml'den 10 ml NaOH'e yükselmiş ve 25. saatin sonunda ise 11.8 mL NaOH olarak belirlenmiştir. TTA artışı lezzet gelişimini ve istenen ekşi hamur özelliklerini sağlamaktadır.

Çizelge 4.5. *L. plantarum* ile yapılan tip II ekşi hamurlarda asitlik gelişimi takibi[†]

Fermentasyon süresi (saat)	pH	TTA (%)	LA (%)
0	6.24±0.01 ^d	2.00±0.00 ^a	1.80±0.00 ^a
1	6.16±0.01 ^c	2.60±0.14 ^b	2.34±0.13 ^b
15	3.95±0.01 ^b	10.00±0.14 ^c	9.00±0.13 ^c
20	3.90±0.01 ^{ab}	10.80±0.00 ^d	9.72±0.00 ^d
30	3.86±0.00 ^a	11.75±0.01 ^e	10.58±0.06 ^e

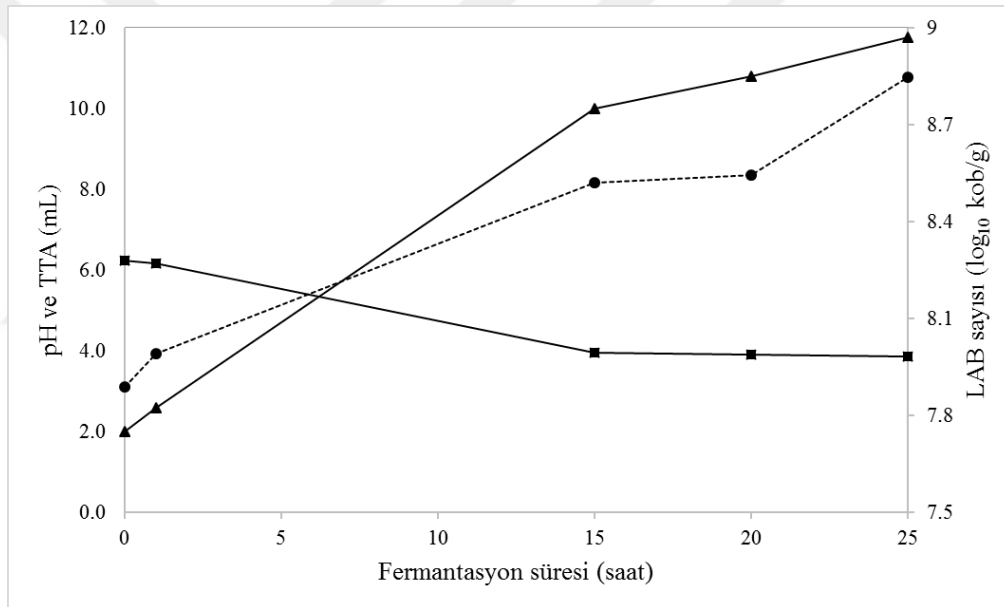
[†] ortalama değer ± standart sapma (n=3). Aynı sütundaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). TTA: Toplam titrasyon asitliği, LA: Laktik asit miktarı

Salim-ur-Rehman ve ark. (2006) homo ve heterofermentatif LAB tarafından üretilen organik asitlerin, hamurun pH'sını düşürerek asitlendirmesinin yanında ekmek hamuru aromasına da katkıda bulunan lezzet bileşikleri olduğunu bildirmişlerdir. De Vuyst ve Neysens (2005), ekşi hamur üretiminin doğrudan yöntemle (tip II) 2 ila 5 gün arasında sürdüğünü, ancak süreci hızlandırmak için genellikle 30°C'nin üstündeki yüksek fermantasyon sıcaklıklarının uygulandığını bildirmiştir. Bu şekilde 24 saatlik fermantasyondan sonra ekşi hamurların pH'sı 3.5'e düşmekte ve hamurlar yüksek asitlik içeriğine ulaşmaktadır.

4.5.2. Ekşi hamurlardaki LAB sayısı

L. plantarum'un baskın olduğu hamurların asitlik ile birlikte LAB gelişimi Şekil 4.8'de gösterilmektedir. LAB hücre sayılarının, 25 saatlik fermantasyonun sonunda toplamda 1 log₁₀ kob/g arttığı görülmektedir. Benzer olarak, Li ve ark. (2015) tarafından *L. plantarum* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte kullanıldığı bir çalışmada, 24 saatlik fermantasyon sonrasında LAB'nin yaklaşık 1 log arttığı bildirilmiştir.

Hamurların fermantasyonunda 15. ve 20. saatler arasındaki LAB sayısındaki artış istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p < 0.05$). *L. plantarum*'un diğer LAB'den daha yüksek asit toleransı nedeniyle sebze fermantasyonunu sonlandırdığı bildirilmektedir (Fleming, 1984; Lu ve ark., 2003). *L. plantarum*, yüksek asit toleransına sahip olması nedeniyle fermantasyonlarda baskın mikroorganizma haline gelebilmektedir. 15. ve 20. saatler arasındaki sabit hücre sayısı, hızla artan asit ortamında yan mikrofloranın canlılığını kaybetmesi ile açıklanabilir. Ekmek yapımı sırasında, basil ve klostridya gibi bakteriler tarafından oluşabilecek çevresel kontaminasyonun da ürünün asitliği ile inhibe edilebileceği bildirilmektedir. Her ne kadar LAB'nin inhibe edici etkisinin ana faktörü ekşi hamurun asitlik seviyesi olsa da, bakteriyosinler gibi faktörler de bu tür antimikrobiyal aktiviteye önemli ölçüde katkı sağlamaktadır (Corsetti ve Settanni, 2007).



Şekil 4.8. 25 saatlik fermantasyon boyunca *L. plantarum* ile hazırlanan hamurların pH, TTA ve hücre sayılarındaki değişimler (—■— pH, —▲— TTA (mL), ---●--- log₁₀ kob/g).

Hamurların LAB hücre sayısının 20–25 saat arasında ise 0.3 log₁₀ kob/g arttığı görülmüştür. Bu artışın nedeni olarak, tamamen baskın hale geçen *L. plantarum*'un gelişimine devam etmesi söylenebilir. De Vuyst ve Neysens (2005), homofermentatif laktobasillerin (*L. plantarum* dahil) ve pediokokların, buğday ve çavdarın kendiliğinden fermantasyonu sırasında gram negatif enterobakteriler üzerinde baskın olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, kendiliğinden (spontan) gelişen fermantasyonlarda genellikle homofermentatif LAB'nin baskın olduğunu, 'backslopping' yapılan ekşi hamur fermantasyonlarında ise daha çok heterofermentatif laktobasillerin rol oynadığını

belirtmişlerdir. Bununla birlikte *L. brevis* ve *L. plantarum* gibi türlerin her iki fermantasyon tipinde de bulunabileceğini bildirmişlerdir.

Fermantasyonun 15., 20. ve 25. saatlerinde canlı LAB sayısı sırasıyla 3.5, 3.7 ve 7.1×10^8 kob/g olarak hesaplanmıştır. Literatürde ekşi hamur fermantasyonlarında 10^8 kob/g'ı aşan hücre yoğunluğunun olağan olduğunu bildirilmektedir (De Vuyst ve Neysens, 2005). Çalışmamızda ekşi hamur üretiminde 15 saatlik fermantasyonun, hem asitlik gelişimi hem de bakteriyel gelişme açısından önemli bir süre olduğu görülmektedir. Bu nedenle, tip II yöntemi kullanılarak *L. plantarum* ile fermente edilen ekşi hamurlarda fermantasyon süresinin minimum 15 saat olması tavsiye edilmektedir.

4.5.3. Ekşi hamurların renk değerleri

L. plantarum ile fermente edilen hamurlarda, fermantasyon süresinin renk parametreleri (L^* , a^* , b^*) ve toplam renk değişimi (ΔE^*) üzerindeki etkilerini belirlemek üzere elde edilen renk ölçüm sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. *L. plantarum* ile fermente edilen hamurlara ait renk parametreleri†

Fermantasyon süresi (saat)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0	78.33±0.70 ^a	-0.57±0.07 ^a	15.82±0.25 ^a	44.72±0.54 ^a
1	78.97±1.21 ^a	-0.45±0.12 ^a	17.23±0.51 ^b	45.21±1.18 ^a
15	79.13±0.71 ^a	-0.56±0.13 ^a	16.81±0.40 ^b	45.34±0.71 ^a
20	78.49±0.3 ^a	-0.61±0.26 ^a	17.05±0.44 ^b	44.83±0.35 ^a
25	78.79±0.56 ^a	-0.67±0.20 ^a	17.38±0.22 ^b	45.05±0.55 ^a

† Ortalama değer ± standart sapma (n=6). Aynı sütündeki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). L^* : Parlaklık renk değeri, a^* : Kırmızı-yeşil renk değeri, b^* : Sarı-mavi renk değeri, ΔE^* : Toplam renk değişimi.

L. plantarum fermantasyonunun genel olarak hamurun rengini etkilemediği ve L^* , a^* ve ΔE^* değerlerinde bir fark yaratmadığı gözlenmiştir. Yalnızca fermente edilmiş örneklerde b^* değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p<0.05) görülmektedir. Bu artışın, mikrobiyal aktivitelerin bir sonucu olduğu ve buğday unu içerisindeki karotenoidlerin büyük bir bölümünü oluşturan luteinin (Hidalgo ve ark., 2010), yüksek asitlik veya enzim aktivitelerinden etkilendiği düşünülmektedir. Önceki çalışmalarda da, fermantasyon sırasında LAB'nin karotenoid içeriğini değiştirebileceği bildirilmiştir.

Antognoni ve ark. (2019), farklı LAB suşları tarafından fermente edilen hamurların içeriğindeki karotenoidlerin değişiklik gösterdiğini ve iki *L. plantarum* suşunun (29DAN ve 83DAN) lutein miktarını arttırdığını bulmuşlardır.

4.5.4. Ekşi hamurlardaki hacim artışı

Ekşi hamurlarda, fermantasyonunun ilk saatinde herhangi bir hacim artışı gözlenmemiştir. 15. saatin sonundaki ortalama hacim artışı %8.2 olarak belirlenmiştir. Hamur hacminin 20. saatte toplamda %10.3 olarak arttığı ve fermantasyonun 25. saatinde de bu değerin değişmediği görülmüştür. Bu sonuçlar, yalnızca *L. plantarum* kültürü ilavesiyle hazırlanan ekşi hamurların hacminin oldukça az miktarda arttığını göstermektedir. Tahıl fermantasyonlarında, laktik asit bakterilerinin laktik ve asetik asit üreterek ortamın pH'sını düşürürken, mayaların ise karbondioksit ve etanol ürettiği bildirilmiştir (Poutanen ve ark., 2009). Dolayısıyla hamur fermantasyonunda gaz üretiminden çoğunlukla maya türleri sorumlu olurken, laktik asit bakterileri ise asit oluşumu ve gaz üretimini destekleyici etkiye sahip olmaktadır (Gobbetti, 1998). Ayrıca *L. plantarum*'un karbon kaynağı olarak glukonat içeren besiyerinde CO₂ oluşturarak geliştiği, ancak glikoz kullanıldığında ise gaz üretmediği bildirilmektedir (Ennahar ve ark., 1996; Kılıç, 2008). Literatürden de görüldüğü üzere, LAB'nin hamurların hacim artışına katkısı olmamakta veya çok az olmaktadır. Bu çalışmada, *L. plantarum*'un doğrudan glikozdan gaz üretme yeteneği bulunmaması ve hamurlardaki baskın mikroorganizma olması nedeniyle hacim artışı oldukça düşük bulunmuştur. Tespit edilen hacim artışının, büyük oranda hamur bileşiminde kullanılan hammaddelerden gelen maya türlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Gül (1999) tarafından yapılan bir tez çalışmasında ekşi hamur üretiminde liyofilize LAB ve mayalardan oluşan 4 farklı kombinasyon oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda starterlerin gaz oluşturma gücünü ve pH'yı azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca starterlerin kontrole göre daha fazla asetik asit ve laktik asit, daha az etanol ve etil asetat oluşumu sağladığı tespit edilmiştir.

4.5.5. *L. plantarum*'un hamur işleme özelliklerine etkisi

L. plantarum ile fermente edilen hamurların yapışkanlık (stickiness), adezyon işi (work of adhesion) ve iç yapışkanlık (cohesiveness) gibi mekanik parametrelerine ait

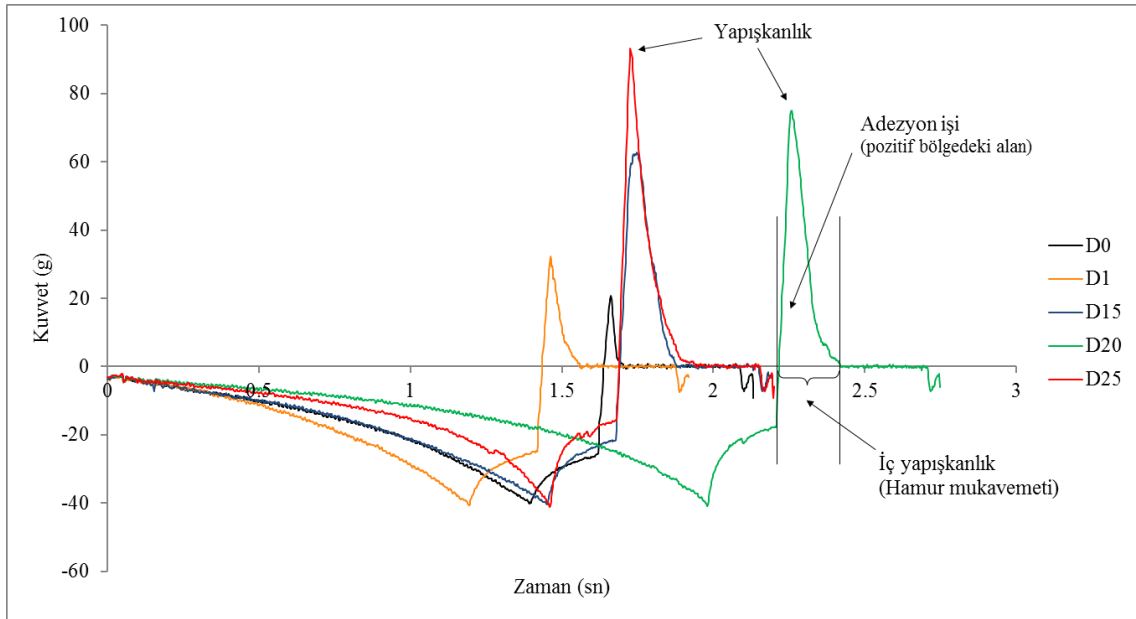
veriler ve grafikler sırasıyla Çizelge 4.7 ve Şekil 4.9'da sunulmuştur. Yapışkanlık ('stickiness' veya 'adhesiveness'), ürünün yüzeyi ile temas ettiği malzeme yüzeyi arasındaki çekim kuvvetlerini aşabilmek için gereken iş veya kuvvet olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2020b). Hamurların yüzey özellikleri ile alakalı olan hamur yapışkanlığı, hamur işleme özelliklerini doğrudan etkilediği için en önemli tekstürel parametre olarak kabul edilmektedir (Armero ve Collar, 1997). Bu çalışmada, *L. plantarum* katkılı hamurlarda fermantasyon süresinin artmasıyla yapışkanlık değerlerinin arttığı açıkça görülmüştür. Benzer şekilde, Collar ve ark. (1998), hamurun starter kültür kullanılarak ekşitilmesinin hamur yapışkanlığını arttırdığını bildirmiştir. Yapışkan hamur, özellikle büyük ölçekli fırınlarda önemli ölçüde finansal kayıplara sebep olması nedeniyle büyük bir sorun oluşturmaktadır. Üretimde kullanılan makinelerin kirlenerek ıskartaya çıkmasına ve dolayısıyla üretim hatlarının durmasına ve üretim planlarının bozulmasına neden olmaktadır (Chen ve Hosney, 1995; Dobraszczyk, 1997; Kim ve ark., 1999). Bununla birlikte, Dobraszczyk (1997), yapışkan hamurların küçük ölçeklerde işlenerek ve hamurun temas ettiği yüzeylerde yağ veya un kullanılarak başarılı bir şekilde işlenebileceğini bildirmiştir.

Çizelge 4.7. *L. plantarum* ile farklı sürelerde fermente edilmiş hamurların tekstürel parametreleri[†].

Fermantasyon süresi (saat)	Yapışkanlık (g)	Adezyon işi (g.sec)	Hamur mukaveti (mm)
0	20.22±1.83 ^a	0.51±0.08 ^a	0.48±0.13 ^a
1	31.86±1.68 ^b	1.59±0.35 ^b	0.95±0.24 ^a
15	63.80±1.59 ^c	5.37±0.97 ^c	1.61±0.36 ^b
20	75.78±0.49 ^d	5.68±0.39 ^c	1.89±0.34 ^{bc}
25	92.49±1.07 ^e	7.35±0.10 ^d	2.32±0.27 ^c

[†]Ortalama değer ± standart sapma (n=5). Aynı sütundaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Adezyon işi, Şekil 4.9'da da görüldüğü üzere, pozitif bölgedeki eğrinin altında kalan alan olması nedeniyle, yapışkanlık değerleri ile doğrudan ilişkilidir. Dolayısıyla artan fermantasyon süresiyle hamurların adezyon işi değerlerinin de arttığı görülmektedir. Daha yüksek yapışkanlık değeri, hamuru prob yüzeyinden ayırmak için daha fazla iş yapılmasına neden olmaktadır.



Şekil 4.9. *L. plantarum* ile farklı sürelerde fermente edilmiş hamurların işlenebilirlik grafiği

İç yapışkanlık (hamur mukavemeti), bir yığın veya malzeme kütesinin unsurlarının bir arada tutulduğu bir moleküller arası çekim kuvveti olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2020a). Fermantasyon süresi uzadıkça, hamur mukavemetinin de önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. En yüksek iç yapışkanlık değeri 25 saatlik fermantasyon ile elde edilmiştir. Hamur mukavemetinin, ekmeğin kalitesini belirlemek için iyi bir öngörücü parametre olduğu bildirilmiştir. Mukavemeti yüksek ve yapışkanlığı az olan hamurlar ile daha yüksek spesifik hacimde ve daha yumuşak ekmekler üretilmektedir (Collar ve ark., 1998).

4.6. Liyofilize Kültürlerde Yapılan Analiz Sonuçları

Konya'daki farklı fırınlarından toplanan ekşi hamur numunelerinden izole edilen *L. plantarum*'un farklı kriyojenik maddelerle muamele edilerek liyofilize edilmesi sonucunda elde edilen kültürlerin görselleri Şekil 4.10'de verilmiştir. Bu liyofilize kültürlerin canlı hücre sayılarının ve bazı biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinin belirlenmesi ve +4°C'de vakum altında 150 gün boyunca depolanması sırasında oluşan değişimlerin ölçülmesi ile elde edilen sonuçlar ise aşağıda sunularak tartışılmıştır.

Mikroorganizma kültürlerinin muhafaza etkinliği, çok sayıda faktörden etkilenmektedir. Bu faktörler; kültürün kendisi (tür, suş, hücre boyutu ve şekli, membranın lipit bileşimi), üretim şartları (büyüme ortamı bileşimi ve fazı, inkübasyon

sıcaklığı, pH, ozmolarite, havalandırma, donma yoğunluğu, soğutma oranı) veya depolama koşulları (su aktivitesi, nem, sıcaklık) ile ilgili olabilmektedir. Dondurma veya dondurarak kurutma ile hücreleri korumak amacıyla kullanılan ortamın bileşimi, ele alınması gereken en önemli konulardan biridir. Koruyucu bir katkı maddesinin yokluğunda, bazen donmaya karşı makul bir canlılık gözlenmiş olsa da, dondurma veya dondurarak kurutma için kriyoprotektanların kullanılması, hücrelerin canlı kalabilmesi için zorunludur. Koruyucu maddelerin etki mekanizmaları ise kullanılan bileşenlerin doğasına bağlıdır (Vinderola ve ark., 2019).

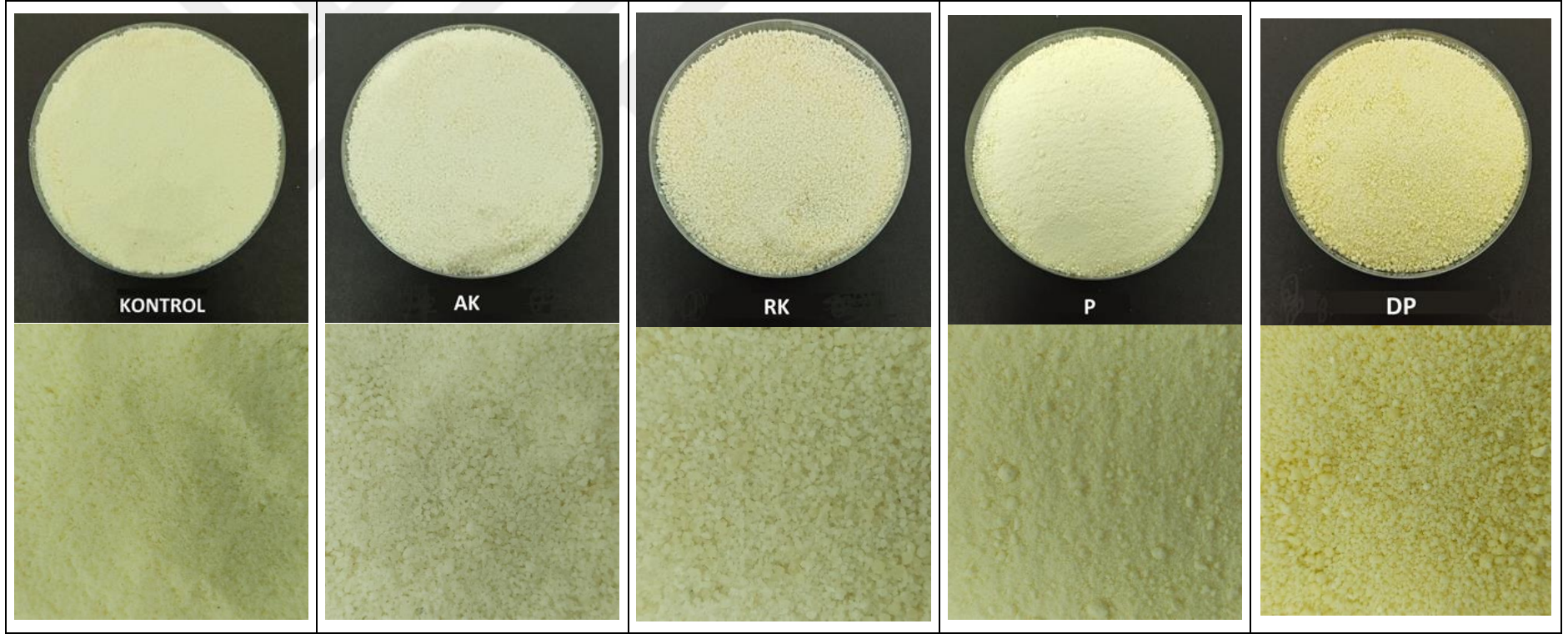
Donma esnasında oluşan hücre içi buz kristalleri, hücre zarında mekanik hasara yol açarak hücrelerin rüptürüne ve ölümüne yol açmaktadır. Bu nedenle, dondurulmuş starter kültürlerin hazırlanmasında, daha yüksek bir canlılık oranı ve daha uzun bir koruma sağlamak amacıyla kriyoprotektan seçimi ve kullanım oranı anahtar faktördür. Kriyoprotektanlar, hücreler üzerinde nüfuz ettikleri farklı bölgelere göre, geçirgen, yarı geçirgen ve geçirimsiz kriyoprotektanlar olarak sınıflandırılabilir. Geçirgen koruyucular hem hücre duvarlarına hem de hücre zarlarına nüfuz etmektedir. En yaygın olarak kullanılan geçirimli kriyoprotektanlar dimetil sülfoksit (DMSO) ve gliseroldür. Örnek verilecek olursa, gliserol, hidroksil grupları ile hücre içi makromoleküller arasında hidrojen bağları oluşturarak hücreye nüfuz edebilmektedir. Bu kriyoprotektanlar, hücrelerdeki büyük buz kristallerinin oluşumunu önlemekte ve dehidrasyon durumunda, hücrelerdeki protein, karbonhidrat ve yağ gibi makromoleküllerin orijinal yapılarını koruyabilmektedir. Monosakkaritler, disakkaritler ve amino asitler gibi yarı geçirgen koruyucular sadece hücre duvarlarına nüfuz etmekte, ancak hücre zarlarına girememektedir. Karbonhidratların, dehidrasyon ve donma sırasında hücre üzerinde önemli koruyucu etkileri mevcuttur. Osmozdan sonra su molekülleri ile birleşerek, çözeltinin viskozitesini artırırlar ve buz kristallerinin oluşumunu yavaşlatırlar. Ayrıca, sitoplazma konsantrasyonunu artırarak ve hücre membran basıncını dengeleyerek, dehidrasyonun ve büzülmenin yarattığı hücre hasarını azaltmaktadırlar. Yağsız süt tozu, nişasta, maya tozu ve *p*-siklodekstrin gibi geçirimsiz koruyucu maddeler, hücre duvarlarına ve hücre zarlarına nüfuz edememektedirler. Bu tip kriyoprotektanlar, hücre yüzeyinde yapışkan bir tabaka oluşturarak hücreleri kısmen dehidre etmektedir. Bu koruyucu maddeler sitoplazmanın viskozitesini artırarak, hücrelerin etrafındaki düzensiz şekillere sahip buz kristallerinin büyümesini engellemektedir (Chen ve Hang, 2019). Geçirgen bileşikler, yavaş dondurma sırasındaki hücre yaralanmalarına karşı daha

etkiliyken, geçirimsiz olan bileşiklerin ise hızlı dondurma sırasındaki yaralanmalara karşı daha etkili olduğu bilinmektedir (Vinderola ve ark., 2019).

Farklı kriyoprotektanların farklı suşlar üzerinde farklı koruyucu etkileri bulunmaktadır ve genellikle tek bir koruyucu ile dondurarak kurutmaya ve olumsuz dış koşullara karşı bakteri direnci gereksinimleri karşılanamamaktadır. Bu nedenle, bakteriyel hücrelerin dondurarak saklanması, koruyucuların bir arada kullanıldığı formülasyonlar tercih edilmektedir. Koruyucu tipi ve konsantrasyonunun iyi bir şekilde ayarlanması ile hem kurutma işlemi hızlandırılmakta, hem de kurutma ve saklama sırasında yüksek canlılık oranı sağlanabilmektedir. Genel olarak, prokaryotlar için, yaygın olarak kullanılan kriyoprezervatifler dimetil sülfat, DMSO ve gliserindir. LAB suşlarının kriyoprezervasyonu için en yaygın olarak yağsız süt, trehaloz ve dekstran/sükroz ve sığır serum albümini karışımları kullanılmaktadır (Chen ve Hang, 2019).

Yağsız süt ortamında laktik asit bakterileri başarıyla kurutulmakta ve makul sonuçlar elde edilebilmektedir, bu nedenle de birçok araştırmacı tarafından yeni geliştirilen koruyucu ortamları kıyaslamak amacıyla standart olarak kullanılmaktadır (Heckly, 1961). Bu anlamda, yağsız sütün evrensel olarak kabul gören bir kriyoprotektan olması ve başarıyla kullanımı, bakteri hücrelerine etki eden ve onları koruyan küçük, orta ve büyük boyutlu moleküllerin varlığı ile açıklanmaktadır. Hücre zarı bileşenlerinin stabilizasyonunu sağlaması, rehidrasyonu kolaylaştıran gözenekli bir yapı oluşturması ve hücreleri kaplayan koruyucu proteinleri sağlaması, sütün hücresel zararı azaltan çeşitli mekanizmalarındandır. Bununla birlikte, sütün içine ilave koruyucu bileşenlerin dâhil edilmesi, kendi koruyucu kapasitesini arttırabilmektedir (Vinderola ve ark., 2019).

Bu çalışmada kültürlerin liyofilizasyonunda temel koruyucu ortam olarak %10 (a/h) kuru maddeli yağsız süt kullanılmıştır. Bu yağsız süt ortamına kriyojenik madde olarak %5 (a/h) oranında asit kazein, rennet kazein, peynir altı suyu tozu ve %50 oranında demineralize edilmiş peyniraltı altı suyu kullanılmıştır. Kullanılan bu kriyojenik maddelerin bileşimleri Çizelge 4.8'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Farklı kriyojenik koruyucu maddelerle liyofilize edilen *L. plantarum* toz kültürleri

Çizelge 4.8. *L. plantarum*'un liyofilizasyonu sırasında kullanılan kriyojenik maddelerin bileşimleri

Bileşim (%)	Yağsız süt tozu	Asit kazein	Rennet kazein	PAST	Demineralize PAST (%50)
Nem	4	5.5	6	2	2
Yağ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Protein (N×6.38)	35	92	85.7	6.5	6.5
Kül	8.4	1.4	7.3	8.5	5.5
Laktoz	52.1	0.6	0.5	82.5	85.5

Süt endüstrisi tarafından üretilen bu yan ürünlerin, yüksek organik madde içeriğinden kaynaklanan çevresel sorunlar oluşturması nedeniyle, ekonomik açıdan değerlendirilmesine hala ilgi duyulmaktadır. Hali hazırda, peynir altı suyu, laktik starter kültürlerin çoğaltılması amacıyla peynir üreticileri tarafından düşük maliyetli alternatif bir ortam olarak kullanılmaktadır (Burns ve ark., 2008). Peynir altı suyunun laktoz içeriğinin fazla olması dikkat çekmektedir (Çizelge 4.8). Laktoz, LAB'nin kurutulması ve sonrasında depolanması sırasında koruyucu etkileri test edilmiş şekerlerden biridir. Laktozun bir karbon kaynağı olarak kullanması ile mikroorganizmaların büyümeleri teşvik edilmektedir. Ek olarak, laktoz, çözünürlüğü arttırmak için toz bazlı farmasötik formüllerde de tercih edilmektedir. Kısaca, laktozun büyüme ve kurutma ortamına dâhil edilmesi önerilmektedir (Otero ve ark., 2007).

Proteinler, probiyotiklerin kapsüllenmesi için önemli duvar malzemeleridir. Bu şekilde kazein, sığır serum albümini ve soya proteini gibi proteinler ticari olarak mevcut proteinler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Proteinlerin yapıları çok büyük ve karmaşıktır, fakat proteinler enzimatik çapraz bağlama, sıcaklık kontrollü sol-jel geçişi ve kimyasal çapraz bağlama ile jelleştirilebilmektedir. LAB hücreleri, süt bazlı olmayan kaplama materyallerine karşı direnç gösterilebildiğinden duvar malzemesi olarak yaygın olarak laktoproteinlerin kullanımı söz konusu olmaktadır (Chen ve Hang, 2019).

4.6.1. Liyofilize kültürlerin canlı hücre sayım sonuçları

Farklı kriyojenik maddelerle muamele edilen *L. plantarum* kültürlerinde dondurma öncesi, liyofilizasyon sonrası ve depolama süresince belli aralıklarla kültürel sayımlar gerçekleştirilerek canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Liyofilizasyon işlemi öncesinde ve sonrasındaki canlılık oranları hesaplanarak liyofilizasyon işleminin yarattığı

canlılık kayıpları ve kriyoprotektif amaçlı kullanılan materyallerin etkinlikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.9. *L. plantarum*’un kriyoprotektif ajanlar varlığında dondurarak kurutma işlemi öncesi ve sonrasındaki canlılık oranları[†]

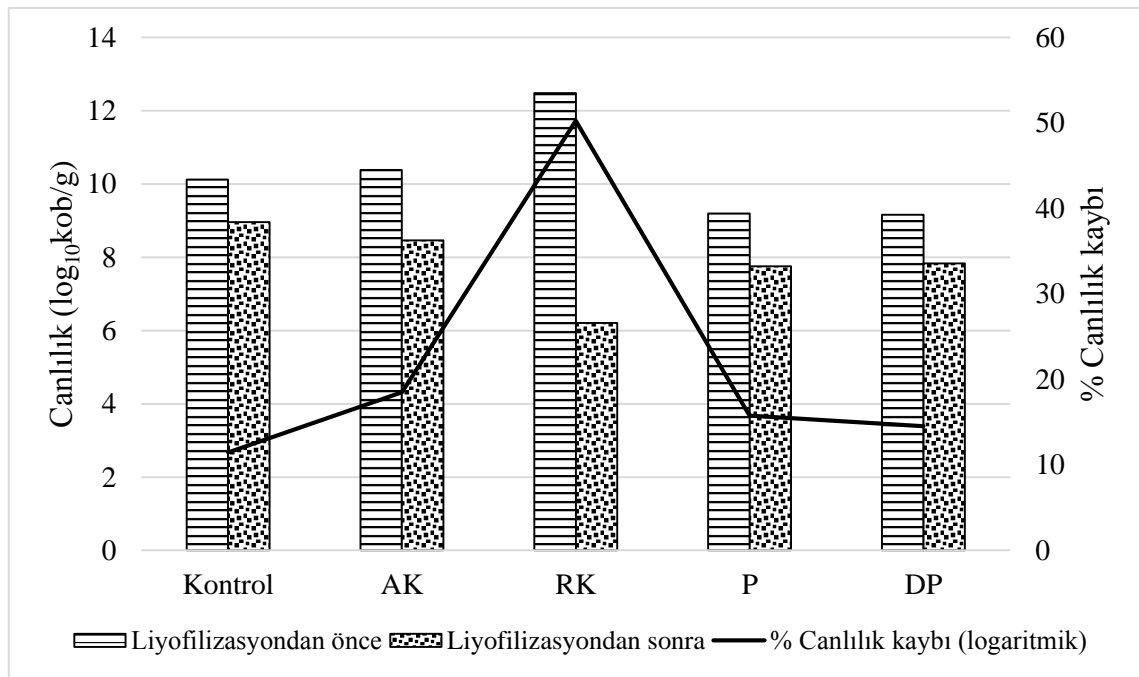
Örnek	Liyofilizasyondan önce (log kob/g)	Liyofilizasyondan sonra (log kob/g)	Canlılık kaybı (log)	Canlılık kaybı (%, log)
Kontrol	10.13±0.05 ^b	8.96±0.01 ^d	1.16	11.46
AK	10.38±0.07 ^c	8.46±0.07 ^c	1.92	18.50
RK	12.48±0.06 ^d	6.21±0.07 ^a	6.27	50.24
P	9.20±0.03 ^a	7.75±0.03 ^b	1.45	15.76
DP	9.17±0.08 ^a	7.83±0.02 ^b	1.33	14.52

[†]Aynı sütündeki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.

Rennet kazein içeren kültür ortamı hariç, diğer tüm kültür ortamlarının, dondurarak kurutma prosesinde 1.16 ve 1.92 log kob/mL arasında değişen canlılık kaybı ile iyi bir koruyucu etki gösterdiği görülmektedir. Ancak en düşük canlılık kaybının gözlemlenmesi nedeniyle en iyi koruyucu etki, kontrol kültüründe görülmüştür. Bu bağlamda, ilave edilen kriyoprotektif ajanların aslında liyofilizasyon işlemine karşı koruyucu özelliğinin olmadığı, tüm koruyucu etkinin yağsız süt ortamından kaynaklandığı düşünülebilir. Yağsız sütün tek başına koruyucu etkisi hali hazırda pek çok kaynakta bildirilmiştir (bakınız 2.4.2 ve 4.6). Ancak rennet kazein içeren örnekte 6.27 log kob/mL azalma ile oldukça büyük bir canlılık kaybı görülmüştür. Bu kayıp, canlılıktaki logaritmik olarak %50.24 oranında bir azalmayı göstermektedir ki bu kültür koruma yöntemlerinde tercih edilebilecek bir durum değildir.

Önceki çalışmalar, yüksek su içeriği nedeniyle dondurma sırasında süt bileşenlerinin kimyasal ve fiziksel olarak değiştiğini bildirmektedir. Sütün dondurularak depolanması, oluşan buz ile donmamış katı içeriği arasında bir dereceye kadar faz ayrılmasına neden olmaktadır. Kazein miselleri dondurarak depolama sırasında stabilitelerini kaybetme eğilimindedir ve uzun süreli depolamalarda flokülat veya agregat oluşumu gözlenmektedir. Dondurma sırasında süt ve süt konsantrelerinde meydana gelen bu değişimlerin mineral dağılımı, pH ve misel kazeinin partikül büyüklüğü ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca laktozun kristalleşmesinin de kazein stabilitesini etkileyen bir faktör olduğu ve kazein miselinin stabilitesinin bozulması için yalnızca %40

oranında bir laktoz kristalizasyonunun bile yeterli olduğu bildirilmiştir. Teorik olarak, donma sırasında orijinal su hacmi azaltılmış süt ürünlerinin, yüksek su içeriğine sahip olanlardan daha kararlı olması gerekmektedir. Bununla birlikte, dondurarak depolama sırasında vakum buharlaştırma ile yoğunlaştırılan sütün stabilitesinde de değişiklikler gözlenmiştir ve bu değişiklikler asitliğin azalması, kazein çökmesiyle agregat oluşumu ve viskozitede meydana gelen artış ile çözünür kalsiyum ve fosfat kaybı olarak bildirilmiştir (Gaber ve ark., 2020).



Şekil 4.11. Liyofilizasyon işleminden hemen önce ve sonra *L. plantarum*'un logaritmik canlılığı üzerine farklı kriyoprotektanların etkisi

Pek çok kaynakta, kazeinlerin LAB hücrelerinin gastrointestinal geçişinde mide sıvısından korumak amacıyla kullanılabileceği bildirilmektedir. Rennet, κ -kazein molekülünü parçalayarak kazein misellerinin agregasyonunu sağlayan proteolitik bir enzim kompleksidir. 18°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, kovalent olmayan çapraz bağlar oluşturan misel zincirleri jel oluşturmak üzere bir araya gelmektedirler. Bu şekilde, rennet enzimi ve sulu süt proteini çözeltisi kullanılarak önemli bir hücre kaybı olmadan probiyotik bakterilerin mikrokapsüllemesi mümkün olmaktadır. Kapsüllemiş hücrelerin canlılıkları, protein tamponlama kapasitesi nedeniyle kapsül içindeki protein matrisinin sahip olduğu daha yüksek bir pH değeri ile açıklanmaktadır. Böylece düşük pH'daki gastrik koşullar sırasında hücreler korunabilmektedir. Bu nedenle bu teknik, gıdalarda probiyotiklerin daha etkili bir şekilde korunması için uygun bir yaklaşım gibi

görülmektedir (Martín ve ark., 2015). Benzer şekilde, Heidebach ve ark. (2009) yaptıkları çalışma ile rennet enzimi kullanılarak gerçekleştirilen jelleşme reaksiyonunun, probiyotik hücrelerin mikrokapsülasyonunda kullanımını başarılı bulmuşlardır. Transglutaminaz ilavesiyle kazeindeki glutamin ve lizinin çapraz bağlanması ile kapsüllenmiş *Lactobacillus paracasei* ve *Bifidobacterium lactis*'in asit direncinin (pH 2.5'te), kapsüllenmemiş bakterilere kıyasla %20 daha yüksek olduğu görülmüştür. Yağsız sütteki protein, kimozinin etkisi altında mikrokapsül yapısı oluşturarak, *B. lactis*'in asidik koşullar (pH 2.5) altında canlı kalma oranını % 0.1'den (kapsüllenmemiş), %10'un üstüne çıkarabildiği bildirilmiştir. Kimozin, seçici bir şekilde κ -kazeini hidrolize edebilmekte ve polipeptit zincirleri arasındaki çapraz ve kovalent olmayan bağlanma sonrasında sütteki kazein misellerini kararsız hale getirerek kümelenmesine ve jel yapının oluşmasına neden olmaktadır. Ayrıca, kazein ve pektinin birlikte kullanılmasıyla, *L. acidophilus* ve *B. lactis*'in pH 1'de canlı kalma oranlarını önemli ölçüde artırabildiği ileri sürülmüştür (Cook ve ark., 2012; Chen ve Hang, 2019).

Bu tez çalışmasında yukarıda bahsedilen kaynaklardan farklı olarak, *L. plantarum* örnekleri asitlendirme ve rennet enzimi reaksiyonları sonucunda elde edilen kurutulmuş toz kazein ile zenginleştirilen yağsız süt içerisinde dondurarak kurutulmuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara bakılarak, yukarıdaki literatürde bahsedilen mikrokapsülleme işlemlerinden çok daha farklı reaksiyonların gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Çözünen-polimer etkileşimleri, her bir bileşenin iyonik veya iyonik olmayan doğasına bağlı olarak kategorize edilebileceği ve bu tür sistemlerde bileşenler arasındaki etkileşimlerin, bileşenlerin kimyasal doğasına, maruz kaldıkları ön işleme (örn., dondurarak kurutma), sistemin su aktivitesine ve pH'sına bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (Bakhit ve Schmidt, 1992).

Asit kazein jellerinin, rennet ile pıhtılaşmış süt jellerine kıyasla çok daha narin ve kırılabilir olduğu bildirilmektedir (Lucey, 2017). Ayrıca, rennet jellerinin, elektron mikroskopu çalışmalarında daha kalın protein liflerine sahip olduğu ve pH 4.6'da asit jellerinden daha geçirgen olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda rennet jellerinin pH 6.5'te, pH 5.2'de olduğundan daha geniş ve gözenekli olduğu belirtilmiştir (Everett ve Auty, 2017). Esasen, rennet süt jellerinin, asit jelleriyle benzer geçirgenlik özelliklerine sahip olduğu bildirilmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar, asit jellerinin geçirgenliğinin zamanla değişmediğini ancak, rennet jellerinde meydana gelen "mikrosineresis" nedeniyle ya da ağdaki iplikçiklerin kopması ile daha büyük gözeneklerin oluşması sonucunda geçirgenliğin arttığını göstermiştir. Daha büyük

gözeneklere (daha yüksek geçirgenlik) sahip jellerin genellikle daha az stabil olduğu ve peynir altı suyunun ayrılmasına (sineresis) neden olduğu belirtilmiştir (Lucey, 2017). Rennet süt jelinin yükses sineresis özelliği, asit jeliyle oluşturulmuş peynirlere kıyasla daha düşük nem içerikli peynir üretimine olanak sağlamaktadır (Everett ve Auty, 2017). Asit jellerinin, santrifülemeye tabi tutulduklarında bile rennet jellerinden çok daha az sineresise maruz kaldıkları ve bu nedenle asitle koagüle edilmiş peynirlerin genellikle çok yüksek nem içeriğine sahip olduğu bildirilmektedir (Lucey, 2017). Ayrıca rennet kazeinin asit kazeine göre daha yüksek mineral içeriğine sahip olması ve moleküler yapılarının farklılık göstermesi (asit kazeinde κ -kazein bozulmamış halde bulunurken, rennet kazeinin kümelenmiş para- κ -kazein miselleri içermesi) gibi bileşim farklılıkları da söz konusudur (O’Kennedy, 2009, 2011; Huppertz ve ark., 2018).

Tüm bu sıralanan farklılıkların, bu çalışmada elde edilen kültürler üzerinde de etkili olduğu, kazein içeren kültürlerin hem fiziksel yapılarının, hem de canlılığı koruma yeteneklerinin birbirinden oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir. Asit kazein içeren örneklerin canlılığı korumada oldukça başarılı olduğu görülürken, rennet kazein içeren örneklerde ise tam aksi bir durum gözlenmiştir. Yumuşak ve kırılğan yapısı ile asit kazein jellerinin, bakteri hücrelerini sararak yüksek bir koruma sağlamış olduğu, süt çözeltisinin viskozitesini arttırarak buz kristallerinin oluşumunu yavaşlattığı ve hücrelerin maruz kaldığı basıncı dengeleyerek dehidrasyonun ve büzülmenin yarattığı hücre hasarını azaltmış olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda asit kazein jel gözeneklerinin daha küçük olması nedeniyle içerisinde tutulan su moleküllerinin donma esnasında nispeten daha küçük ve düzenli kristaller oluşturması ve bünyesinde tutulan suyun daha az faz ayırmasına uğrayarak kontrollü bir şekilde uzaklaşması ile bakterileri kurumunun yarattığı hasarlara karşı koruması da söz konusu olmuş olabilir.

Rennet kazeinin güçlü jeller oluşturması, oluşan bu jellerin büyük gözenekli olması ve jel yapının donması sırasında gerçekleşen büyük buz kristalleri oluşumunun bakteriler üzerinde yıkıcı bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çözünürlüğünün asit kazeine göre çok daha az olması nedeniyle *L. plantarum* hücrelerinin çoğunu kapsüllememiş olduğu da tahmin edilmektedir. Böylece jel yapının içine giremeyen bakterilerin kolloidal fazda kalarak, yağsız sütün koruyucu etkisinden de faydalanamaması söz konusu olabilir. Aynı zamanda büyük porlara sahip olması nedeniyle bakteri mobilitesinin arttığı ve donma ile birlikte sıkılaştıran/sertleşen jel yapının bakteri hücrelerini yaralamış olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen tozların fiziksel görüntüleri ve davranışları da bu yaklaşımı destekler niteliktedir. Rennet kazein içeren kültürün, nem içeriği yüksek olmasına rağmen, kazein içermeyen kültürlerle kıyasla daha camsı ve oldukça sert bir formda olduğu fark edilmiştir. Muhtemelen bu yapının oluşması sırasında bakterilere zarar vermesi söz konusudur. AK ve RK kültürlerinin partikül boyut dağılımının da düşük homojenliğe sahip olduğu görülmektedir. Bu kültürlerin partikül boyutundaki bu değişkenliğin, kazein ağ yapısının yarattığı sertlikten olduğu tahmin edilmektedir. Aynı zamanda, yukarıda bahsedilen asit kazein jellerinin sineresis özelliğinin düşük olması nedeniyle AK kültürünün en yüksek nem içeriğine sahip olduğu söylenebilir. Asit kazein jellerinin yumuşak formu bakterilerin korunmasını desteklerken, rennet jellerinin sert formu ise hücreleri korumanın aksine daha fazla hasara uğramasına neden olmuş olabilir.

Kazeinlere benzer şekilde peynir altı suyu proteinleri de, üstün jelleşme ve emülsifikasyon özellikleri nedeniyle probiyotiklerin mikrokapsüllemesinde kaplama maddesi olarak kullanılmaktadır. Peynir altı suyu proteinlerinin in vivo olarak sindirilerek biyoaktif peptitlerin oluşumunu sağlaması kapsülleme materyali olarak kullanımının bir diğer avantajı olarak bildirilmektedir (Chen ve Hang, 2019). Bu bağlamda %6.5 oranında (Çizelge 4.8) peynir altı suyu proteini içeren PAST ve DPAST ilavesinin kültürlerin korunmasını destekleyici özellik yapmış olduğu düşünülebilir. Ancak P ve DP örneklerinde esas koruyucu etkinin, içeriğindeki yüksek orandaki laktoz şekerinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Şekerlerin, karbonhidratların tipik camsı yapı oluşturma özelliği sergilemesi ile donma, dondurarak kurutma ve depolama üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla günümüzde, LAB hücrelerinin dondurarak kurutulmasında genellikle şeker ve polimerler tercih edilmektedir. Şeker ve polimerlerin oluşturduğu yüksek viskoziteli amorf matris, moleküllerin hareketliliğini azaltarak, difüzyonun neden olduğu bozunma reaksiyonlarını sınırlandırmaktadır. Şekerlerin hücreler üzerindeki koruyucu etkisinin, kurutma sürecinde zarar görecektir olan biyolojik moleküller ile hidrojen bağları oluşturarak suyun yerini alması ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Chen ve Hang, 2019).

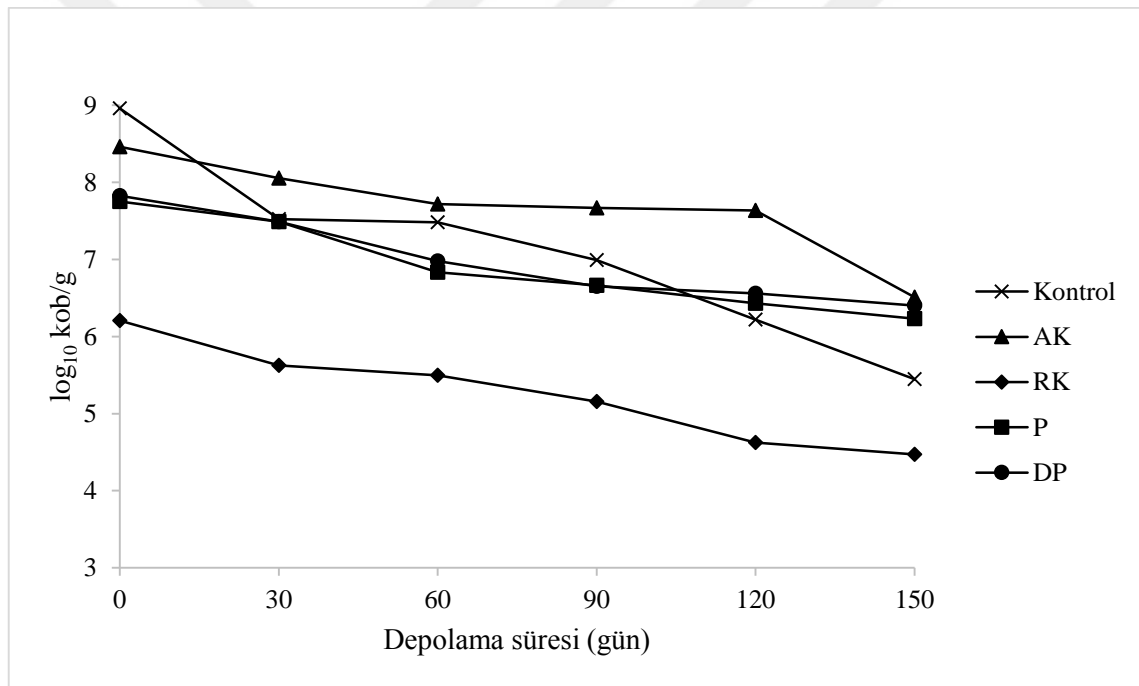
Çizelge 4.10. Farklı kriyojenik koruyucu maddelerle liyofilize edilen *L. plantarum*'un depolama süresince canlılık seviyeleri (log kob/g)[†]

Örnek	Depolama süresi (gün)					
	0	30	60	90	120	150
Kontrol	8.96±0.01 ^e	7.52±0.02 ^d	7.48±0.01 ^d	6.99±0.05 ^c	6.22±0.09 ^b	5.45±0.04 ^a
AK	8.46±0.06 ^d	8.05±0.01 ^c	7.72±0.06 ^b	7.67±0.01 ^b	7.64±0.05 ^b	6.51±0.00 ^a
RK	6.21±0.07 ^d	5.63±0.03 ^c	5.50±0.09 ^c	5.16±0.00 ^b	4.63±0.03 ^a	4.47±0.01 ^a
P	7.75±0.02 ^d	7.49±0.09 ^c	6.83±0.03 ^b	6.66±0.02 ^b	6.43±0.06 ^a	6.23±0.04 ^a
DP	7.83±0.02 ^e	7.49±0.01 ^d	6.98±0.07 ^c	6.65±0.01 ^b	6.56±0.05 ^b	6.40±0.03 ^a

[†]Ortalama ± standart sapma. Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Kültürlerin depolama süresince sergiledikleri logaritmik canlılık oranları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Depolama süresinin uzaması ile tüm kültürlerin canlılık oranlarında belirgin bir azalma olduğu görülmüştür. Şekil 4.12'de kültürlerin canlılıklarında meydana gelen azalmalar gösterilmiştir. Tüm kültürlerin canlılığındaki en belirgin azalma özellikle ilk 30 günlük depolama süresinde gözlemlenmiştir. Bu süre içerisinde canlılıktaki en büyük azalma ise 1.44 log kob/g ile kontrol örneğinde görülmüştür. Bu azalmayı 0.58 ve 0.41 log kob/g ile sırasıyla rennet ve asit kazein ilaveli örnekler takip etmiştir. PAST ve DPAST içeren kültürlerin canlılığında ise ortalama 0.3 log kob/g bir azalma tespit edilmiştir. Kullanılan kriyoprotektif ajanların koruyucu etkinliği 30 günlük bir depolama sonrasında bile bariz bir şekilde görülmüştür. Depolama süresinin ortasında, yani 90 günlük süre zarfında, kontrol örneğindeki canlılık kaybı 2 log kob/g'a yaklaşırken, RK, P ve DP kültürlerinininki yaklaşık 1 log kob/g civarında olmuştur. Asit kazein ilaveli örnekler ise yüksek koruma göstermiş ve bu örneklerde canlılığın ancak yaklaşık 0.8 log kob/g oranında azaldığı tespit edilmiştir. 150 günlük depolama boyunca canlılıktaki en önemli azalma 3.5 log kob/g ile kontrol örneğinde belirlenmiştir. Bu azalmayı 2 log kob/g ile AK kültürü takip etmiştir. RK, P ve DP örneklerindeki canlılık kayıpları 1.43–1.74 log kob/g arasında kalmıştır. Asit kazein içeren kültürlerin 120 günlük depolamaya kadar oldukça başarılı bir koruma sağladığı, ancak 120–150 gün arasında oldukça önemli bir canlılık kaybına uğradığı tespit edilmiştir. Canlılıktaki bu belirgin azalmaya, kültürün sahip olduğu yüksek nem içeriğinden kaynaklanan biyokimyasal bozulmaların neden olduğu tahmin edilmektedir.

Genel durum göz önüne alındığında, asit kazein kullanımının kültür koruma yöntemi olarak oldukça başarılı bulunmuştur. Ancak 120–150. gün arasında gerçekleşen canlılıktaki bu ciddi azalma ile, kültürlerde bir takım reaksiyonların gerçekleştiği sonucuna varılabilir. Bunun da büyük oranda nem içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuçlara göre, başlangıçtaki nem miktarının düşük tutularak kontrol altına alındığı asit kazein içeren kültür üretimiyle çok daha başarılı bir koruma sağlanabileceği düşünülmektedir. Uzun süreli bir koruma ve büyük miktarlarda elverişli kültür üretimi göz önüne alınırsa, en uygun kültürlerin koruyucu olarak PAST ve DPAST içerenler olduğu görülmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, hem elde edilen kültür yapısı ve formu, hem de canlılığı korumadaki performansı nedeniyle PAST ve DPAST'ın kültür koruma yöntemlerinde koruyucu olarak kullanımı önerilmektedir.



Şekil 4.12. Farklı kriyojenik koruyucu maddelerle liyofilize edilen *L. plantarum* kültürlerinde depolama boyunca gözlemlenen canlılık değişim grafiği (\log_{10} kob/g)

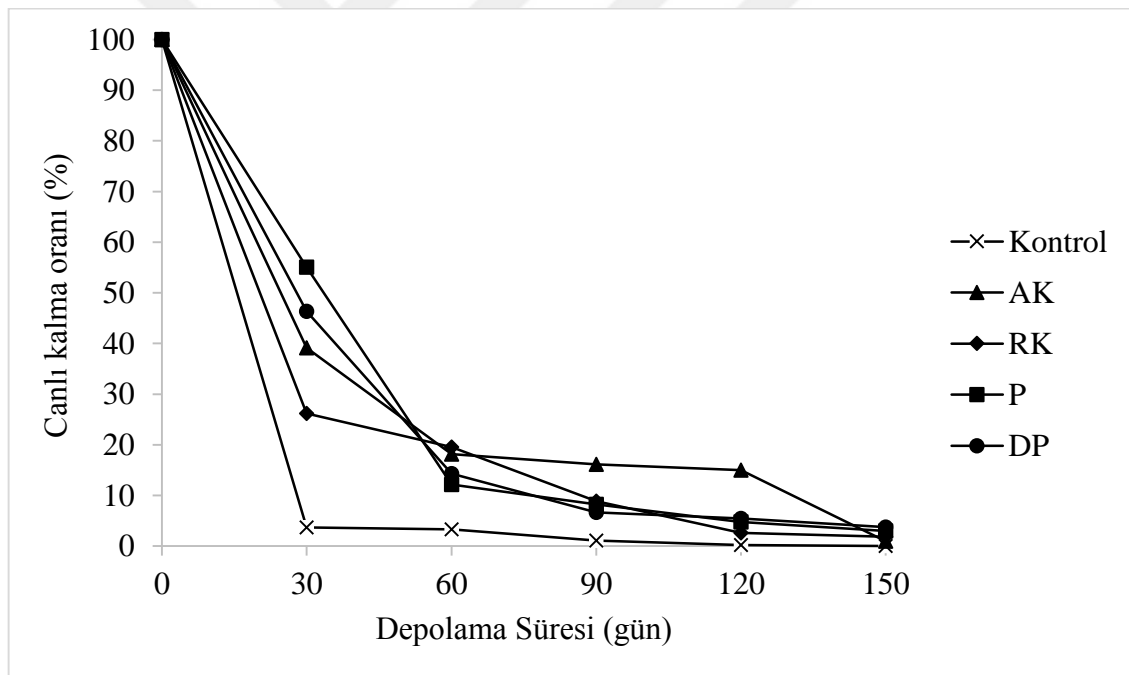
Bazı çalışmalar, başlangıçtaki bakteriyel yükün önemli olduğunu, uygulama sonrasında ve depolama süresince canlı kalma oranını etkilediğini göstermektedir (Bozoğlu ve ark., 1987). Rennet kazein içeren kültürün başlangıç hücre yoğunluğu en yüksek olmasına rağmen, dondurarak kurutma sonrasındaki hücre sayısı en düşüktür. Bunun dışında başlangıç hücre yoğunlukları, diğer kültürlerde de farklılık göstermektedir. Bu farklılığın canlılık kayıplarını yorumlamakta güçlük yaratmasından

ötürü, toz kültürlerin başlangıç hücre konsantrasyonunu sabit tutularak, % hücre canlı kalma oranları (kob/g olarak) hesaplanmış ve Çizelge 4.11 ve Şekil 4.13'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı kriyojenik koruyucu maddelerle liyofilize edilen *L. plantarum*'un depolama süresince canlı kalma oranları (%)

Örnek	Depolama süresi (gün)					
	0	30	60	90	120	150
Kontrol	100	3.66	3.33	1.08	0.18	0.03
AK	100	39.16	18.17	16.14	15.03	1.12
RK	100	26.16	19.54	8.86	2.62	1.83
P	100	55.05	12.16	8.21	4.79	3.02
DP	100	46.37	14.30	6.67	5.44	3.76

AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.



Şekil 4.13. Farklı kriyojenik koruyucu maddelerle liyofilize edilen *L. plantarum*'un depolama süresince canlı kalma oranlarındaki değişim grafiği (%)

Sonuç olarak, kontrol örneği ile kıyaslandığında kriyoprotektif ajan kullanımının her ne kadar liyofilizasyon işlemine karşı koruyucu etkisi olmadığı belirlense de, depolama boyunca oldukça etkin bir koruma sağladığı görülmüştür. Hücrelerin canlı kalma yüzdelerine bakılarak 120 günlük depolama boyunca en başarılı protektanın asit kazein olduğu söylenebilir. Bu süreye kadar tüm ölçümlerde diğer kültürlerle kıyasla en

yüksek canlılığı sağladığı görülmektedir. 150 günlük depolama sonunda ise en yüksek korumayı PAST ve DPAST sağlamıştır. Rennet kazeinin ise kriyoprotektif koruması olmamasına rağmen depolama boyunca canlılığın stabil kalmasında oldukça başarılı olduğu görülmüştür.

Literatürde çeşitli koruyucu madde ve ortamların mikroorganizmaların dondurarak kurutulması üzerindeki etkinliğini araştıran pek çok çalışma mevcuttur. Bu tez çalışmasına benzer olarak, dondurarak kurutulmuş *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus durans* ve *Enterococcus faecalis*'in saklanması sırasında sorbitol ve monosodyum glutamatın canlılık üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, kullanılan koruyucuların dondurarak kurutma sırasında canlılığa önemli bir etkisi olmadığı, ancak bu bileşiklerin uzun süreli depolama sırasında suşların stabilitesini arttırdığı bulunmuştur (Carvalho ve ark., 2003).

Başka bir araştırma, bir dekstran-sodyum glutaminat çözeltisi içinde liyofilize edilen 48 cins veya grup bakteri, maya ve mantarın oda sıcaklığında, karanlıkta ve vakum altında 6 yıl süreyle saklanması sonrasında yapılan canlılık testi sonucunda 31'inin % 80–100 arasında ve 9'unun da % 50–80 oranında canlı kaldığı tespit edilmiştir (Antheunisse, 1973). Bu çalışma açık bir şekilde göstermektedir ki, dondurarak kurutma, mikroorganizmaların uzun süreli saklanmasında oldukça etkili ve önemli bir yöntemdir.

Dolly ve ark. (2011), *L. plantarum*'u peynir altı suyu proteini kullanarak dondurarak kurutma (DK), sprey kurutma (SK) ve spray dondurarak kurutma (SDK) teknikleri kullanarak enkapsüle etmişler ve hücre canlılıklarını ve depolama stabilitesini incelemişlerdir. En fazla 210 ml kültür solüsyonunu kuruttukları çalışmada, özellikle DK ve SDK yöntemlerinde çok düşük bir canlılık kaybı gözlenmiştir. En yüksek canlılık oranını ise %98 oranı ile DK yöntemiyle elde edilmiştir. 40 gün boyunca 4°C'de depolanan bu kültürlerde canlılığın en fazla %3–5 arasında azalma gösterdiği belirlenmiştir.

Koruyucu ortamın ve kriyoprotektanların etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada *Streptococcus cremoris*, *S. thermophilicus* ve *Lactobacillus bulgaricus* hücrelerinin dondurarak kurutulması sonucunda 0.06 M laktoz içeren ortamda sırasıyla %47, %31 ve %34 oranında, %8 kuru maddeli süt içerisinde ise %68, %71 ve %50 oranında canlı kalabildikleri bildirilmiştir (Morichi, 1974).

Bir çalışmada, farklı *L. plantarum* suşlarının dondurma ve dondurarak kurutulmasında 4 farklı ön-donma sıcaklığının (−196°C, −60°C, −40°C ve −20°C) ve 3

farklı koruyucunun (PBS-fosfat tamponlu salin çözeltisi, sorbitol ve trehaloz) canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, canlılığın suşa özgü olduğunu ve ön-dondurma sıcaklığına göre değişebildiğini göstermiştir (Wang ve ark., 2020).

L. plantarum ve *L.casei*'nin dondurarak korunmasında optimal kriyoprotektan kombinasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, 150 g/L ve 100 g/L sükrozun sırasıyla %74.4 ve %84.8 canlı kalma oranı sağlayarak tek başına uygulanan tüm kriyoprotektanlar arasında en iyi koruyucu etkiyi sağladığı bildirilmiştir. Sırasıyla 12.5, 12.5, 37.5 ve 25.0 g/L içeren trehaloz, sükroz, gliserol ve yağsız süt karışımının ise *L. plantarum* (% 92.8) ve *L. casei*'nin (% 91.2) hayatta kalma oranını önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür (Wang ve ark., 2019).

Depolamanın mikroorganizmaların yaşayabilirliği üzerindeki etkisini test etmek amacıyla hem doğrudan süt içerisinde (MM) ve hem de süt içinde fermente edildikten (FMM) sonra liyofilize edilen *L. plantarum*, *L. kefir*, *Lactococcus lactis*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Saccharomyces cerevisiae* altı ay boyunca 4°C'de depolanmıştır. 180 günlük depolamanın sonunda MM örneklerinin, FMM'den daha iyi bir canlılık gösterdiği, koruyucu amaçla süt içerisine karıştırılan 300 mM oranındaki trehaloz veya sükroz şekeri ilavesinin ise canlılık üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. 4°C'de 30 ila 180 günlük depolama arasında, MM'deki her bir mikroorganizma canlılığının yaklaşık 2 log, FMM'deki *L. plantarum* ve mayaların canlılık oranlarının ise yaklaşık 6 log azaldığı bildirilmiştir (Bolla ve ark., 2011).

Bir çalışmada, *Micrococcus varians* ve *L. plantarum*'un dondurma veya dondurarak kurutma sonrasındaki canlı kalma oranları, beş farklı kriyoprotektanın (sükroz, laktoz, sodyum glutamat, pepton, kuru yağsız süt) tek başına veya jelatin, glutamik asit ve sodyum asetat ile kombinasyonları kullanılarak araştırılmıştır. Oluşturulan örnekler oda sıcaklığında veya 5°C'de, vakum altında veya havalı şartlar altında 6 aya kadar depolanmıştır. Canlılığın %100 oranında korunması nedeniyle sırasıyla %8 ve %5 oranında kullanılan yağsız süt tozu ve peptonun en iyi kriyoprotektanlar olduğu bulunmuştur. Kullanılan hemen hemen tüm koruyucuların varlığında donma ve dondurarak kurutma işleminden hemen sonra canlı kalan mikrokokların sayısı %100 iken, depolama sırasında, canlı hücre sayısının hızla azaldığı, özellikle de oda sıcaklığında ve hava ortamında depolandıktan sonraki 3 ay içinde sıfıra ulaştığı gözlenmiştir. Ancak Laktobasillerin depolanma kabiliyetinin oldukça yüksek olduğu ve canlı kalma yüzdesinin azalmasına bakılmaksızın, her iki test sıcaklığında 6 aylık depolamadan sonra yeterli sayıda canlı hücre kaldığı bildirilmiştir. En iyi sonuçlar,

mikroorganizmaların düşük sıcaklıklarda (+5°C) ve vakum altında depolanmasıyla elde edilmiştir (Tsvetkov ve Brankova, 1983).

Lactobacillus acidophilus'un çeşitli kriyoprotektanlarla dondurarak kurutulması ve farklı sıcaklıklarda (-18°C, 4°C ve 25°C) 6 ay depolama periyodunda canlılığının araştırıldığı bir çalışmada, kriyoprotektan oranları %13 trehaloz, %0.33 Na₂HPO₄, %7.5 laktoz ve %21 yağsız süt tozu olacak şekilde optimize edilmiştir. İşlem sonunda *L. acidophilus*'un canlılığının kontrol (%36.6) ile karşılaştırıldığında (%93.9) oldukça yüksek olduğu ve düşük sıcaklıklarda (-18°C ve 4°C) uygulanan depolamanın canlılığı daha iyi koruduğu tespit edilmiştir (Shu ve ark., 2018).

Dondurarak kurutma yönteminin *Trichoderma* cinsi küf suşlarının canlılığı ve depolama stabilitesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kriyoprotektan olarak %10 oranında maltodekstrin kullanılmıştır. Genel olarak, maltodekstrin ilavesinin, test edilen *Trichoderma* suşlarının canlılığı ve depolama stabilitesi üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı, yalnızca iki *T. atroviride* suşunun, depolama stabilitesini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir (Grzegorzcyk ve ark., 2018).

Koruyucu madde olarak glukoz, sükroz, trehaloz ve maltodekstrin kullanılarak liyofilize edilen *Enterococcus faecium* ve *L. plantarum*, 6 ay boyunca 4, 22 ve 35°C'de saklanmış ve canlı kalma seviyeleri belirlenmiştir. Dondurarak kurutmadan sonra *L. plantarum* hücrelerinde en yüksek canlılık, kriyoprotektan olarak trehaloz ve sükroz kullanımı ile elde edilmiştir. Glikoz ve maltodekstrin muamelesinin ise canlı kalma oranlarını değiştirmedığı tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek depolama sıcaklıklarının, canlı bakteri hücrelerinin sayısında daha fazla bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (Strasser ve ark., 2009).

%8 sakaroz, %1.5 jelatin ve %10 oranında yağsız süt içeren ve %5 laktoz, %1.5 jelatin ve %1 gliserol içeren 2 ayrı ortamda dondurarak kurutulan *Bifidobacterium breve* A71 ve *Bifidobacterium bifidum* BbTD suşları, %66.2 – 83.3 arasında değişen yüksek bir canlılık sergilemiştir. Suşların ikinci ortamda daha fazla canlı kaldığı tespit edilmiştir. Donma direncinin, gliserol gibi bir kriyoprotektif ajan eklenerek geliştirileceğini bildirmişlerdir (Trsic-Milanovic ve ark., 2001).

Başka bir çalışmada, her biri %0.5 oranında olacak şekilde askorbik asit, tiyüere ve amonyum klorür eklenmiş %10 kuru maddeli yağsız sütte dondurarak kurutulan *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* cinsi 23 bakterinin, kurutma sonunda test ampullerinin yarısı vakum altında (oda basıncı 20–25 mikron Hg), diğer yarısı hava ile kapatılarak 2 ay boyunca 30°C'de saklanmıştır. Genel olarak, dondurarak kurutma

işleminde sonra vakumla kapatılan kültürler, hava ortamında kapanan kültürlerle oranla daha yüksek hücre canlılığı (% 80–100) göstermiştir. 2 ay depolama ile süresinde ise yine vakum altında kapanan kültürlerin önemli oranda canlılığını koruduğu görülmüştür (Sinha ve ark., 1974).

De Giulio ve ark. (2005), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*'u %32 oranında trehaloz, maltoz, sükröz, glikoz ve laktoz içeren şeker çözeltileri içerisinde 4°C'de 2 saat inkübe ettikten sonra dondurarak kurutmuşlardır. Test edilen tüm şekerler, izotonik çözeltilere kıyasla hücre canlılığı üzerinde koruyucu bir etki göstermiştir. Suşlara göre farklılık gösterse de, trehalozun bakteri canlılığının korunmasında en etkili şeker olduğu bildirilmiştir.

Laktoz, yağsız süt, askorbik asit ve bunların kombinasyonları içinde dondurarak kurutulan *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* ve *L. salivarius*, jelatin kapsüller içine doldurularak, karanlıkta 5°C'de saklanmıştır. Dondurarak kurutmadan hemen sonra, test edilen üç suşun canlılığının, analiz edilen tüm koşullarda 0.05–2 log arasında azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, farklı bileşiklerin tek başına veya kombinasyonlarının kullanımı, depolama süresi boyunca *Lactobacillus* hücrelerinin canlılığı üzerine pozitif etki yapmıştır. Özellikle, askorbik asitin hem ayrı ayrı kullanımı hem de laktoz, süt veya ikisi ile birlikte kullanımı, üç *Lactobacillus* suşu için depolama sırasındaki canlı kalma oranlarını önemli ölçüde arttırmış ve en az 12 ay boyunca yüksek canlılık gözlenmiştir. Öte yandan, yalnızca laktoz veya yağsız sütle depolanan liyofilize mikroorganizmalar, depolamanın ilk aylarından başlayarak önemli ölçüde azalma göstermiştir (Zárate ve Nader-Macias, 2006).

Yukarıda bahsedilen kaynaklardan da anlaşıldığı üzere, büyüme fazı, süspanse edici sıvı ortam, hücre konsantrasyonu, süspanسیون hacmi, kurutma ve dondurarak kurutma tekniği gibi liyofilizasyon proses koşullarının, mikrobiyal canlılığı güçlü bir şekilde etkilediği pek çok yazar tarafından bildirilmektedir (Tsvetkov ve Brankova, 1983; Bolla ve ark., 2011). Bu nedenle, hem literatür içerisindeki çalışmalarda, hem de bu çalışmada elde edilen sonuçlar değişkenlik gösterebilmektedir.

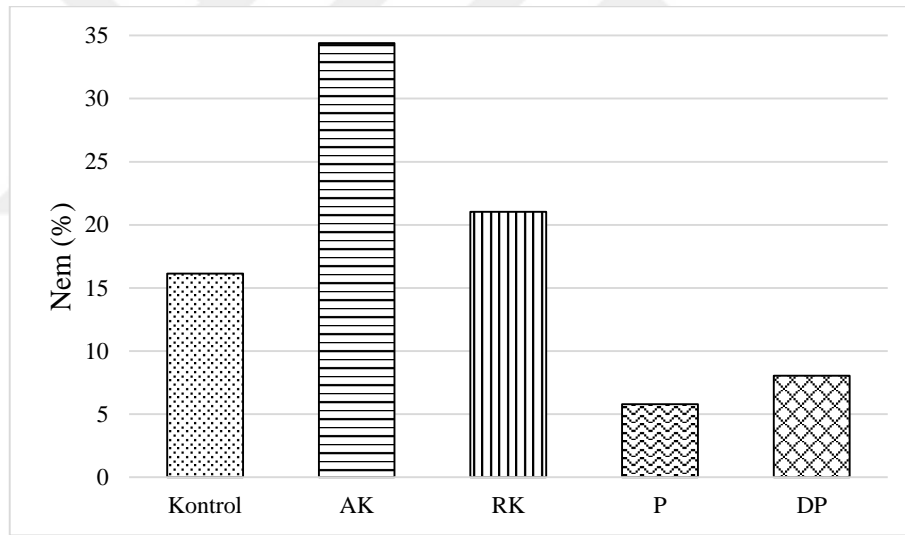
4.6.2. Liyofilize kültürlerin nem miktarları ve kullanılan koruyucu ajanların kuruma etkinliği üzerine etkisi

Farklı kriyojenik maddelerle muamele edilerek liyofilize edilen kültürlerin işlemiden hemen sonraki nem miktarları Şekil 4.14'te görülmektedir. Endüstriyel üretime yönelik tasarlanan bu çalışmada kültürler liyofilizatöre büyük miktarlarda beslenmiştir. Tüm kültürler aynı miktarda ve aynı şartlar altında 2 gün süre ile dondurarak kurutulmuştur. Böylece kullanılan kriyoprotektif ajanların kurutma etkinliklerinin belirlenerek liyofilizasyon işlemine uygunluğu da tespit edilmek istenmiştir. Uygulanan sabit liyofilizasyon süresi sonucunda kültürlerin nem içerikleri oldukça farklılık göstermiştir. Sonuçlara göre her bir koruyucu maddenin kuruma etkinliğinin farklı olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun ve yeterli kuruma %5.80 ve %8.06 nem içeriği ile sırasıyla P ve DP kültürlerinde gerçekleşmiştir. Kontrol, AK ve RK örneklerinin nem içerikleri ise sırasıyla %16.14, %34.41 ve %23.03'tür. Kontrol örneğinin beklenenden daha az kuruma göstermesinin nedeni, liyofilizatöre büyük miktarlarda beslenmesi ve bu miktardaki örneğe kurutma süresinin yeterli gelmemesi olabilir. Ayrıca kontrol örneğinin başlangıç kuru madde içeriği %10 iken, koruyucu ajan içeren kültürlerin %15 olması da, kuruma etkinliğinin düşük olmasına büyük ölçüde neden olmuş olabilir. Kazein içeren örneklerin, bilhassa da asit kazein ilaveli örneğin, en yüksek nem değerine sahip olduğu görülmüştür. RK kültürünün, AK kültürüne kıyasla daha düşük nem içermesinin nedeni, rennet kazeinin oluşturduğu jelin nispeten daha büyük gözeneklere sahip olması sonucunda daha fazla buzun süblime olması olabilir. Kazein molekülünün oluşturduğu protein ağ yapısı içerisine hapsedilen su moleküllerinin kuruma sırasında uzaklaşmasının daha zor olması nedeniyle bu örneklerin kuruma etkinliğinin oldukça düşük olduğu ve büyük miktarda kültürlerin üretildiği bir dondurarak kurutma prosesiyle yeterli derecede kuru bir ürün elde edilmesini engellediği görülmektedir. Bu nedenle kazeinlerin koruyucu ajan olarak kullanıldığı liyofilizasyon işlemlerinde kültür miktarının azaltılıp, kurutma süresinin de uzatılması zorunlu bir uygulama olarak görülmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına benzer olarak, Clementi ve Rossi (1984a), *Leuconostoc oenos* hücrelerini akışkan yataklı bir sistemde kurutarak depoladıkları çalışmalarında, kurutulmuş preparatlarda %10 nem değeri, hücre canlılığı için kritik bir nokta olarak kabul edilse de, bu değer üstünde de bakteriyel canlılıkta önemli bir azalma gözlemlenemediklerini bildirmişlerdir.

Dolly ve ark. (2011), duvar materyali olarak peynir altı suyu proteini kullandıkları *L. plantarum* enkapsülasyon işlemi, %30 (a/h) kuru madde içeren 165 ve 210 ml hacmindeki kültür solüsyonlarını 8 saat boyunca liyofilize etmişlerdir ve nem miktarlarını sırasıyla %5.60 ve 3.61 olarak tespit etmişlerdir.

Enterococcus faecium ve *L. plantarum*'un liyofilizasyonunda koruyucu olarak glukoz, sükröz, trehaloz ve maltodekstrinin kullanıldığı bir çalışmada elde edilen kültürlerin nem içeriğinin %1.9–8.0 arasında olduğu bildirilmiştir. *L. plantarum* formülasyonlarının nem içeriği %1.9–4.7 arasında yer alırken, en kuru ürünler maltodekstrin ile formüle edilmiş hücrelerden elde edilmiştir. En düşük nem içeriğine sahip olan glikoz ve maltodekstrin ile formüle edilen *L. plantarum*'un, dondurarak kurutma işleminden sonraki canlılıklarının daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, önemli hücre moleküllerinin hasar görmesine neden olan yapısal suyun kurutma sırasında uzaklaşması ile açıklanmıştır (Strasser ve ark., 2009).



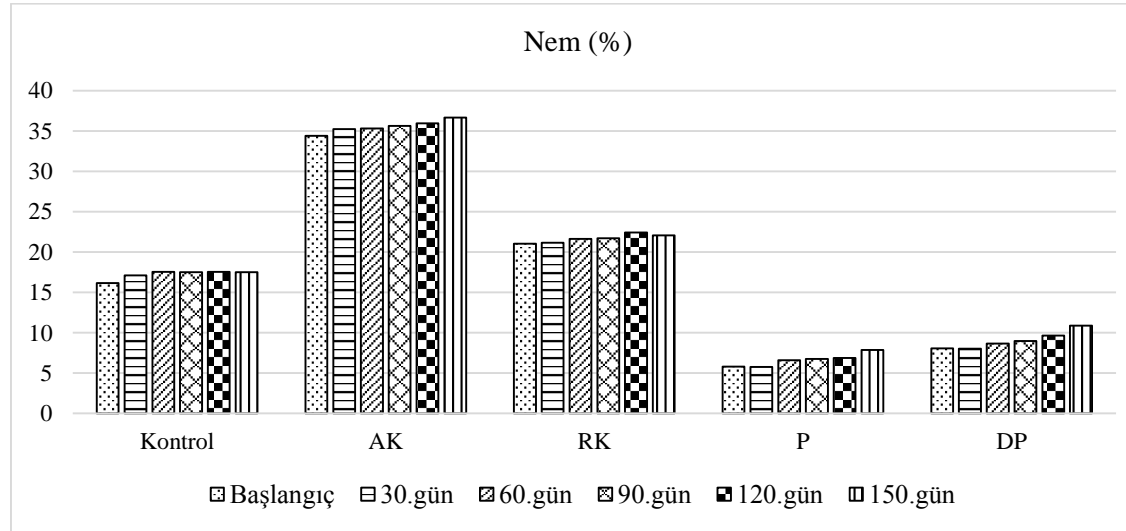
Şekil 4.14. *L. plantarum* kültürlerinin liyofilizasyondan hemen sonra belirlenen nem değerleri (%)

Zayed ve Roos (2004), dondurarak kurutulmuş *Lactobacillus salivarius* hücrelerinin depolanması için optimum nem içeriğinin yaklaşık % 2–8 ila %5–6 arasında değiştiğini bildirmiştir. Dondurarak kurutulmuş kültürlerde tatmin edici bir canlılık oranı için belirli bir miktar suyun kalması gerektiğini ve bu kalan nem miktarının dondurarak kurutma ortamının tipi ile doğrudan ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 4.12. Liyofilize *L. plantarum* kültürlerine ait nem değerleri (%)[†]

	Depolama süresi (gün)						Ortalama
	0	30	60	90	120	150	
Kontrol	16.14±0.07 ^{ab}	17.12±0.05 ^a	17.55±0.17 ^a	17.52±0.71 ^a	17.54±0.14 ^a	17.50±0.58 ^a	17.23
AK	34.41±1.58 ^{ad}	35.26±0.11 ^a	35.33±0.09 ^a	35.63±0.14 ^a	35.94±1.58 ^a	36.68±0.05 ^a	35.54
RK	21.03±1.14 ^{ac}	21.17±1.01 ^a	21.63±0.52 ^a	21.71±0.19 ^a	22.43±0.39 ^a	22.07±0.05 ^a	21.67
P	5.80±0.76 ^{aA}	5.75±0.29 ^a	6.58±0.16 ^{ab}	6.77±0.17 ^{ab}	6.71±0.67 ^{ab}	7.88±0.04 ^b	6.61
DP	8.06±0.30 ^{abA}	8.01±0.15 ^a	8.64±0.44 ^{ab}	8.99±0.01 ^{bc}	9.64±0.20 ^c	10.89±0.00 ^d	9.04

[†]Ortalama ± standart sapma. a-b: Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). A-D: Aynı sütundaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir. (p<0.05). AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.



Şekil 4.15. Liyofilize *L. plantarum* kültürlerinin depolama boyunca nem değerlerindeki değişimler

Bu çalışmada aynı zamanda depolama süresince nem miktarlarındaki değişimler de incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.12 ve Şekil 4.15'te sunulmuştur. Başlangıç nem miktarı yüksek olan kontrol, AK ve RK kültürlerinin nem değerlerinde, depolama süresince anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir ($p>0.05$). P numunesinin 150 günlük depolama sonrasında, nem değerlerinde belirgin bir artış ($p<0.05$) görülürken, DP numunesinde ise 90, 120 ve 150 günlük depolamaların her birinde artış olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak başlangıç nem miktarları yüksek olan örneklerin nem değerleri depolama süresinden etkilenmezken, daha kuru olan P ve DP örneklerinin ise giderek nem miktarlarında artış gözlenmiştir. Zamanla örneklerin su miktarında meydana gelen bu artışın, kültürleri saklamak amacıyla kullanılan ambalajların nem bariyerinin zayıf olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Kuruma oranı, bakterilerin canlılık seviyelerini sadece dondurarak kurutulduktan sonra değil depolama süresince de etkileyebilmektedir. Kültürlerin maksimum stabilitesi için optimum bir nem içeriğine sahip olması gerektiği gösterilmiştir. Hücresel materyallerin aşırı kurutularak tüm suyun uzaklaştırılması, proteinlerin bozulmasına ve hidrofilik bölgelerin oksijen gibi gazlara maruz kalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle nem içeriğinin %0.5'in altına düşmesi ile ölüm oranı yükselmektedir. Kültürlerin az kuruması ile partiküllerin yüzeyindeki makromoleküllerin oksidasyonuna karşı koruyucu bir su bariyeri oluşmasına rağmen, çeşitli kimyasal reaksiyonları da meydana getirebilmektedir (Champagne ve ark., 1991). Clementi ve Rossi (1984b) tarafından yapılan bir çalışmada, *Leuconostoc oenos*'un az kuruyan kültürlerin zayıf stabilite göstererek, depolama sırasında canlılıklarının hızlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir.

Donmuş mikroorganizmaların canlılığını korumak için oksijen ve nem ile gereksiz temasını önlemek için önlemler alınmalıdır. Kültür ortamında kalan suyun hareketi, yoğun oksidasyon etkisi yaratarak bakteri canlılığına sıklıkla zarar vermektedir. Hücre içi aktif olan suyun sürekli göç etmesi, canlılık kaybına yol açmaktadır (Shu ve ark., 2018).

Higroskopik davranış nedeniyle polisakkarit ve protein bazlı kurutulmuş ürünlerin daha yüksek nem içerdiği bildirilmektedir. Bununla birlikte toz ürünlerde nem içeriğinin, %5'in altında olmasının daha uzun bir raf ömrü sağlayacağı ileri sürülmüştür (Muhammad ve ark., 2017). Bu çalışmada, literatürde belirtilen aralıkların çok üstünde nem içeriğine sahip olan kontrol, AK ve RK örneklerinin, depolama sırasında yine de yüksek canlılık sergilediği görülmüştür. Bunun nedeni, kullanılan kriyoprotektanların etkinliğinin yanı sıra kültürlerin vakum altında depolanması da olabilir. Vakum veya inert

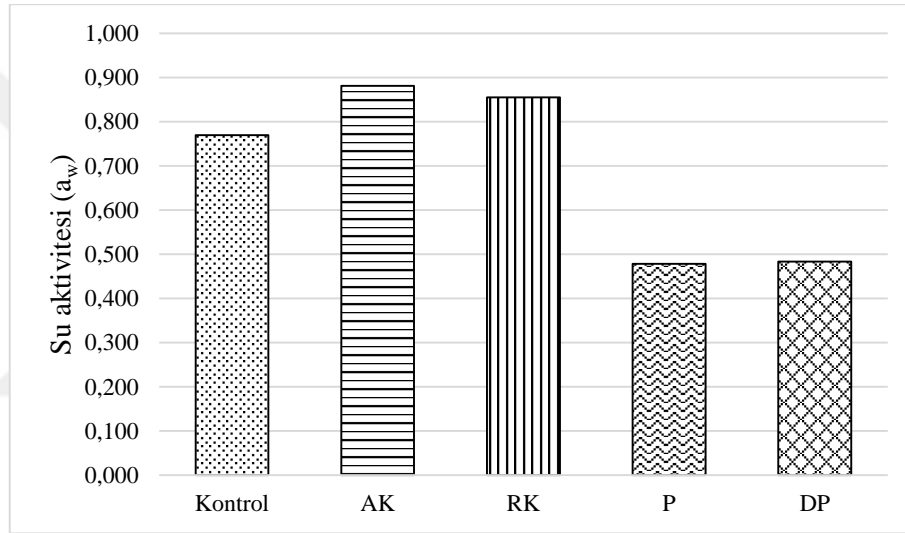
gazlar altında depolamanın bakteri canlı kalımını arttırdığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Sinha ve ark., 1974; Yang ve Sandine, 1979; Tsvetkov ve Brankova, 1983). Depolama sırasındaki hücre ölümlerinin bir nedeninin de önceden oluşan serbest radikallerin varlığı olduğu düşünülmektedir. Depolamanın erken dönemlerinde, oksidasyon reaksiyonlarının, serbest moleküler oksijenin varlığına veya yokluğuna değil, süspansiyon halindeki matris içindeki reaktif serbest radikallerin varlığına bağlı olduğu tahmin edilmektedir. Oksidasyonun sonuçları hücre için çok önemli olabilmektedir. Askorbat veya sistein varlığında inkübe edilen mitokondriyal membranlarda lipid peroksidasyonunun bir sonucu olarak membran yapısının ve fonksiyonunun yitirilmesi ile bazı enzim aktivitelerinin kaybı söz konusu olabilmektedir. Biyomembranların kontrolsüz peroksidasyonu, membran yapısı ve fonksiyonu üzerinde derin etkilere yol açarak, hücre ölümlerine neden olabilmektedir (Castro ve ark., 1995). Bu nedenle bu çalışmada üretilen kültürlerin vakum koşulları altında saklanması canlılık kaybını minimize ettiği düşünülmektedir.

4.6.3. Liyofilize kültürlerin su aktivitesi (a_w) değerleri

Farklı kriyojenik maddelerle muamele edilerek liyofilize edilen kültürlerin işlemiden hemen sonraki su aktivitesi miktarları Şekil 4.16'da görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre kültürlerin su aktivitesi değerlerindeki farklılıklar, nem içeriklerine benzerlik göstermiştir. Kültürler içinde en düşük su aktivite değerlerinin ortalama 0.515 ve 0.513 ile sırasıyla P ve DP örneklerine ait olduğu belirlenmiştir. En yüksek su aktivite değerinin ise kazein içeren örneklerde olduğu görülmektedir.

Proteinlerde, buhar basıncının artmasıyla (a_w 0.2–0.7), noniyonik hidroksil grupları ve peptit bağları kademeli olarak doyurulmaktadır ve peptit bağlarının a_w 0.6–0.8 arasındayken, bağlı suyun %50'sinden fazlasını bağlayabildiği bildirilmektedir. Psödokristalin hidrat yapıları, hidrofobik bölgeler etrafında, muhtemelen diğer bağlı suyla devamlı olarak oluşturulmaktadır. a_w 0.7'nin üstünde ise, ihmal edilebilir düzeyde kısıtlı hareket kabiliyetine sahip çok katmanlı suyun, önceki katmanlara bağlanması neticesinde oluşan yığın su boşluklarına ve yarıklara tutunmaktadır (Kinsella ve ark., 1986). Bu çalışmada, kazein içeren örneklerin protein miktarının fazla olmasının, tutulan su miktarının artmasına neden olduğu ve örneklerin kurummasının güçleştiği tahmin edilmektedir.

Peynir altı suyu protein özelliklerinin kurutma yönteminden etkilendiği, dondurarak ve püskürterek kurutulan tozların, tambur, hava ve vakumla kurutulmuş peynir altı suyu protein numunelerinden daha fazla yüzey alanına ve yüksek oranda tek tabakalı su içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca peynir altı suyu tozlarında a_w 0.6'nın altındayken suyun esas olarak makromoleküler bileşenler (yani proteinler) tarafından adsorbe edildiği bildirilmektedir. Bu çalışmada PAST ve DPAST içeren örneklerin a_w değerlerinin tüm depolama boyunca 0.479–0.531 arasında olduğu görülmektedir. İçeriğindeki bu aktif suyun muhtemelen laktoglobülinler tarafından tutulduğu düşünülebilir.



Şekil 4.16. Liyofilize *L. plantarum* kültürlerine ait su aktivite değerleri

Depolama süresince kültürlerin su aktivite değerleri takip edilerek, elde edilen sonuçlar Şekil 4.17 ve Çizelge 4.13'te sunulmuştur. Su aktivitesi en yüksek olan kazein ilaveli kültürlerde, depolama süresince su aktivite değerlerinin değişmediği görülmüştür. Kontrol örneğinin ise 30. gün depolama sonunda su aktivitesinin belirgin olarak arttığı ve sonra depolama boyunca tekrar değişmediği tespit edilmiştir. Başlangıçta su aktivitesi en düşük olan P ve DP kültürlerinin su aktivite değerlerinin depolama sürecinden en fazla etkilendiği görülmektedir. Depolama boyunca artan su aktivite değerlerinde istatistiksel olarak belirgin artışlar P örneği için 30. ve 90. günde gözlemlenirken, DP örneği için ise 30, 60 ve 90 günlük ölçümlerde gerçekleşmiştir. Sonraki depolama periyodunda ise belirgin bir değişim gözlenmemiştir.

Champagne ve ark. (1991), kabul edilebilir canlılık için optimum su seviyesinin (a_w), laktik asit bakterileri için 0.1 olarak bildirilmektedir. Muhammad ve ark. (2017) ise toz haldeki ürünlerin a_w içeriğinin 0.3'ün altında olmasıyla, biyokimyasal reaksiyonların azalarak, ürünlerin raf ömrü üzerine pozitif etki yapacağını ifade etmişlerdir. Bunun nedeni olarak, kurutma işleminden sonra kültür ortamında kalan veya hücre içinde aktif olan suyun hareketliliğinin, yoğun bir oksidasyon etkisi yaratarak, canlılık kaybına yol açması gösterilebilir (Shu ve ark., 2018). Buna göre bu çalışmada elde edilen kültürlerin su aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Castro ve ark. (1995), %0, 11, 23, 33, 59, 63 ve 75 bağıl neme sahip ortamlarda, 5 ve 20°C'de depolanan yağsız sütte liyofilize edilmiş *Lactobacillus bulgaricus* kültürlerinin depolama sırasındaki canlı kalım oranlarını araştırmışlardır. Liyofilize kültürlerin soğuk şartlar altında depolanması ile daha fazla canlılık elde edilmiştir. En yüksek canlılık ise %11 bağıl nemde ve 5°C'de gerçekleşmiştir. Hücre canlılığının her iki sıcaklıkta da numunelerin depolandığı bağıl neme bağlı olduğu bildirilmiştir. Hücre canlılığının depolamanın ilk döneminde hızlı bir şekilde azaldığı ancak daha sonraki dönemlerde özellikle de düşük ve orta bağıl nem ortamlarında oldukça stabil oldukları görülmüştür (Castro ve ark., 1995).

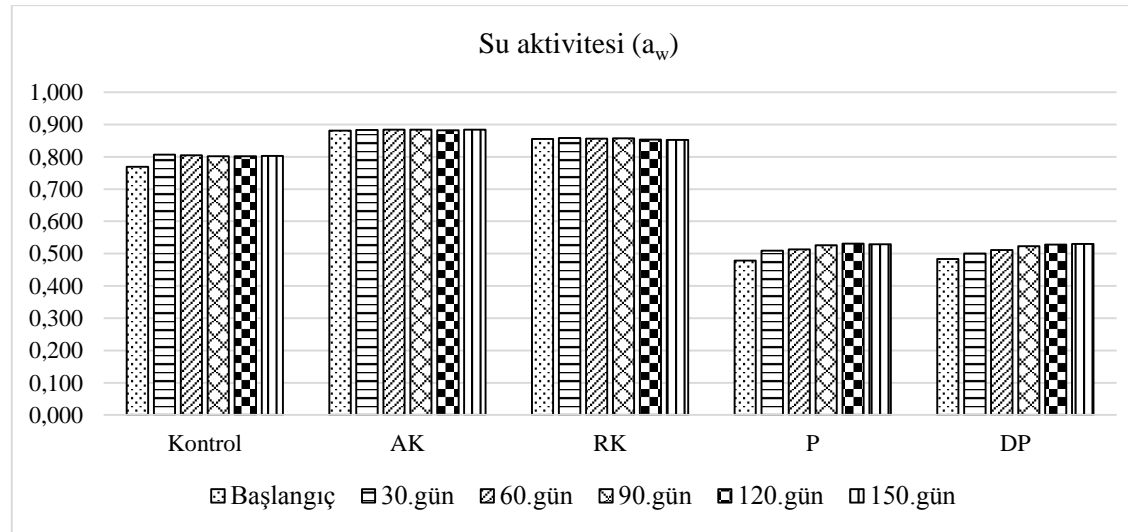
Bu çalışmada elde edilen kültürlerin canlı kalma oranı ilk ayda önemli ölçüde azalmasına rağmen sonrasındaki azalma eğiliminin daha kontrollü ve istikrarlı seyrettiği görülmektedir (Şekil 4.13). Canlılıktaki bu azalma, depolama sırasındaki su aktivitesi (a_w) ile ilişkilendirilebilir. İlk aşamadaki hızlı düşüş, yüksek a_w koşulunda meydana gelen suyun sürekli yer değiştirmesiyle bağlantılı olabilir. Başlangıçtaki yüksek nem içeriğinden kaynaklanan bu olumsuz etki, kriyoprotektan desteği ile depolama süresince oldukça azalmıştır. Ancak, erken aşamada canlılıkta gerçekleşen hızlı düşüş kaçınılmaz olmuştur.

Bu çalışmaya benzer sonuçlar, Shu ve ark. (2018) arkadaşlarının *Lactobacillus acidophilus*'u çeşitli kriyoprotektanlarla liyofilize ederek farklı sıcaklıklarda (-18, 4 ve 25°C) 6 ay boyunca depoladıkları ve canlılığını araştırdıkları çalışmada elde edilmiştir. 4°C'de ve -18°C'de 30 gün depolandıktan sonra canlılığın hızla %60'a düştüğünü, hatta 25°C altında yalnızca %20 oranında hücrenin canlı kaldığını bildirmişlerdir. Bu hızlı düşüşü örneklerin sahip olduğu yüksek a_w değerine bağlamışlardır. Depolamanın başında görülen canlılıktaki bu hızlı düşüş kriyoprotektaşların etkisiyle depolama süresince azaldığı gözlenmiştir (Shu ve ark., 2018).

Çizelge 4.13. Liyofilize *L. plantarum* kültürlerinin depolama boyunca su aktivitesi değerleri[†]

	Depolama süresi (gün)						Ortalama
	0	30	60	90	120	150	
Kontrol	0.770±0.005 ^{aB}	0.807±0.002 ^b	0.805±0.002 ^b	0.802±0.003 ^b	0.802±0.003 ^b	0.803±0.001 ^b	0.798
AK	0.882±0.006 ^{aD}	0.883±0.002 ^a	0.884±0.000 ^a	0.884±0.005 ^a	0.882±0.001 ^a	0.884±0.001 ^a	0.883
RK	0.856±0.001 ^{aC}	0.858±0.001 ^a	0.857±0.003 ^a	0.857±0.003 ^a	0.854±0.001 ^a	0.853±0.002 ^a	0.856
P	0.479±0.001 ^{aA}	0.509±0.000 ^b	0.514±0.002 ^b	0.526±0.003 ^c	0.531±0.001 ^c	0.530±0.001 ^c	0.515
DP	0.483±0.000 ^{aA}	0.501±0.004 ^b	0.511±0.001 ^c	0.524±0.002 ^d	0.528±0.001 ^d	0.530±0.001 ^d	0.513

[†]Ortalama ± standart sapma. a-d: Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). A-D: Aynı sütundaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.



Şekil 4.17. Liyofilize *L. plantarum* kültürlerinin depolama boyunca su aktivitesi değerlerindeki değişimler

4.6.4. Liyofilize kültürlerin sorpsiyon özellikleri

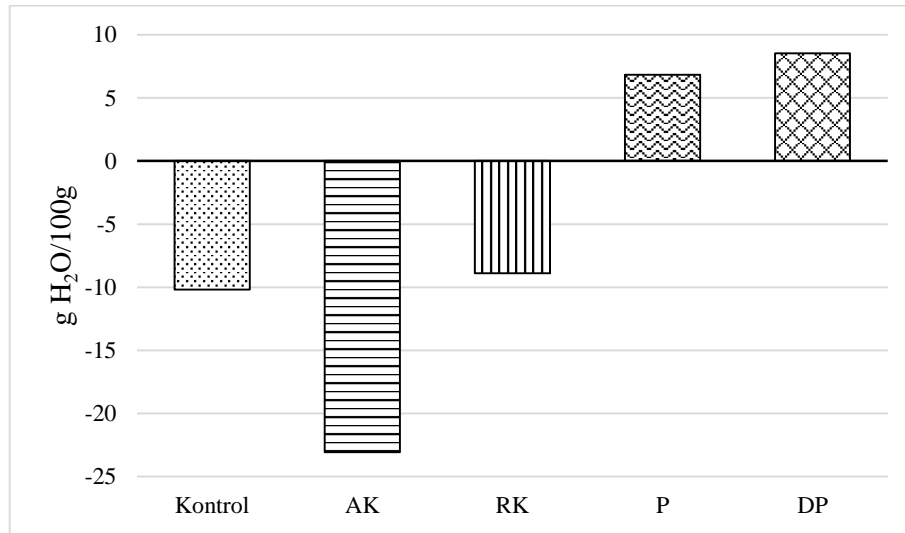
Gıda tozları genellikle yapışma ve kekleşme problemlerine eğilimlidir. Su, bu tür problemlerden sorumlu bir faktör olduğundan, nem sorpsiyon izotermi, bir tozun nem ilişkisini ve sonuç olarak stabilite problemlerini anlamak için yararlı bir araçtır. Gıda tozlarının nem sorpsiyon davranışı, tozun nem içeriği ile çevre ortamın bağıl nemi arasındaki denge ilişkisini tanımlamaktadır. Süt tozları için nem sorpsiyon davranışını bilmek camsı geçiş sıcaklığı profilleri ile birlikte tozların stabilitesi hakkında önemli bilgiler sağlaması bakımında yararlıdır (Foster ve ark., 2005).

Su hidrasyonu ve dehidrasyonu, birçok gıda sisteminin kurutulmasını, depolama stabilitesini ve proteinlerin davranışını etkilemektedir. Toz ürünlerin depolama stabilitesinin belirlenebilmesi ve farklı koşullar altında depolanmaları sırasında, a_w kontrolü sağlayabilmek adına en uygun nem geçirgenlik özelliklerine sahip ambalaj malzemelerinin seçilebilmesi için su sorpsiyon davranışlarının bilinmesi gereklidir. Örneğin higroskopik özellikteki peynir altı suyu tozlarının kekleşmesinin veya süt tozlarındaki esmerleşmenin önlenmesi için bu materyallerin su sorpsiyon davranışları incelenmektedir. Su sorpsiyon özelliklerini ve a_w 'i etkileyen faktörler, gıda ürünlerinde mikroorganizma gelişimini kontrol etmek, kalitenin bozulmasını en aza indirmek, güvenliği sağlamak ve bazı gıdalarda uygun mikroflorayı seçmek için hayati önem taşımaktadır. Toz materyallerin su sorpsiyon davranışının anlaşılması ile su tutma özellikleri, gözeneklilik, sorpsiyon/desorpsiyon entalpilerinin değerlendirilmesi, spesifik yüzey alanı ve bileşenlerin kristalin olma durumu (laktöz) belirlenebilmektedir. Böylece uygulanan proseslerin (örn., kurutma) optimizasyonunun tahmini, ambalaj ihtiyaçlarının belirlenmesi, mikrobiyolojik, kimyasal ve fiziksel kararlılığın ve genel kalitenin tahmini ve kontrolü yapılabilmektedir. Özetle, nem içeriği, sorpsiyon davranışı ve a_w bilgisi, mikrobiyal stabiliteyi sağlamanın yanı sıra depolanan gıdaların çeşitli kimyasal, fiziksel ve kalite özelliklerinin kontrolünü kolaylaştırmaktadır (Kinsella ve ark., 1986).

Bu çalışmada farklı kriyojenik maddelerle muamele edilerek liyofilize edilen kültürler, %75 bağıl nem içeren ortamda 7 gün boyunca bekletilerek nem kaybetme ve kazanma oranları belirlenmiştir. Depolama öncesi, kültürlerin su adsorpsiyon ve desorpsiyon miktarları Şekil 4.18'de görülmektedir. Kontrol, AK ve RK örneklerinin nem içeriğinin yüksek olması nedeniyle %75 bağıl nemli ortamda desorpsiyona uğradığı, nispeten daha düşük nem içeriğine sahip P ve DP örneklerinin ise su absorbe ettiği görülmektedir. Stokes ve Robinson (1949) doygun NaCl çözeltisinin su aktivitesi

değerinin 0.7528 olduğunu bildirmişlerdir. Buradan yola çıkılarak su aktivitesi bu değer altında olan P ve DP örneklerinin denge buhar basıncına ulaşana kadar nem kazandığı, bu değer üstünde olan diğer örneklerin ise nem kaybettiği söylenebilir.

Matris bileşenlerinin higroskopikliğinin (su adsorplama yeteneği) ve su bağlama kapasitesinin, gıda tozlarındaki kalıntı su içeriğini ve su aktivitesini etkilediği bildirilmektedir (Muhammad ve ark., 2017). Buna göre nem içeriği en yüksek olan AK kültürü, en fazla nem kaybeden (23.08 g H₂O/100 g) örnek olmuştur. Nem içerikleri sırasıyla %16.14 ve 21.03 olan kontrol ve RK kültürlerindeki su kaybı 10.17 ve 8.9 g H₂O/100 g olarak belirlenmiştir. Buradan, yalnızca yağsız süt kuru maddesi içeren kontrol örneğinin su desorplama özelliğinin, kazein takviyesi ile azaldığı görülmektedir. RK ortamı hem liyofilizasyon sırasında kontrole göre daha az kuruma göstererek yüksek nemli kalmıştır, hem de %75 bağıl nem içeren ortamda daha az su kaybetmiştir. Rennet kazeinin oluşturduğu sert ağ yapısının suyun hareketini kısıtladığı veya suyu daha kuvvetli bağladığı düşünülebilir. P ve DP kültürleri kendi içinde kıyaslandığında örneklerin su absorplama yeteneklerinin nem içerikleriyle doğru orantılı olduğu görülmektedir. İlginç olarak, daha yüksek nem içeriğine (%8.06) sahip olan DP örneğinin, higroskopisitesinin de yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bakılarak, mineral içeriğindeki artışın, kültürlerin su absorplama ve desorplama özelliklerinin azalttığı yorumu yapılabilir.



Şekil 4.18. *L. plantarum* kültürlerinin depolama öncesindeki su sorpsiyon değerleri (%)

Kültürlerin depolama süresince sorpsiyon davranışları incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.14 ve Şekil 4.19’te verilmiştir. Depolama sırasında kontrol numunesinin su desorpsiyon özelliğinde başlangıca göre biraz azalma tespit edilirken, en belirgin azalma ise 150 günlük depolamanın sonunda belirlenmiştir. AK örneğinde ise ilk 30 gün içinde artan su desorpsiyon davranışı, kalan depolama süresince sabit kalmıştır. RK örneğinin, su desorpsiyon davranışının oldukça stabil olduğu görülmüştür, depolama boyunca değerlerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. P kültüründe, depolamanın ilk dönemlerinde adsorpsiyon yeteneğinin azaldığı, daha sonraki dönemde sabit kaldığı, ancak depolama periyodunun son 60 gününde ise giderek arttığı görülmüştür. DP örneğinin ise 60 gün boyunca sorpsiyon davranışını koruduğu, sonraki 60 günde azaldığı, ancak 150. günde belirgin bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

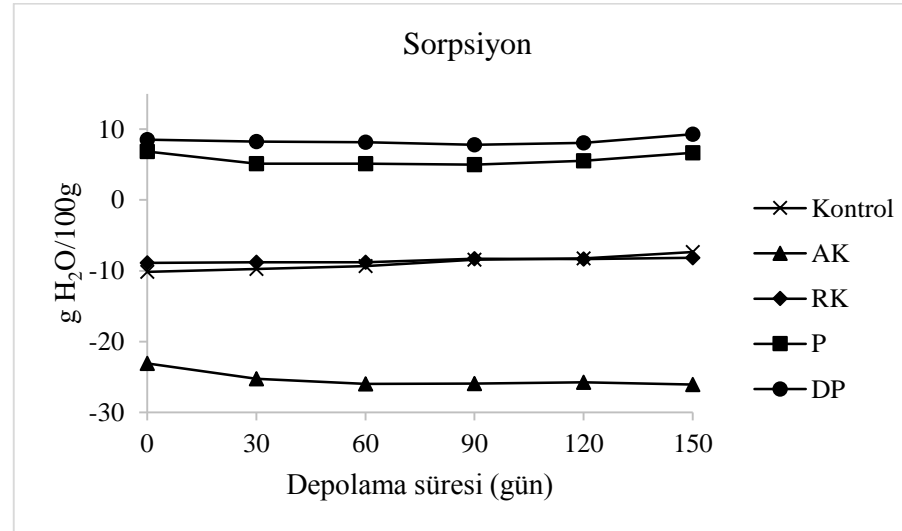
Depolama sırasında nem ve su aktivitesi değerleri sabit olan AK ve RK örneklerinin, sorpsiyon özelliklerinin de değişmediği görülmektedir. Özellikle AK kültürünün, yüksek nem ve su aktivitesine sahip olmasına rağmen, canlılığı korumadaki yüksek performansının nedeni, depolama süresince su sorpsiyon özelliklerinin değişmemesi olabilir. Moleküllerin hareketliliğinin azalması ile difüzyonun neden olduğu degradasyon reaksiyonlarının sınırlandığı (Chen ve Hang, 2019) ve suyun hareketliliğinden kaynaklanan oksidasyon etkisi nedeniyle canlılığın azaldığına (Shu ve ark., 2018) bölüm 4.6.1, 4.6.3 ve 4.6.4’te değinilmiştir.

Nem sorpsiyon histerezi, adsorpsiyon ve desorpsiyon izotermi arasındaki farklılığı açıklayan bir olgudur. Genellikle, desorpsiyon izotermi adsorpsiyon izotermi üzerinde yer alır ve birlikte kapalı bir histerezis döngüsü oluşturmaktadırlar. Spesifik bir nem içeriğine ulaşmak için, histerezis nedeniyle desorpsiyon işlemi, adsorpsiyona göre daha düşük bir buhar basıncı (P/P_0) gerekmektedir. Histerezis olgusu, depolanan gıdalardaki kimyasal bozulma ve fiziksel değişiklik oranlarını etkileyebileceğinden pratikte büyük öneme sahiptir. Süt proteinlerinde, histerezis döngüsü, bileşimden, yapıdan (örn., miseller, sodyum kazeinattan farklı davranır) ve hidrasyon/dehidrasyon geçmişinden etkilenmektedir (Kinsella ve ark., 1986). Bu çalışmadaki koruyucu madde olarak kazein ilave edilen örneklerin birbirinden farklı kuruma eğilimi ve su sorpsiyon davranışı göstermesinin nedeninin, yapısal bileşimlerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.14. Liyofilize *L. plantarum* kültürlerinin depolama boyunca su sorpsiyon değerleri (g H₂O/100 g)[†]

Örnek	Depolama süresi (gün)						Ortalama
	0	30	60	90	120	150	
Kontrol	-10.17±0.43 ^{aB}	-9.77±0.79 ^{ab}	-9.34±0.25 ^{ab}	-8.43±0.95 ^{ab}	-8.25±0.69 ^{ab}	-7.34±0.12 ^b	-8.88
AK	-23.08±0.08 ^{bA}	-25.27±0.48 ^a	-25.97±0.62 ^a	-25.95±0.17 ^a	-25.75±0.48 ^a	-26.08±0.36 ^a	-25.35
RK	-8.90±0.30 ^{aC}	-8.82±0.25 ^a	-8.78±0.86 ^a	-8.32±0.58 ^a	-8.35±0.71 ^a	-8.18±0.65 ^a	-8.56
P	6.85±0.18 ^{cD}	5.13±0.76 ^a	5.14±0.15 ^a	4.98±0.11 ^a	5.51±0.08 ^{ab}	6.68±0.16 ^{bc}	5.71
DP	8.53±0.01 ^{abE}	8.23±0.31 ^{ab}	8.17±0.50 ^{ab}	7.78±0.43 ^a	8.08±0.04 ^a	9.30±0.02 ^b	8.35

[†]Ortalama ± standart sapma. a-c: Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). A-E: Aynı sütundaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.



Şekil 4.19. Liyofilize *L. plantarum* kültürlerinin depolama boyunca su sorpsiyon değerlerindeki değişimler

Bir çalışmada, farklı oranlarda peynir altı suyu protein izolatu-karbonhidrat (maltodekstrin) matrislerinin ve bu matrislerde kapsüllenmiş *Lactobacillus rhamnosus* içeren dondurarak kurutulmuş tozların 25°C ve %33 ve %70 bağıl nemli ortamlardaki nem tutma özellikleri ve moleküler hareketliliği araştırılmıştır. Dondurarak kurutulmuş matrislerde probiyotikler için inaktivasyon hız sabitinin, nem kazanımı ve moleküler mobilite ile pozitif korelasyon gösterdiği çalışmada, probiyotiklerin camsı protein-karbonhidrat matrisindeki stabilitesini, matrisin bileşimine bağlamışlardır. Bu çalışma ile ortamın bağıl neminin aksine, nem tutma özelliklerinin ve matris bileşiminin sahip olduğu moleküler mobilitenin, depolama sırasındaki probiyotik canlılığını belirlenmesinde daha etkili olduğu ileri sürülmüştür (Hoobin ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında oluşturulan farklı kültür ortamlarının, farklı nem sorpsiyon davranışı göstermesi, literatüre göre olası bir durumdur. Bu durumda, kullanılan materyallerin nem tutma özelliklerini belirleyen veya değiştiren durumlar/faktörler ele alınmalıdır. Kinsella ve ark. (1986), su bağlama davranışını etkileyen faktörleri, kompozisyon, konformasyon, pH, iyonlar, sıcaklık ve yüzey alanı olarak bildirmişlerdir.

Çok farklı bileşim ve yapıdaki proteinler benzer su bağlama özellikleri göstermektedir. Fibröz ve globüler proteinlerin her ikisi de 30–55 g H₂O/100 g aralığında su bağlayabilmektedir. Bazı araştırmacılar su sorpsiyonunun proteinlerin yüzey alanından etkilenebileceğini bildirmiştir ve hidrasyonun yüzey alanına göre ifade edilmesini önermişlerdir. Örneğin, kristalize β -laktoglobulin, dondurarak kurutulmuş β -laktoglobulinden daha fazla su (%5) bağlamaktadır. Genellikle biraz daha büyük bir yüzey alanına sahip olan denatüre proteinler, doğal proteinlerden daha fazla (<%10) su bağlama eğilimindedir. Bununla birlikte, yüzey alanı tek başına tam bir açıklama sağlamamaktadır, proteinlerin doğası, yüzey polaritesi, yükü, hidrofobikliği ve yüzeydeki farklılıkların tümü hidrasyonu etkilemektedir. Hidrasyonun aynı zamanda amino asit bileşimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Hatta globüler proteinlerin yaklaşık hidrasyon seviyesi, a_w 'nin 0.6'dan düşük olduğu değerlerde makul doğrulukla amino asit bileşiminden tahmin edilebilmektedir. Aynı zamanda moleküler yapı ve konformasyonel özellikler de sorpsiyon davranışını etkilemektedir. Ayrıca, su moleküllerinin çoklu H⁺ bağları aracılığıyla bağlanabildiği boşlukların varlığı da, öngörülemeyen sorpsiyon ile sonuçlanabilmektedir. Benzer şekilde, %80 bağıl nemin üzerinde, protein molekülündeki polipeptitlerin arasına suyun girmesiyle oluşan şişme ile su adsorpsiyonu artırılabilir. Oligometrik proteinler (kazein submiselleri) ve misel yapılar söz konusu olduğunda, yaygın protein-protein etkileşimleri ve kazeinin kalsiyum fosfat

bağlarının çapraz bağlanması gibi nedenlerle, su sorpsiyon davranışını formülize ederek hesaplamak mümkün olmamaktadır. Ayrıca, misel matrisindeki boşluklara, herhangi bir spesifik protein grubuyla ilişkili olmayan suyun bağlanması da söz konusudur (Kinsella ve ark., 1986).

Misel kazein sistemi ve izole kazeinler, benzersiz su sorpsiyon özellikleri sergilemektedirler. Kazeinlerin su sorpsiyon davranışlarının, misel yapılarının kendiliğinden birleşme eğilimine, yüksek oranda fosforilatlanmış olmalarına ve şişme yeteneklerine bağlı olduğu bildirilmiştir. Santrifüj ile izole edilen yıkanmış liyofilize kazein misellerinin, a_w 0.7'ye kadar tipik bir sorpsiyon izotermi verdiği, a_w 0.75 – 0.95 arasında ise süt tozu ve sodyum kazeinata da gözlemlendiği gibi keskin bir artış göstermeden su adsorpsiyonu gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Sodyum kazeinatın ise, a_w 0.5'e kadar kazein miselleriyle benzer bir davranış sergilediği, daha sonra nemi hızla adsorpladığı tespit edilmiştir (Kinsella ve ark., 1986).

Peynir altı suyu tozlarının ve proteinlerinin çoğu, yaklaşık a_w 0.45'e kadar çok benzer sorpsiyon davranışı göstermektedir ki burada, su absorpsiyonu, esas olarak protein bileşenleri tarafından gerçekleşmektedir. Proteinlerin denatürasyonu, bu sorpsiyon davranışında çok az değişikliğe neden olmaktadır. a_w 0.3'ün üzerinde, su buharı adsorpsiyonundan sorumlu bir sonraki bileşen olan laktozun hidrasyonu başlamaktadır. Peynir altı suyu tozlarının izotermelerinde a_w 0.35–0.5 arasında eğride keskin bir azalma görülür. Bu ani düşüş, laktoz moleküllerine yeniden daha uygun bir kristal (α -laktoz monohidrat) kafes düzenlemek ve moleküler hareketliliği kolaylaştırmak için yeterli su sağlanmasıyla, amorf laktoz üzerine adsorbe edilen suyun hızla desorbe olarak laktozun kristalleşmesine bağlanır. Sorpsiyon eğrisindeki bu kırılmanın gözlemlendiği pozisyon veya a_w , numunenin bileşimine, özellikle protein içeriğine ve orijinal amorf laktoz miktarına göre değişmektedir. Genellikle, kırılma, laktozca zengin peynir altı suyu tozlarında, peynir altı suyu proteinlerine veya süt tozlarına kıyasla daha düşük a_w değerlerinde gözlenmektedir (Kinsella ve ark., 1986).

4.6.5. Liyofilize kültürlerin renk değerleri

Farklı koruyucu ajanlar ile üretilen *L. plantarum* kültürlerinin dondurarak kurutma işleminden hemen sonra ve depolama boyunca ölçülen L^* , a^* ve b^* renk değerleri Çizelge 4.16 ve Şekil 4.20'de gösterilmektedir. Aryana ve McGrew (2007), kullanılan bileşenlerin renginin, ürün rengini etkileyen faktörlerden biri olduğunu

belirtmişlerdir. Kültür ortamına ilave edilen koruyucu maddelerin -her ne kadar %5 oranında olsa bile- kültürlerin renkleri üzerinde de etkili olduğu görülmektedir.

En küçük L^* değerine sahip olan RK örneği 66.66 ile en koyu renge sahip kültürdür. Daha sonra bunu 78.46 ile AK örneği takip etmiştir. Bu sonuçlar, kazein ilavesinin kültür rengini koyulaştırdığı sonucuna varılmaktadır. P ve DP örneklerinin sırasıyla 93.05 ve 88.64 ile en yüksek L^* değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Kontrol örneğinin L^* değeri ise bu 2 grup koruyucu madde içeren kültürlerin arasında bir değer almıştır. DP örneğinin P örneğine göre daha düşük L^* değerine sahip olması, demineralizasyon işleminin L^* değerini azaltması yönünde bir etkisi var gibi düşündürse de, hammadde sonuçlarına bakıldığında öyle olmadığı görülmektedir. Çizelge 4.15'te kültürlerin üretiminde kullanılan kriyojenik koruyucu hammaddelerin L^* , a^* ve b^* renk değerleri sunulmuştur. Bu çizelgeden de görüleceği gibi P veya DP örnekleri en yüksek L^* değerine sahiptir ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da DP'nin daha açık olduğu görülmektedir. Çizelge 4.15'te kazeinlerin en fazla koyuluk gösteren materyaller olduğu görülmektedir. Ancak dondurarak kurutma işleminden sonra tüm örneklerin L^* değerlerinde önemli bir azalma olmuştur. Bu koyulaşmanın çok düşük oranda ilave edilen ve süt tozu gibi beyazımsı olan *L. plantarum* biyokütlesinden ziyade, kurutma esnasında gerçekleşen bir takım reaksiyonlardan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.15. Kültürlerin üretiminde kullanılan kriyojenik koruyucu hammaddelere ait L^* , a^* ve b^* renk değerleri†

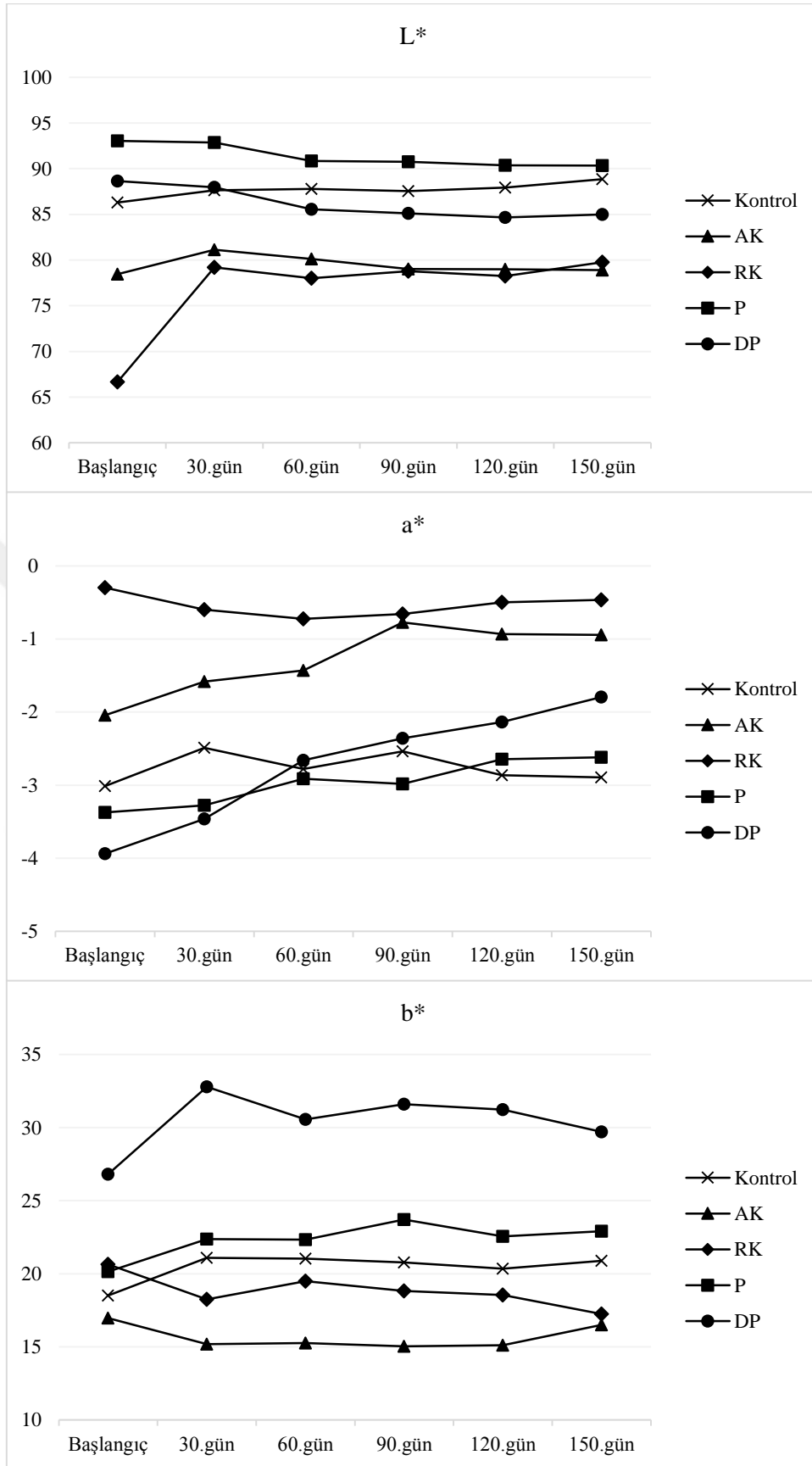
Hammadde	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
Süt Tozu	96.25±0.04 ^b	-3.86±0.04 ^a	12.84±0.11 ^c	62.57±0.05 ^b
Asit Kazein	88.72±0.31 ^a	-1.55±0.08 ^c	11.26±0.32 ^a	54.86±0.31 ^a
Rennet Kazein	88.65±0.10 ^a	-0.85±0.07 ^d	11.53±0.10 ^{ab}	54.71±0.11 ^a
PAST	96.88±0.06 ^c	-3.60±0.05 ^b	12.06±0.15 ^b	63.50±0.56 ^c
DPAST	97.22±0.10 ^c	-3.85±0.15 ^a	14.13±0.30 ^d	63.54±0.12 ^c

†a-d: Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). L^* : Parlaklık renk değeri, a^* : Kırmızı-yeşil renk değeri, b^* : Sarı-mavi renk değeri, ΔE^* : Toplam renk değişimi.

Çizelge 4.16. Farklı kriyojenik koruyucu maddelerle liyofilize edilen *L. plantarum* kültürlerinin işlemiden hemen sonra ve depolama süresince L^* , a^* ve b^* renk değerleri[†]

		Kontrol	AK	RK	P	DP
Başlangıç	L^*	86.29±0.16 ^{aC}	78.46±0.67 ^{aB}	66.66±2.33 ^{aA}	93.05±0.15 ^{bD}	88.64±0.70 ^{cCD}
	a^*	-3.01±0.04 ^{aC}	-2.04±0.06 ^{aD}	-0.30±0.08 ^{aE}	-3.37±0.12 ^{aB}	-3.94±0.24 ^{aA}
	b^*	18.50±0.23 ^{aAB}	16.97±0.51 ^{bA}	20.75±0.99 ^{cC}	20.14±0.55 ^{aBC}	26.82±0.88 ^{aD}
30. gün	L^*	87.64±0.03 ^{bc}	81.14±0.92 ^a	79.21±0.69 ^b	92.86±0.74 ^b	87.96±1.10 ^{bc}
	a^*	-2.49±0.04 ^b	-1.58±0.04 ^{ab}	-0.60±0.15 ^a	-3.28±0.11 ^{ab}	-3.46±0.21 ^{ab}
	b^*	21.09±0.05 ^b	15.18±0.41 ^a	18.25±0.55 ^{ab}	22.37±0.39 ^b	32.79±1.03 ^b
60. gün	L^*	87.79±0.09 ^{bc}	80.12±0.19 ^a	78.02±1.10 ^b	90.85±0.30 ^a	85.55±0.20 ^{ab}
	a^*	-2.78±0.17 ^{ab}	-1.43±0.14 ^{abc}	-0.72±0.04 ^a	-2.91±0.13 ^{cd}	-2.66±0.06 ^{bc}
	b^*	21.04±0.54 ^b	15.25±0.21 ^a	19.49±0.69 ^{bc}	22.33±0.00 ^b	30.55±0.40 ^b
90. gün	L^*	87.54±0.07 ^b	79.01±1.19 ^a	78.77±1.28 ^b	90.76±0.02 ^a	85.12±0.37 ^a
	a^*	-2.55±0.02 ^b	-0.77±0.37 ^c	-0.66±0.19 ^a	-2.98±0.01 ^{bc}	-2.36±0.38 ^{cd}
	b^*	20.76±0.01 ^b	15.04±0.70 ^a	18.81±0.14 ^{abc}	23.70±0.43 ^b	31.59±0.35 ^b
120. gün	L^*	87.94±0.08 ^c	78.98±0.33 ^a	78.25±1.55 ^b	90.38±0.25 ^a	84.66±0.37 ^a
	a^*	-2.86±0.10 ^{ab}	-0.93±0.02 ^{bc}	-0.50±0.26 ^a	-2.64±0.02 ^d	-2.14±0.012 ^{cd}
	b^*	20.35±0.40 ^b	15.11±0.16 ^a	18.55±0.23 ^{abc}	22.56±0.62 ^b	31.22±1.08 ^b
150. gün	L^*	88.86±0.08 ^d	78.91±0.12 ^a	79.77±1.70 ^b	90.35±0.05 ^a	85.01±0.50 ^a
	a^*	-2.89±0.15 ^{ab}	-0.94±0.12 ^{bc}	-0.47±0.14 ^a	-2.62±0.01 ^d	-1.80±0.08 ^d
	b^*	20.88±0.51 ^b	16.51±0.39 ^{ab}	17.24±0.89 ^a	22.91±0.02 ^b	29.71±0.88 ^{ab}

[†]Ortalama ± standart sapma. a-d: Aynı sütunda ve her bir L^* , a^* ve b^* değerleri için ayrı ayrı gösterilen farklı harfler, veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). A-D: Aynı satırdaki farklı harfler depolama etkisi olmadan taze kültürler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). L^* : Parlaklık renk değeri, a^* : Kırmızı-yeşil renk değeri, b^* : Sarı-mavi renk değeri. AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.



Şekil 4.20. Farklı kriyojenik koruyucu maddelerle liyofilize edilen *L. plantarum* kültürlerinin işlemden hemen sonra ve depolama süresince L^* , a^* ve b^* renk değerleri

Kontrol örneğinin a^* değerinin, kazein ve peynir altı suyu tozu içeren örneklerin arasında bir değere sahip olduğu görülmektedir. Kültürlere ilave edilen kazeinler, özellikle de rennet kazeinin a^* değerini yükselttiği, peynir altı suyu tozunun, özellikle de DPAST'ın a^* değerini düşürdüğü belirlenmiştir. Kazein ilavesi kültürlerin kırmızılığını, PAST ve DPAST ilavesi ise yeşilliğini artırmıştır.

Kültürlerin sarılığı üzerinde etkili olan b^* değerlerinin de kültüre göre değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. b^* değeri en düşük olan AK örneği iken, en yüksek olan DP örneği olmuştur. Sarılığı yüksek diğer örnek ise RK örneğidir. Hammadde DPAST'ın, diğer koruyucu maddelere göre yine en yüksek b^* değerine sahip olduğu görülmektedir. PAST'ın demineralize edilerek ve sprey veya dondurarak kurutma işlemlerinin b^* değerinde artışa neden olduğu görülmektedir.

Kontrol ve RK kültürlerinin depolama ile L^* değerlerinde artış görülürken, DP örneğinde ise azalma gözlenmiştir. AK ve P örneklerinin L^* değerinde ise herhangi bir değişim olmamıştır. Depolama boyunca tüm örneklerin a^* değerlerinde artış görülmesine rağmen, RK örneğinin etkilenmediği tespit edilmiştir. Depolama ile kırmızılıktaki en belirgin artışa DP örneğinde rastlanmıştır. Örneklerin b^* değerlerindeki en belirgin değişimlere genellikle depolamanın başında (ilk 30 gün) rastlanmıştır. Kontrol, P ve DP kültürlerinin b^* değerleri yükselmiş, yani sarılıkları artmıştır. Kazein ilave edilen örneklerde ise ilk 30 günün sonunda b^* değerlerinin azaldığı görülmüştür.

Depolama boyunca kültürlerin renk değerlerinde meydana gelen farklılıkların daha iyi anlaşılabilmesi için liyofilizasyondan hemen sonra ölçülen renk parametrelerinin depolama işleminden ne ölçüde etkilendiği hesaplanmış ve Çizelge 4.17 ve Şekil 4.21'de sunulmuştur. Buna göre, kontrol, P ve DP örneklerinin L^* değerlerindeki fark (ΔL^*) özellikle depolama sonuna doğru artarken, kazein ilave edilen kültürlerde ise değişmemiş olduğu görülmüştür. Δa^* değerlerinin kontrol ve RK kültürlerinde değişmediği, AK ve P örneğinde yavaşça arttığı, DP kültüründe ise ilk depolama periyodunda arttığı sonrasında sabit kaldığı tespit edilmiştir. Örneklerin Δb^* değerleri tüm depolama süresinde sabit kalmış, yalnızca RK kültüründe bir takım farklılıklar olmuştur.

Toplam renk değişimini en iyi şekilde ortaya koyan parametre ise ΔE^* değeridir. Bu değer L^* , a^* ve b^* değerlerindeki değişimlerin toplamını baz alarak hesaplanmakta ve rengin farklılaşması konusunda genel bir kanıya ulaşmamızı sağlamaktadır. Martínez-Cervera ve ark. (2011), ΔE^* değerinin 3'ten büyük olması halinde, renk farklılıklarının belirgin olup insan gözü tarafından algılanabilir olduğunu bildirmişlerdir. Buna göre kontrol örneğindeki toplam renk farkı 150 günlük depolama sonunda, P örneği için 60

gün ve sonrası depolamalarda insan gözüyle fark edilir haldedir. AK örneğinin ΔE^* değeri yalnızca 30. günde 3.25 iken, sonraki depolama sürelerinde 3'ün altında olduğu gözlenmiştir. RK ve DP örneklerinin tüm depolama süresinde toplam renk farkının oldukça yüksek olduğu, özellikle en büyük farkın RK örneğinde olduğu açıkça görülmektedir. RK kültürünün toplam renk değişimindeki en büyük etkiyi L^* değerinde, daha az oranda da b^* değerinde meydana gelen değişim yaratmıştır. DP örneğinde ise hem ΔL^* hem de Δb^* farklılıklarının etkisi olmuştur. Özellikle depolama başında b^* değerinde, depolama sonuna doğru L^* değerindeki değişim etkili olmuştur.

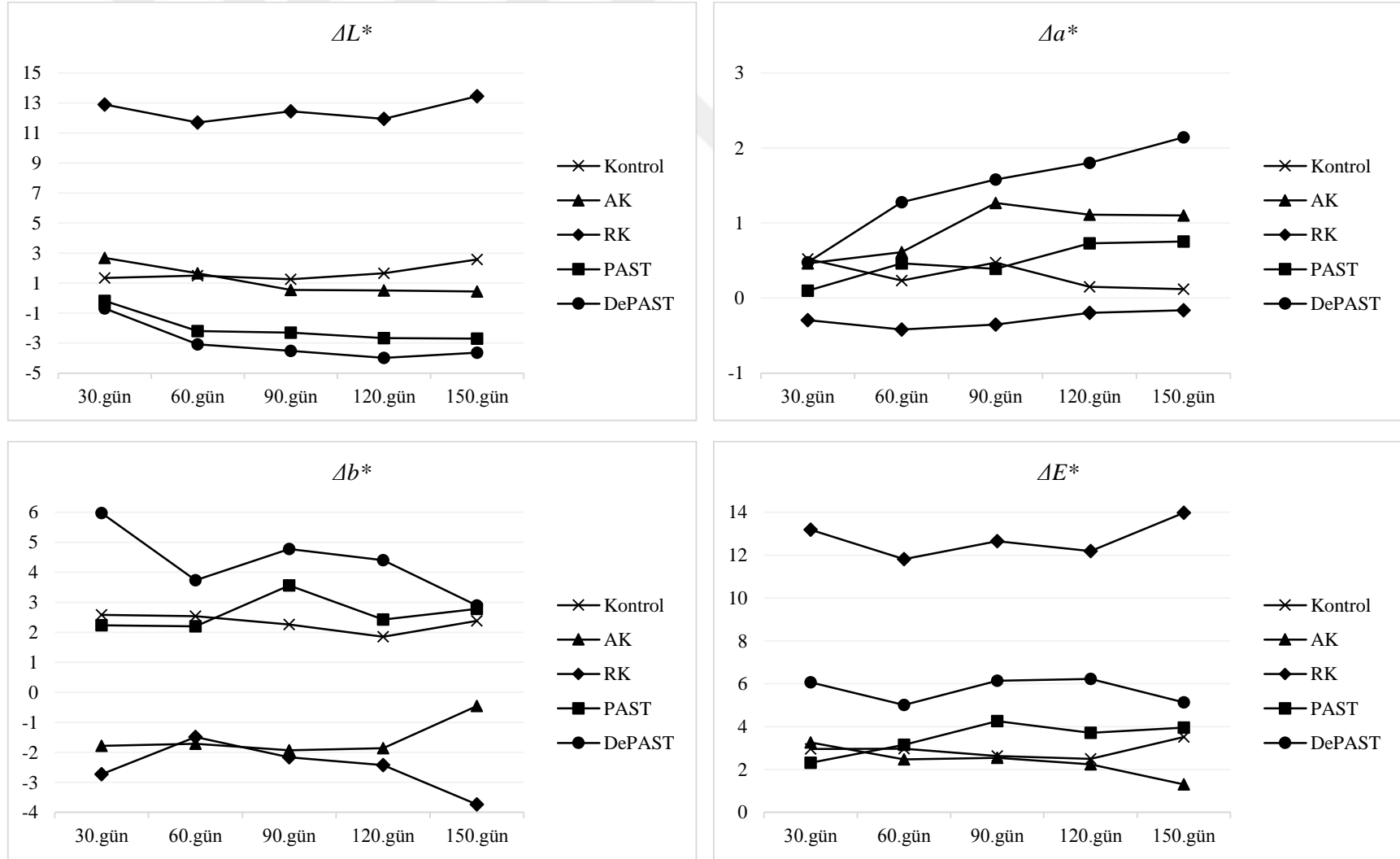
Bazı gıda türleri (fırın ürünleri, kakao ve kahve) için esmerleşme arzu edilirken, sterilize süt ürünlerinde veya kurutulmuş süt ürünlerinde (süt tozu, peynir altı suyu tozu) istenmeyen bir durumdur. Süt ve süt bazlı sistemler, sıcaklık ve depolama ile esmerleşmektedir. Renk oluşumu hem şeker karamelizasyonu hem de Maillard Reaksiyonu (MR) nedeniyle olabilir. Ancak, şeker karamelizasyonunun oluşması için yüksek sıcaklık ve çok düşük veya yüksek pH gereklidir. Süt ve süt ürünlerinde oluşan kahverengi bileşikler esas olarak MR'nun ileri evresi ile ilişkilendirilmektedir (Morales ve van Boekel, 1998). Çeşitli gıda işleme ve depolama değişkenleri Maillard reaksiyonu oranlarını etkilemektedir. Bu değişkenler hammadde bileşimi, üretim yöntemi, işleme ve depolama sırasında kullanılan zaman-sıcaklık kombinasyonları, pH, su aktivitesi (a_w), oksijen ve oksidatif metal iyonlarının varlığı, kükürt dioksit gibi inhibitörlerin varlığı, fiziksel yapı (gözenekli veya mekanik olarak sıkıştırılmış) ve şekerlerin varlığı ile fiziksel durumu (camsı veya kristalin) olarak sıralanabilir (Dattatreya ve Rankin, 2006).

Sütte, enzimatik olmayan esmerleşme, laktozun proteinlerle yoğunlaşmasıyla başlamakta ve sonucunda proteine bağlanmış kararlı bir Amadori ürünü olan laktulosilizin oluşmaktadır. Yüksek konsantrasyonda laktoz ve lizince zengin protein içeriği, süt ürünlerini bu reaksiyona karşı çok hassas hale getirmektedir. Laktozilasyonun ortaya çıkması her zaman esmerleşmeye neden olmamaktadır. Bu reaksiyon esas olarak ısı ile indüklenmektedir. Bununla birlikte, süt tozunun depolanması sırasında da laktozilasyonun meydana geldiğini görülmüştür. Maillard reaksiyonunun hızı, sıcaklık, su aktivitesi, pH, reaktan kaynağı ve konsantrasyonu ile indirgen şekerin tipi ve oranı gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Özellikle, ilerleyen reaksiyonların hızı ve depolama stabilitesi, gıdaların su aktivitesi ile ilgili olmaktadır. Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonunun $0.5-0.75 a_w$ aralığında maksimum olduğu bildirilmiştir (Pereyra Gonzales ve ark., 2010).

Çizelge 4.17. Farklı kriyojenik koruyucu maddelerle liyofilize edilen *L. plantarum* kültürlerinin depolama boyunca renk değerlerindeki değişimler[†]

		Kontrol	AK	RK	P	DP
30. gün	ΔL^*	1.35±0.03 ^{ab}	2.68±0.86 ^a	12.90±0.69 ^a	-0.19±0.74 ^b	-0.68±1.10 ^b
	Δa^*	0.52±0.04 ^a	-0.46±0.00 ^a	-0.30±0.12 ^a	0.10±0.12 ^a	0.48±0.28 ^a
	Δb^*	2.58±0.05 ^a	-1.78±0.26 ^a	-2.73±0.19 ^{ab}	2.23±0.42 ^a	5.97±1.35 ^a
	ΔE^*	2.96±0.05 ^a	3.25±0.85 ^b	13.19±0.71 ^a	2.31±0.34 ^a	6.07±1.47 ^a
60. gün	ΔL^*	1.50±0.09 ^{ab}	1.66±0.19 ^a	11.71±1.10 ^a	-2.20±0.30 ^a	-3.08±0.20 ^a
	Δa^*	0.24±0.17 ^a	0.61±0.14 ^{ab}	-0.42±0.04 ^a	0.46±0.13 ^{bc}	1.28±0.06 ^{ab}
	Δb^*	2.53±0.54 ^a	-1.71±0.21 ^a	-1.49±0.69 ^b	2.19±0.00 ^a	3.74±0.40 ^a
	ΔE^*	2.97±0.40 ^a	2.47±0.24 ^{ab}	11.81±1.18 ^a	3.14±0.23 ^{ab}	5.01±0.44 ^a
90. gün	ΔL^*	1.25±0.07 ^a	0.55±1.19 ^a	12.46±1.28 ^a	-2.29±0.02 ^a	-3.52±0.37 ^a
	Δa^*	0.47±0.02 ^a	1.27±0.37 ^b	-0.35±0.19 ^a	0.39±0.01 ^{ab}	1.58±0.38 ^b
	Δb^*	2.26±0.01 ^a	-1.93±0.70 ^a	-2.17±0.14 ^{ab}	3.56±0.43 ^a	4.77±0.35 ^a
	ΔE^*	2.63±0.02 ^a	2.54±0.60 ^{ab}	12.65±1.29 ^a	4.26±0.37 ^b	6.14±0.5 ^{8a}
120. gün	ΔL^*	1.65±0.08 ^b	0.51±0.33 ^a	11.94±1.55 ^a	-2.67±0.25 ^a	-3.98±0.37 ^a
	Δa^*	0.15±0.10 ^a	1.11±0.02 ^{ab}	-0.20±0.26 ^a	0.73±0.02 ^c	1.80±0.12 ^b
	Δb^*	1.85±0.40 ^a	-1.86±0.16 ^a	-2.43±0.23 ^{ab}	2.43±0.62 ^a	4.40±1.08 ^a
	ΔE^*	2.49±0.36 ^a	2.24±0.05 ^{ab}	12.19±1.57 ^a	3.71±0.23 ^{bc}	6.22±0.97 ^a
150. gün	ΔL^*	2.57±0.08 ^c	0.45±0.12 ^a	13.46±1.70 ^a	-2.70±0.05 ^a	-3.63±0.50 ^a
	Δa^*	0.12±0.15 ^a	1.10±0.12 ^{ab}	-0.16±0.14 ^a	0.76±0.01 ^c	2.14±0.08 ^b
	Δb^*	2.38±0.51 ^a	-0.46±0.39 ^a	-3.74±0.89 ^a	2.78±0.02 ^a	2.89±0.88 ^a
	ΔE^*	3.51±0.40 ^a	1.31±0.08 ^a	13.97±1.88 ^a	3.95±0.02 ^{bc}	5.13±0.89 ^a

[†]Ortalama ± standart sapma. a-c: Aynı sütunda ve her bir ΔL^* , Δa^* , Δb^* ve ΔE^* değerleri için ayrı ayrı gösterilen farklı harfler, veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p < 0.05). ΔL^* : Parlaklık renk değerindeki değişim, Δa^* : Kırmızı-yeşil renk değerindeki değişim, Δb^* : Sarı-mavi renk değerindeki değişim, ΔE^* : Toplam renk değişimi. AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.



Şekil 4.21. Liyofilize *L. plantarum* kültürlerinin depolama boyunca ΔL^* , Δa^* , Δb^* ve ΔE^* değerlerindeki değişimlere ait grafikler

Kazein yüksek lizin içeriğine sahiptir (Southward, 2003b; Chandan, 2006), öyle ki esansiyel bir amino asit olan lizin 1989 yılında ilk kez kazeinden izole edilmiştir (Anonim, 2020c). Kazein ilavesinin özellikle de rennet kazein ilavesinin liyofilize kültürlerdeki L^* değerini oldukça fazla düşürmesinin nedeni kurutma esnasında gerçekleşmiş olabilecek Maillard reaksiyonu olabilir. Protein içeriğinin özellikle de lizin içeriğinin armasıyla bu reaksiyonu hızlandırmış olabileceğini düşündürmektedir. Yüksek nem içeriğine ve su aktivitesine sahip olan kontrol, AK ve RK kültürlerinde koyulaşmanın daha fazla görülmesi, örneklerin su içeriğinin renk değerleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. En düşük nem içeriğine sahip olan P örneğinde L^* değerinin diğer örneklere göre yüksek olması da, bu düşüncüyü desteklemektedir.

Peynir altı suyu şeffaf ve yeşil-sarı renktedir (González-Martínez ve ark., 2002). Peynir altı suyu tozu ise, hafif sarımsı bir renk tonuna sahip, ancak depolama sırasında kahverengi bir renge dönüşebilen toz bir üründür. Enzimatik olmayan esmerleşmeden (EOE) sorumlu Maillard reaksiyonunun, PAST'ların depolanması sırasında önemli bir bozulma mekanizması olduğu iyi bilinmektedir (Dattatreya ve Rankin, 2006). Bu çalışmadaki PAST ve DPAST ilaveli kültürlerin nispeten daha düşük a^* değerine sahip olmasının nedeni, peynir altı suyunun yeşilimsi tonundan kaynaklanıyor olabilir. Aynı zamanda depolama ile artan b^* değerleri de yine MR ile ilgili olabilir.

Yapılan bir çalışmada, dondurarak kurutulmuş yoğurt örneğinde, işlem sonrasındaki L^* değerinin belirgin bir şekilde arttığı ve a^* değerinin belirgin bir şekilde azaldığı, b^* değerinin ise değişmediği bulunmuştur. Dondurarak kurutma işleminin hem düşük sıcaklıkta gerçekleşmesinin, hem de buzun süblimleşerek suyun uzaklaşmasının, enzimatik esmerleşme reaksiyonlarını önlediğini ileri sürmüşlerdir (Valentina ve ark., 2016). Bahsedilen çalışmada elde edilen yoğurt tozlarının nem içeriğinin %1'in altında olmasının da MR'nu engellemiş olabileceği düşünülmektedir.

4.6.6. Liyofilize kültürlerin partikül büyüklük ve boyut dağılımları

Parçacık özelliklerindeki ve saklama koşullarındaki değişiklikler toz ürünlerin akışkanlığını etkilemekte, hatta bazen küçük değişikliklerin bile önemli etkileri olabilmektedir (Fitzpatrick ve ark., 2004). Bu nedenle toz ürünlerin parçacık büyüklük ve boyut dağılımlarını belirlemek, ürünün stabilitesinin değerlendirilebilmesi bakımından önemlidir. Farklı koruyucularla birlikte liyofilize edilen *L. plantarum* kültürlerinin

başlangıç partikül büyüklük ve boyut dağılımları Çizelge 4.18 ve Şekil 4.22’de sunulmuştur.

Parçacık boyutu ölçümünde, $D_{3,2}$ değeri yüzey alanı ortalama çapını, $D_{4,3}$ değeri hacim ortalama çapını ifade etmektedir. Yüzey alanı ortalaması (Sauter Ortalama Çapı), spesifik yüzey alanının önemli olduğu biyoyararlanım, reaktivite, çözünme gibi durumların anlaşılmasında en uygundur ve boyut dağılımında ince parçacıkların varlığına en duyarlı ölçümdür. Hacim moment ortalaması; $D_{4,3}$ (De Brouckere Ortalama Çapı) ise, numune hacminin kütlesini oluşturan parçacıkların boyutunu yansıttığı için birçok numune için önemli olmaktadır. Ayrıca boyut dağılımında, büyük partiküllerin varlığına en duyarlı ölçümdür. Parçacık boyut dağılımı için kullanılan en yaygın yüzdellikler, frekans ve kümülatif grafiklerde gösterildiği gibi D_{10} , D_{50} ve D_{90} 'dır. D_{10} , parçacıkların %10'unun D_{90} ise parçacıkların %90'ının boyutunun bu değer altında olmasını ifade etmektedir. Hacme dayalı medyan (D_{50}) değeri, popülasyonun %50'sinin bu noktanın üstünde ve %50'sinin ise bu noktanın altında olduğu değer olarak tanımlanmaktadır. Bu üç parametreyi izleyerek, ana parçacık boyutundaki önemli değişikliklerin yanı sıra, dağılımın uç kısımlarında, ince veya büyük boyutlu parçacıkların/aglomeratların meydana gelmesinden kaynaklanabilecek değişikliklerin olup olmadığını da görmek mümkün olmaktadır (Anonim, 2015).

Dondurarak kurutulmuş malzemelerin fiziksel görünümü gözenekli pandispanyaya benzemektedir ve malzemeyi toz haline getirmek için bir mikronizasyon işlemi gerekmektedir. Dolayısıyla kültürlerin parçacık boyutu büyük ölçüde dondurarak kurutma sonrası numunenin mikronizasyonuna ve elle öğütülmesine bağlı olduğu bildirilmektedir (Ying ve ark., 2010). Bu çalışmada kullanılan koruyucu maddelerin parçacık büyüklüğüne ve boyut dağılımına etkisi olduğu görülmektedir. Liyofilizasyon işleminden sonra aynı öğütme ortamında aynı miktarlarda ve aynı süre ile boyutları küçültülen toz kültürlerin partikül büyüklüklerinde görülen bu farklılıkların kültürlerin bileşimlerinden ve nem içeriklerinden kaynaklanması muhtemeldir. Detaylı incelendiğinde PAST eklenen kültürlerin ve kazein eklenen kültürlerin kendi aralarında parçacık boyutları birbirine benzerlik göstermektedir. P ve DP kültürlerinin büyüklük ve boyut dağılımları arasında fark gözlenmezken ($p>0.05$) diğer kültürlerin birbirinden farklı boyut ve dağılımda olduğu görülmektedir ($p<0.05$). En büyük parçacık boyutu ve en düşük üniformluk kazein ilave edilen örneklerde (AK ve RK), en küçük parçacık boyutu ve en yüksek üniformluk ise PAST ilave edilen (P ve DP) kültürlerde ölçülmüştür. Örneklerin nem içeriğiyle partikül boyutlarının da paralellik gösterdiği söylenebilir. En

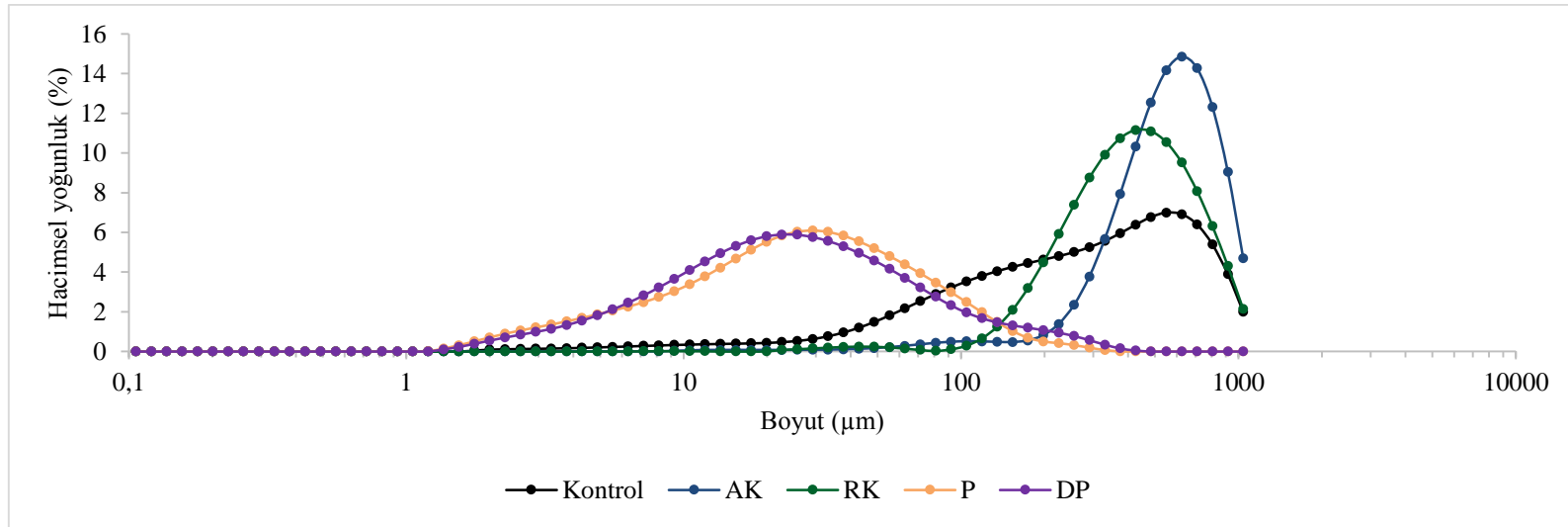
yüksek nem içeriğine sahip olan AK kültürünün, yine en yüksek parçacık boyutuna sahip olduğu görülmektedir. Bunu sırasıyla RK, kontrol ve peynir altı suyu tozu ilaveli kültürler takip etmektedir. Fitzpatrick ve ark. (2004), tozların sahip olduğu nem içeriğinin genellikle tozun akışkanlığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu, artan nem içeriğiyle birlikte toz partikülleri arasında oluşan sıvı köprülerin ve kılcal kuvvetlerin artması nedeniyle akışkanlığın azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Böylece bu durum tozlarda kekleşme problemlerine de yol açmaktadır. Bu nedenle toz ürünlerin nem miktarı arttıkça bir arada durma eğilimleri arttığından, bu çalışmada elde edilen kültürlerin partikül boyutu ölçümlerinde yüksek sonuçlar elde edildiği düşünülmüştür. Ayrıca kılcallardaki su miktarının artması, öğütücünün uyguladığı basıncın azalmasına ve dolayısıyla daha küçük parçalara ayıramamasına neden olmuş olabilir. Kuru ürünlerin daha etkili olarak öğütülmesi ise bıçaklar tarafından uygulanan mekanik stresin ürün tarafından absorbe edilememesinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Nem içeriğinin yanı sıra oluşan güçlü kazein yapılarının eşit sürelerde uygulanan öğütme işlemiyle yeterince parçalanamamış olması da kazein ilaveli örneklerin daha büyük parçacık boyutuna sahip olmasının bir diğer nedeni olabilir. Ayrıca, örneklerin parçacık boyutunun artmasıyla üniformluğun da azaldığı görülmektedir. Bu da etkin bir öğütme işleminin gerçekleşmediğinin bir göstergesidir.

Partikül büyüklüğü toz ürünlerin akışkanlığı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Bir tozun parçacık büyüklüğü yaklaşık 200 µm civarındadır ve bu boyutun altına düştükçe akışkanlık kötüleştiği bildirilmiştir. Daha küçük parçacık boyutunda akışkanlıktaki bu azalmanın nedeni, birim toz kütlesi başına artan yüzey alanıdır. Özellikle kohezif kuvvetler ve akışa direnen sürtünme kuvvetleri için daha fazla yüzey alanı oluşması akışkanlığı azaltmaktadır (Fitzpatrick ve ark., 2004). Bu noktada yüzey alanı ortalama çapı olan $D_{3,2}$ dikkate alınır, en uygun parçacık boyutuna kontrol örneğinin sahip olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.18. Farklı koruyucularla birlikte liyofilize edilen *L. plantarum* kültürlerinin partikül büyüklük ve boyut dağılımları[†]

	D _{3,2}	D _{4,3}	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Üniformluk
Kontrol	82.4±8.8 ^b	343.1±9.6 ^b	54.9±6.5 ^b	276.5±16.1 ^b	742.6±8.3 ^b	0.783±0.043 ^c
AK	355.3±6.1 ^d	565.7±5.7 ^d	284.3±5.1 ^d	557.2±7.5 ^d	877.3±5.7 ^d	0.331±0.004 ^a
RK	316.3±16.2 ^c	451.8±7.7 ^c	200.7±4.8 ^c	415.3±8.9 ^c	768.5±10.0 ^c	0.421±0.007 ^b
P	13.4±0.4 ^a	38.6±3.6 ^a	5.4±0.5 ^a	26.1±1.1 ^a	87.4±3.8 ^a	0.990±0.087 ^d
DP	13.8±0.5 ^a	41.7±1.3 ^a	6.0±0.1 ^a	24.1±1.2 ^a	96.1±4.5 ^a	1.227±0.023 ^e

[†]Ortalama ± standart sapma. a-d: Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.



Şekil 4.22. Farklı koruyucularla birlikte liyofilize edilen *L. plantarum* kültürlerinin partikül boyut dağılımı eğrileri

Kontrol örneğinin depolama boyunca partikül büyüklük ve dağılımları incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.19'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre depolama ile $D_{3,2}$ değerinin belirgin bir biçimde arttığı görülmektedir. $D_{4,3}$ sonuçlarındaki değişimler ise $D_{3,2}$ kadar düzenli ve belirgin olmamıştır. Depolama süresince kontrol örneğinin partikül boyut dağılımındaki değişimler Şekil 4.23'deki grafikte görülmektedir. Buna göre, başlangıçtaki D_{90} değeri ilk depolama periyodunda azalmış ancak kalan depolama süresince de istatistiksel olarak değişmemiştir ($p>0.05$). D_{10} değerinin ise depolamanın 30 ve 120. günlerinde belirgin olarak arttığı görülmektedir ($p<0.05$). D_{50} değeri, parçacık boyutu dağılımlarında en anlamlı ve anlaşılması kolay istatistiklerden biri olarak bilinmektedir. Kontrol numunesinin D_{50} sonuçlarının depolamanın başında bir miktar arttığı, ancak 90. günden sonra değişmediği görülmektedir. Ayrıca depolama ile üniformluğunun azalması da söz konusu olmuştur.

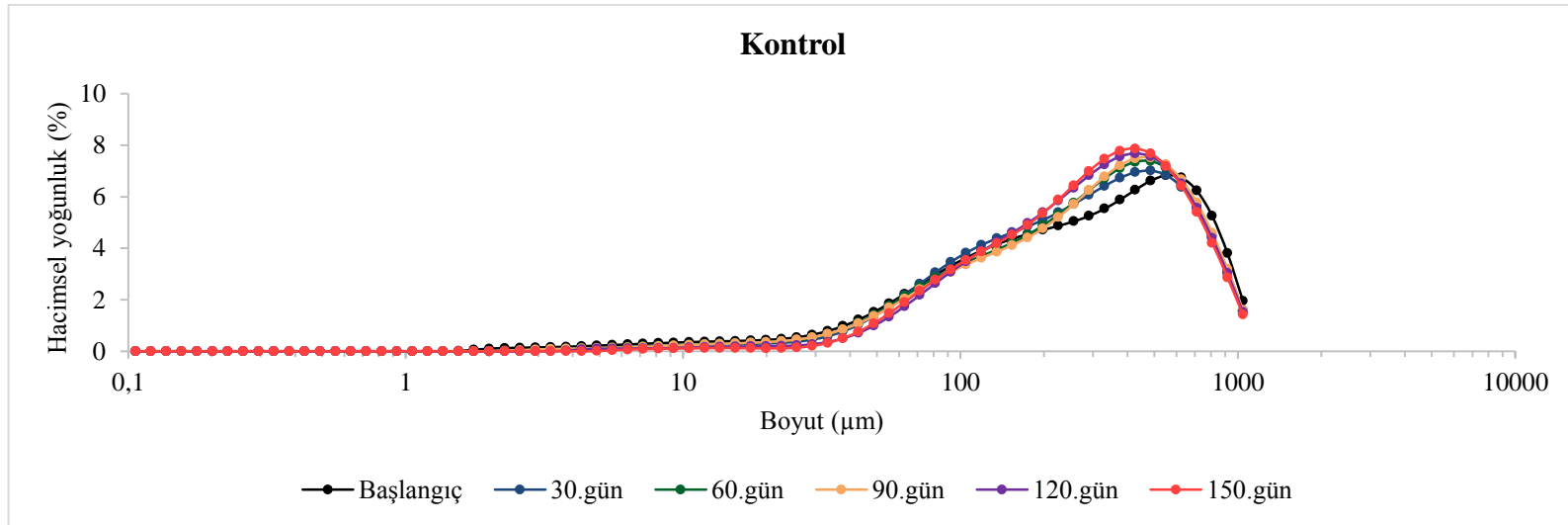
Koruyucu madde olarak asit kazein kullanılan kültürlerle ait partikül boyut ve dağılım sonuçları Çizelge 4.20 ve Şekil 4.24'te verilmiştir. Buna göre AK kültürünün, 90. ve 150. günlerde $D_{3,2}$ değerlerinin belirgin şekilde azaldığı, $D_{4,3}$ değerlerinin ise depolama başlangıcında artıp, sonrasında sabit kaldığı gözlenmiştir. Bu durum, depolama esnasında taneciklerin morfolojik olarak değişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Hacme bağlı parçacık dağılımlarında D_{50} ve D_{90} sonuçlarının depolamanın başında arttığı ve depolama süresince de sabit kaldığı görülmüştür. D_{10} ve üniformluk ise depolama süresince değişkenlik göstermiştir.

RK örneğinin depolama boyunca partikül boyut ve dağılımlarındaki değişimler Çizelge 4.21 ve Şekil 4.25'te sunulmuştur. 120 günlük depolama süresince partikül büyüklüğünün arttığı, hem $D_{3,2}$ hem de $D_{4,3}$ sonuçlarından anlaşılmaktadır. Ancak 150. günde partikül boyutunun yeniden azaldığı tespit edilmiştir. Boyut dağılımlarındaki değişim, D_{50} ve D_{90} sonuçlarında benzerlik göstermiş ve 30. ve 60. günlerdeki belirgin bir artıştan sonra depolama sonuna kadar değişmemiştir. D_{10} değerinin ise depolama başlangıcında oldukça yükseldiği sonrasında kısmen azaldığı gözlenmiştir. Tozların üniformluğu başlangıçta daha yüksekken depolama ile azalmıştır.

Çizelge 4.19. Depolama süresince kontrol liyofilize *L. plantarum* kültürüne ait partikül büyüklük ve boyut dağılımları[†]

	D _{3,2}	D _{4,3}	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Üniformluk
Başlangıç	82.4±8.8 ^a	343.1±9.6 ^{ab}	54.9±6.5 ^a	276.5±16.1 ^a	742.6±8.3 ^b	0.783±0.053 ^d
30.gün	125.4±4.6 ^c	339.1±9.9 ^a	69.0±1.6 ^b	281.3±10.3 ^{ab}	710.3±20.8 ^a	0.712±0.016 ^c
60.gün	116.6±5.6 ^b	343.4±9.1 ^{ab}	66.0±2.4 ^b	292.8±10.9 ^{bc}	709.5±18.9 ^a	0.686±0.021 ^b
90.gün	116.0±6.7 ^b	347.1±8.5 ^{ab}	66.1±2.7 ^b	299.4±11.0 ^c	714.0±15.6 ^a	0.674±0.011 ^b
120.gün	150.1±3.6 ^d	350.5±3.7 ^b	82.8±1.5 ^c	300.7±4.6 ^c	705.7±8.2 ^a	0.641±0.008 ^a
150.gün	168.0±4.5 ^e	348.8±5.1 ^{ab}	83.9±2.4 ^c	301.1±5.8 ^c	696.3±11.5 ^a	0.629±0.012 ^a

[†] Ortalama ± standart sapma. a-d: Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.

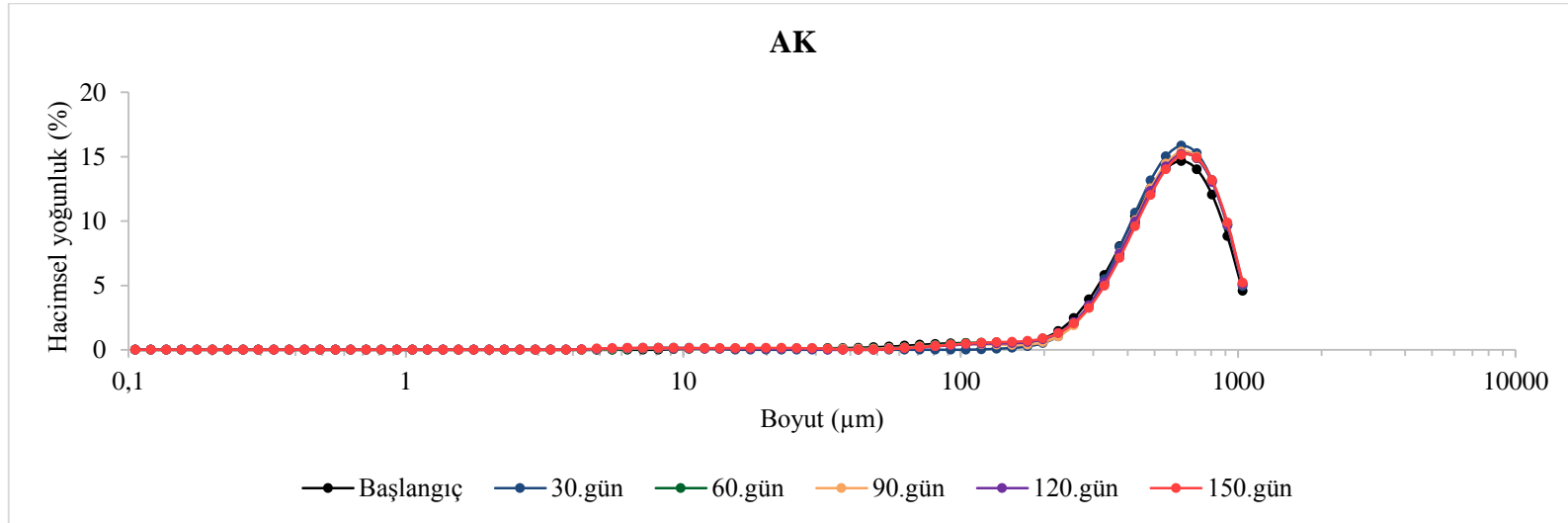


Şekil 4.23. Depolama süresince kontrol liyofilize *L. plantarum* kültürüne ait partikül büyüklük ve boyut dağılımı eğrileri

Çizelge 4.20. Depolama süresince AK kültürüne ait partikül büyüklük ve boyut dağılımları[†]

	D _{3,2}	D _{4,3}	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Üniformluk
Başlangıç	355.3±6.1 ^c	565.7±5.7 ^a	284.3±5.1 ^a	557.2±7.5 ^a	877.3±5.7 ^a	0.331±0.004 ^d
30.gün	356.2±11.0 ^c	596.7±4.3 ^b	338.3±6.5 ^d	582.8±4.8 ^b	890.3±2.9 ^b	0.294±0.004 ^a
60.gün	356.3±8.5 ^c	583.2±5.8 ^b	300.3±6.6 ^{bc}	577.6±6.8 ^b	892.9±4.8 ^b	0.320±0.004 ^{bc}
90.gün	325.5±15.7 ^b	586.7±7.1 ^{bc}	313.9±8.0 ^c	579.6±8.9 ^b	892.7±5.2 ^b	0.313±0.006 ^b
120.gün	313.9±12.1 ^b	584.9±8.9 ^b	305.4±15.7 ^{bc}	577.7±9.5 ^b	892.7±6.5 ^b	0.316±0.010 ^{bc}
150.gün	270.7±11.6 ^a	583.2±5.0 ^b	293.8±11.2 ^{ab}	580.0±5.3 ^b	896.0±3.0 ^b	0.323±0.006 ^{cd}

[†] Ortalama ± standart sapma. a-d: Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.

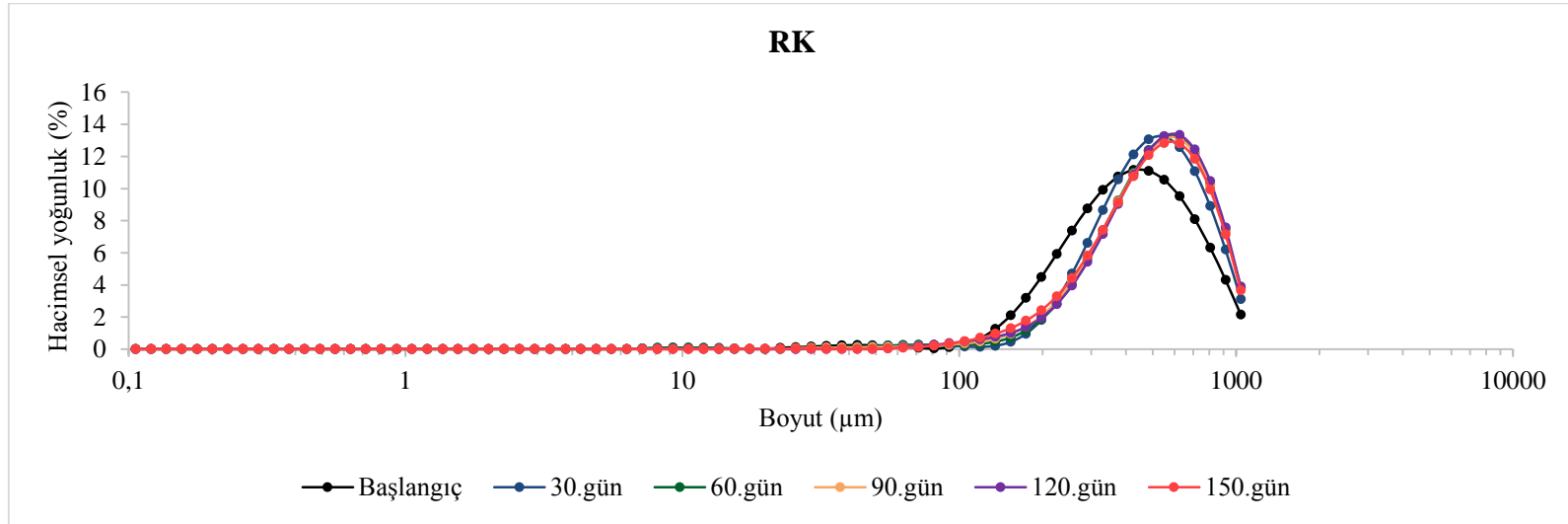


Şekil 4.24. Depolama süresince AK kültürüne ait partikül büyüklük ve boyut dağılımı eğrileri

Çizelge 4.21. Depolama süresince RK kültürüne ait partikül büyüklük ve boyut dağılımları[†]

	D _{3,2}	D _{4,3}	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Üniformluk
Başlangıç	316.3±16.2 ^a	451.8±7.7 ^a	200.7±4.8 ^a	415.3±8.9 ^a	768.5±10.0 ^a	0.421±0.007 ^c
30.gün	348.7±12.3 ^b	518.2±7.9 ^b	262.2±7.3 ^c	493.2±9.5 ^b	827.0±7.5 ^b	0.354±0.006 ^a
60.gün	352.1±14.9 ^b	535.4±5.7 ^{cd}	256.9±6.0 ^c	517.8±7.2 ^c	851.5±4.8 ^c	0.357±0.005 ^{ab}
90.gün	401.7±4.8 ^c	534.0±7.5 ^{cd}	253.2±5.4 ^{bc}	515.8±9.5 ^c	850.7±6.0 ^c	0.358±0.006 ^{ab}
120.gün	424.1±10.0 ^d	540.1±9.2 ^d	258.7±12.6 ^c	522.4±10.7 ^c	854.8±5.3 ^c	0.352±0.011 ^a
150.gün	405.0±8.7 ^{cd}	527.4±7.2 ^{bc}	241.7±6.8 ^b	508.3±9.2 ^c	847.1±4.5 ^c	0.366±0.007 ^b

[†]Ortalama ± standart sapma. a-d: Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). AK: Asit kazein ilave edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave edilen kültür, P: PAST ilave edilen kültür, DP: DPAST ilave edilen kültür.



Şekil 4.25. Depolama süresince RK kültürüne ait partikül büyüklük ve boyut dağılımı eğrileri

PAST ilave edilen kültürün depolama boyunca partikül boyut ve dağılımlarındaki değişimler Çizelge 4.22 ve Şekil 4.26'te görülmektedir. P örneğinin 120 gün boyunca $D_{3,2}$ ve $D_{4,3}$ partikül büyüklük değerlerinin giderek arttığı ve benzer şekilde D_{10} , D_{50} ve D_{90} boyut dağılımlarında bir artış olduğu görülmüştür. Hatta uniformluğun da kısmen düzelmesi söz konusu olmuştur. Ancak RK kültüründe de olduğu gibi, 150. günde partikül boyutunda belirgin bir azalma olduğu fark edilmiştir ($p < 0.05$).

DP kültürünün partikül büyüklük ve boyut dağılımı depolama süresince artış göstermiştir. Buna ait sonuçlar Çizelge 4.23 ve Şekil 4.27'da sunulmuştur. DP örneğine ait tüm partikül boyut sonuçlarının depolama ile arttığı görülmektedir. İlginç olarak, 30 günlük depolama ile oldukça artan toz uniformluğu, 120. gün ve sonrasında çok ciddi bir azalma göstererek eski formuna geri dönmüştür.

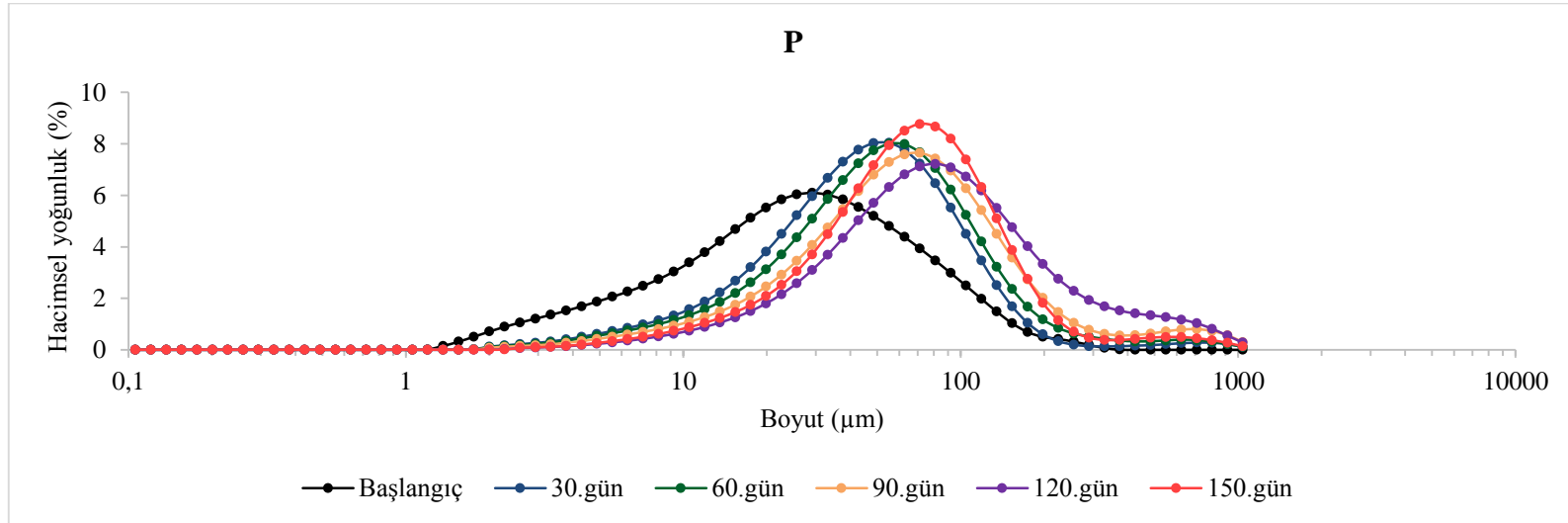
Genel olarak bu çalışmada toz kültürlerin depolama ile partikül boyutlarının arttığı tespit edilmiştir. Kailasapathy (2002), mikrokapsülleme için kullanılan ekipmanların, büyük miktarlarda üniform boyutlu mikro veya nano kapsül üretilmediği, endüstriyel uygulamalar için büyük miktarlarda hassas ve homojen mikro veya nano kapsüller üretebilecek ekipmanların tasarlanması ve geliştirilmesi gerektiğini ifade etmiştir.

Dondurarak kurutulmuş ticari *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)'nin, peynir altı suyu proteini ve dirençli nişasta ile stabilize edilmiş emülsiyon bazlı bir formülasyon ile kapsüllenecek hem spreyle hem de dondurarak tekrar kurutulduğu bir çalışmada spreyle kurutma ile dondurarak kurutma işlemine göre daha küçük parçacık boyutuna sahip kültürler elde edilmiştir. Daha küçük toz parçacık boyutu ve dolayısıyla daha büyük yüzey alanı nedeniyle, depolama sırasında spreyle kurutulmuş tozların depolama esnasında daha yüksek oranda su adsorpsiyonuna neden olduğu sonucuna varılmıştır (Ying ve ark., 2010).

Çizelge 4.22. Depolama süresince P kültürüne ait partikül büyüklük ve boyut dağılımları[†]

	D _{3,2}	D _{4,3}	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Üniformluk
Başlangıç	13.4±0.4 ^a	38.6±3.6 ^a	5.4±0.5 ^a	26.1±1.1 ^a	87.4±3.8 ^a	0.990±0.087 ^{ab}
30.gün	27.2±2.3 ^b	63.4±10.6 ^b	13.5±1.0 ^b	45.7±4.8 ^b	112.1±18.3 ^{ab}	0.826±0.127 ^a
60.gün	30.2±1.1 ^b	75.5±7.6 ^b	15.0±0.5 ^b	51.9±2.0 ^b	134.3±7.8 ^{bc}	0.902±0.135 ^{ab}
90.gün	36.7±0.9 ^c	106.8±3.7 ^d	18.2±0.4 ^c	65.2±2.4 ^c	197.8±10.0 ^d	1.096±0.086 ^b
120.gün	47.6±2.7 ^e	130.6±3.4 ^e	23.6±1.3 ^e	80.4±7.2 ^d	292.0±11.4 ^e	1.083±0.132 ^b
150.gün	41.5±1.5 ^d	90.7±5.8 ^c	21.3±0.7 ^d	66.1±3.0 ^c	156.4±11.5 ^c	0.796±0.075 ^a

[†]Ortalama ± standart sapma. a-e: Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.

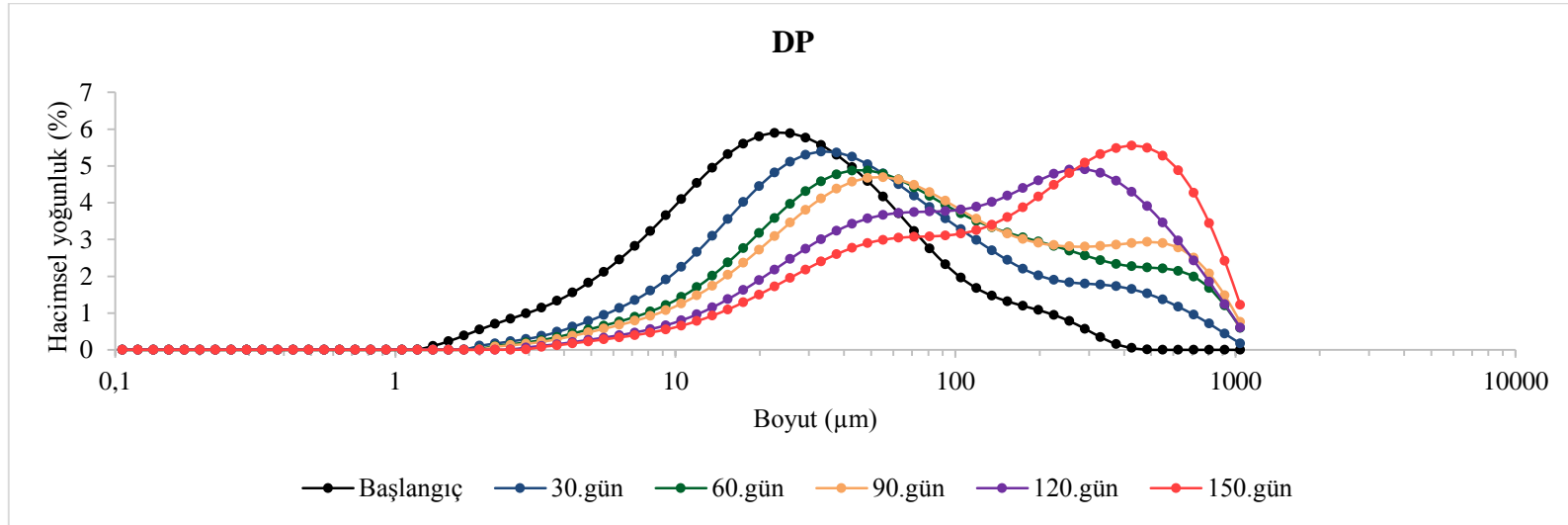


Şekil 4.26. Depolama süresince P kültürüne ait partikül büyüklük ve boyut dağılımı eğrileri

Çizelge 4.23. Depolama süresince DP kültürüne ait partikül büyüklük ve boyut dağılımları[†]

	D _{3,2}	D _{4,3}	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Üniformluk
Başlangıç	13.8±0.5 ^a	41.7±1.3 ^a	6.0±0.1 ^a	24.1±1.2 ^a	96.1±4.5 ^a	1.227±0.023 ^a
30.gün	25.3±0.8 ^b	106.5±3.5 ^b	11.1±0.2 ^b	44.2±0.2 ^{ab}	299.5±7.8 ^b	1.909±0.086 ^b
60.gün	34.1±3.6 ^c	155.4±16.4 ^c	14.7±1.2 ^c	68.6±14.0 ^b	455.9±33.6 ^c	1.839±0.219 ^b
90.gün	37.8±2.0 ^c	178.8±13.5 ^{cd}	16.2±0.6 ^c	78.8±10.2 ^b	526.5±31.2 ^{cd}	1.828±0.142 ^b
120.gün	50.9±4.0 ^d	193.4±15.8 ^d	21.5±1.6 ^d	116.8±19.3 ^c	487.3±27.4 ^d	1.132±0.149 ^a
150.gün	65.5±3.5 ^e	274.3±13.7 ^e	26.6±1.4 ^e	197.7±19.0 ^d	654.8±24.4 ^e	1.002±0.086 ^a

[†]Ortalama ± standart sapma. a-e: Aynı satırdaki farklı harfler veriler arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.



Şekil 4.27. Depolama süresince DP kültürüne ait partikül büyüklük ve boyut dağılımı eğrileri

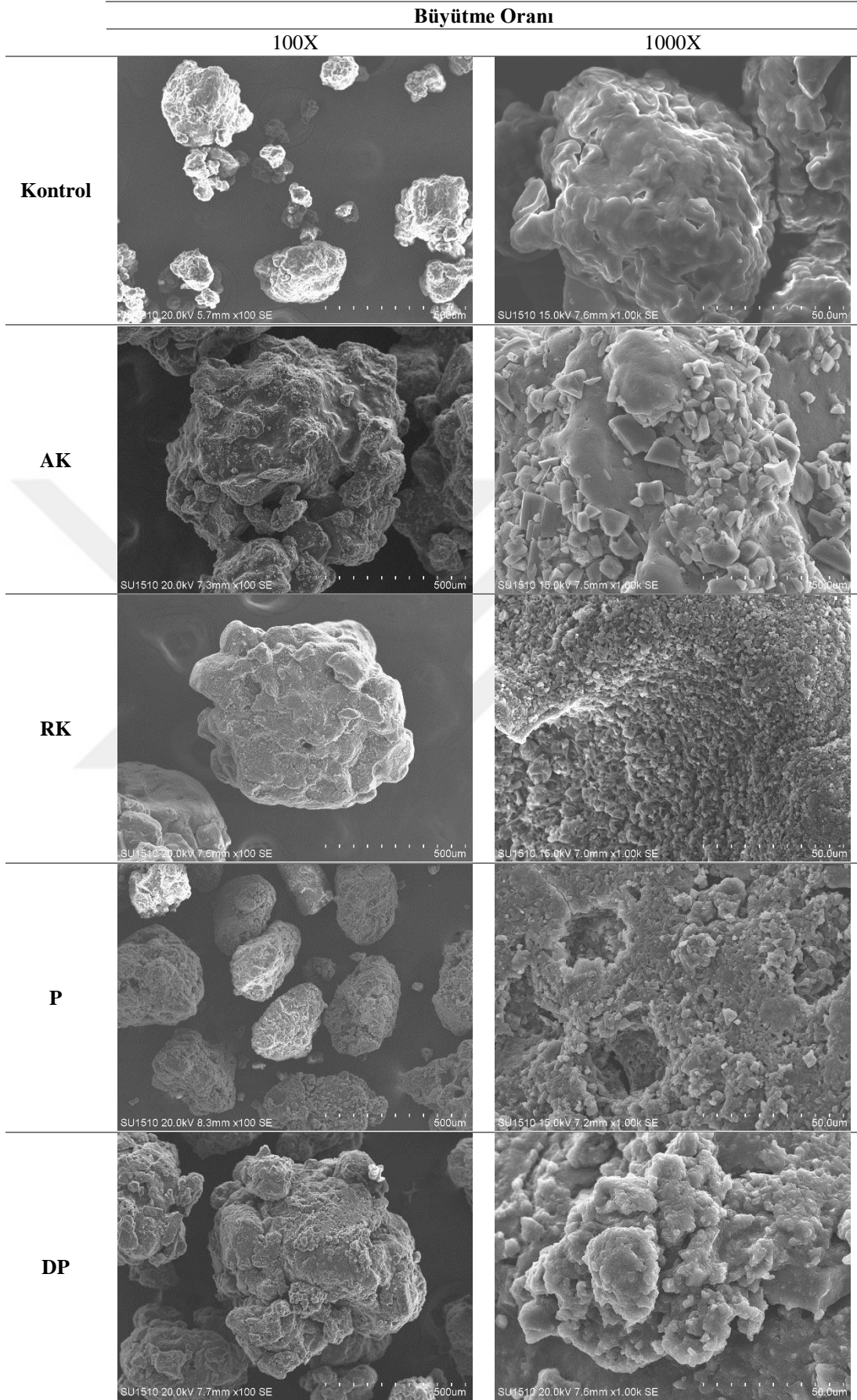
Picot ve Lacroix (2003) dondurarak kurutulmuş *Bifidobacterium breve* R070, *Bifidobacterium longum* R023 ve *L. acidophilus* R335 kültürlerinde bir spiral jet değirmeni kullanarak yapılan mikronizasyon işleminin kültürlerin canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Öğütme için uygulanan hava basıncının artmasıyla toz partikül boyutunun küçüldüğünü, ancak bununla birlikte mikroorganizmaların canlılığın da azaldığını bildirmişlerdir.

Benzer şekilde *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19'un yağsız süt matrisinde spreyle kurutulduğu başka bir çalışmada, elde edilen toz parçacık boyutu ile bakterilerin canlı kalma oranının oldukça yüksek korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Würth ve ark., 2018). Aynı şekilde Deveci (2004) de, bir bakteri popülasyonunun canlılığındaki kayıp oranı ve derecesinin, partikül büyüklüğünün kritik bir inceliğe düşürülmesiyle arttığını bildirmişlerdir.

4.6.7. Liyofilize kültürlerin SEM görüntüleri

Parçacık morfolojisinin ve partikül boyutunun, toz gıdaların yığın yoğunluğu, akışkanlık, sıkıştırma, rehidrasyon ve çözünürlük gibi çeşitli teknolojik özelliklerinden birçoğunu etkilediği bilinmektedir (Dias ve ark., 2018). Şekil 4.28'de, kontrol ve dört ayrı koruyucu madde ilave edilmiş *L. plantarum* kültürlerine ait SEM mikrografları verilmiştir. Elde edilen görüntülerden, kullanılan koruyucuların, kültürlerin morfolojisi üzerinde büyük bir etkisi olduğu görülmektedir.

Dondurarak kurutulmuş tozların morfolojisi, oldukça gözenekli bir yüzeye sahip kek benzeri bir yapı göstermektedir. Gözenekli yapı, dondurarak kurutma işlemindeki dondurma aşamasında buz kristallerinin oluşumu ve daha sonra süblimleşmesinin bir sonucu olarak oluşmaktadır. Bu yapı, genellikle toz halindeki ürüne iyi bir rehidrasyon davranışı kazandırmaktadır (Anandharamakrishnan ve ark., 2010; Dolly ve ark., 2011). Ayrıca dondurarak kurutma sonrasında, toz haline getirebilmek amacıyla numunenin öğütülerek mikronize edilmesi gerekmektedir (Ying ve ark., 2010).



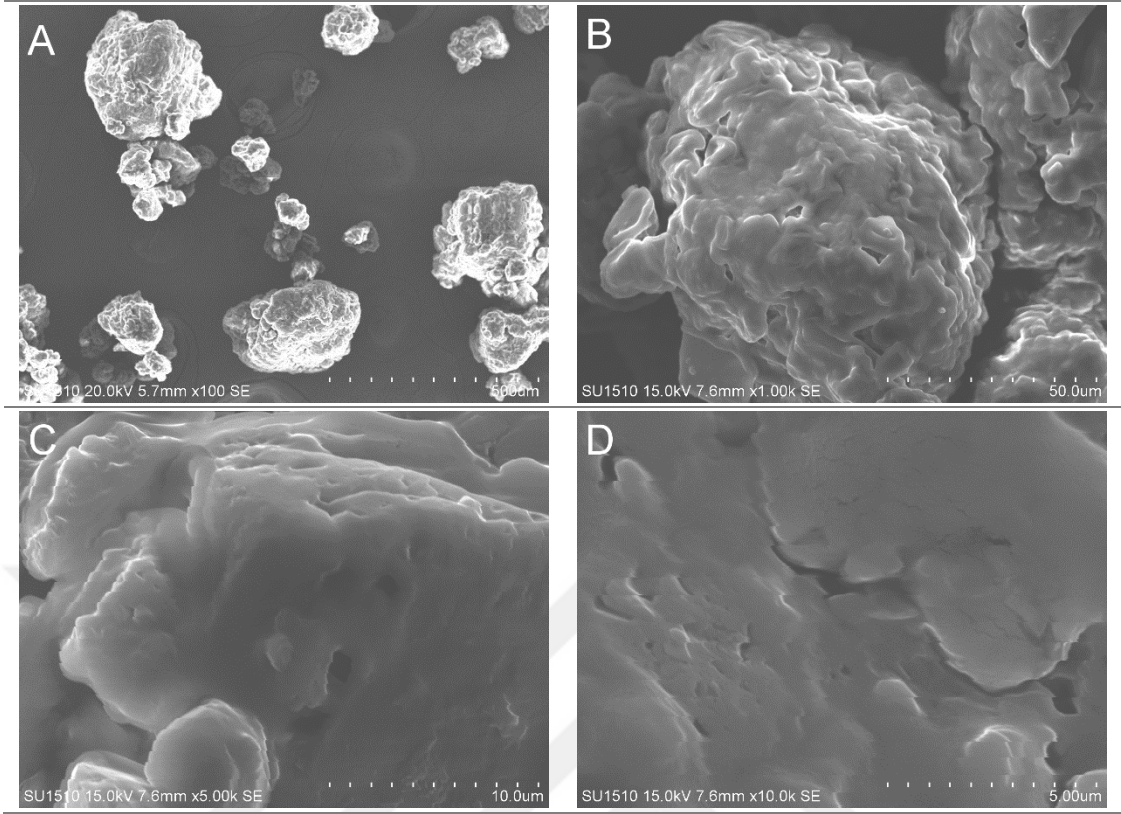
Şekil 4.28. Farklı koruyucularla birlikte liyofilize edilen *L. plantarum* kültürlerinin SEM görüntüleri

Bu çalışmada da öğütme işlemi gerçekleştirilmiş olup, bu işlemin hem parçacık boyutunda hem de tozların morfolojisinde etkili olması beklenmektedir. Buna göre, dondurarak kurutulmuş tozların morfolojisinin, genel olarak düzensiz şekil ve boyutlarda, gözenekli, süngerimsi bir yapı sergilediği görülmektedir. Koruyucu ilavesi ile daha gözenekli bir toz yapısının oluştuğu söylenebilir. Kontrol örneğinin daha düzgün bir yüzeye sahipken diğer kültürlerin girintili çıkıntılı bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür. Koruyucu içeren tüm örneklerde, özellikle de kazein ilaveli tozlarda belirgin bir şekilde köşeli parçacıklar/kırıkların varlığı söz konusudur.

Dondurarak kurutulmuş yüzeyler üzerinde, düşük kurutma sıcaklığı ve üretimde kullanılan farklı duvar malzemelerinin kaplama oluşturabilme karakterizasyonu ile ilişkili olarak çukurluk gibi yüzey düzensizlikleri oluşmaktadır. Ayrıca toz materyalin dış yüzey bileşimi, çözünürlük, akışkanlık ve yapışkanlık gibi özellikleri etkileyebilmektedir (Würth ve ark., 2018).

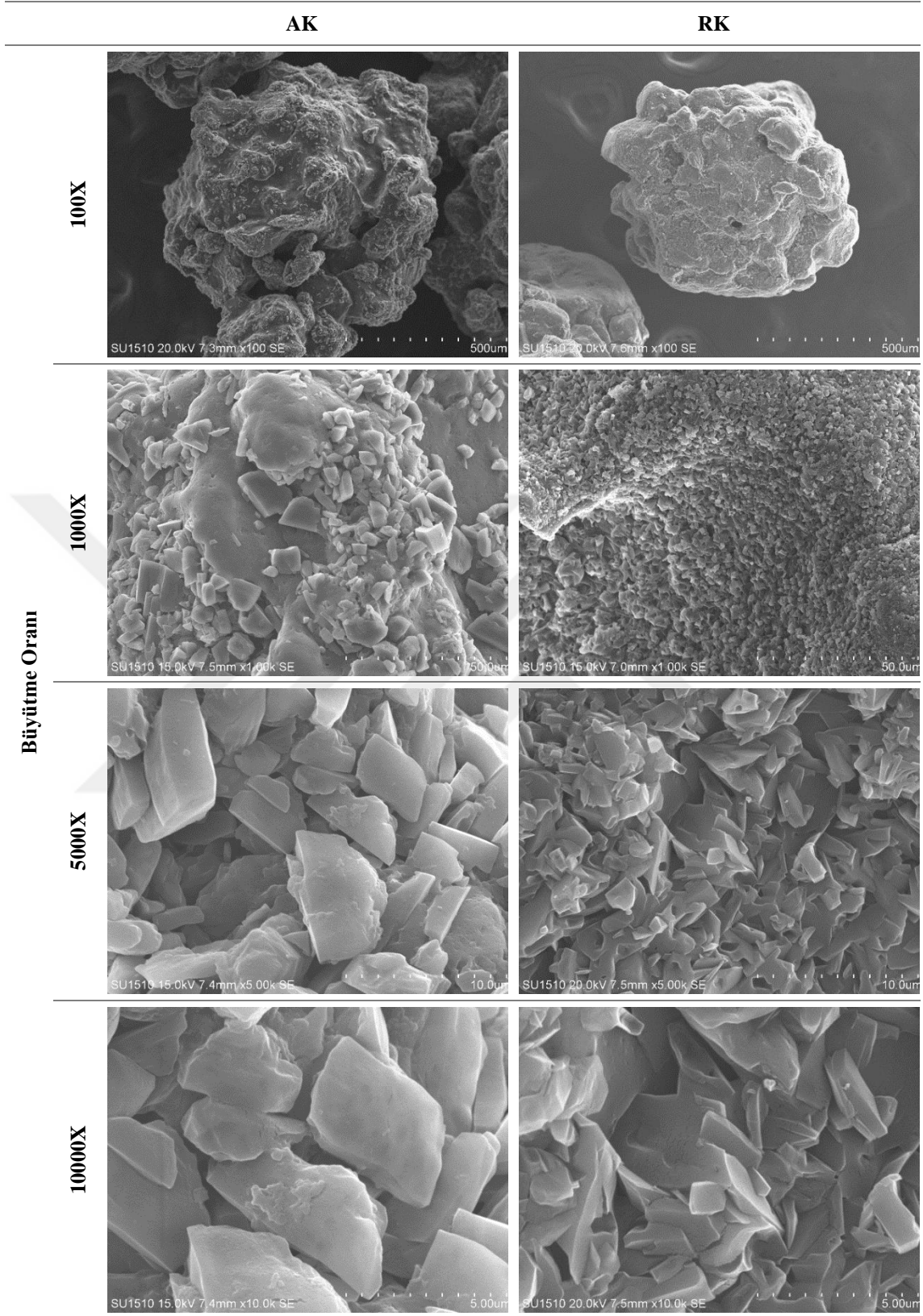
SEM mikrograflarında, kontrol örneğinin morfolojisinin diğer kültürlerle göre oldukça farklı olduğu açıkça görülmektedir. Kontrol kültürünün farklı büyütme oranlarındaki toz morfolojisi Şekil 4.29'de gösterilmektedir. Yüksek hidratlı sistemlerde buz kristallerinin yaklaşık 1 µm olarak ölçüldüğünü; buz kristallerinin, tamamen dondurulduğunda, çözünmeyen (tuzlar, laktoz vb.) ve parçacık halindeki (kazein miselleri vb.) bileşenlerle çevrili şekilde çok pürüzsüz alanlar olarak görüldüğünü ve buz fazının uzaklaşması ile üç boyutlu petek benzeri bir ağ görüntüsünün oluştuğunu tespit etmişlerdir (Buchheim, 1982). Dolayısıyla başlangıçta sahip olunan daha düşük katı konsantrasyonu, liyofilizasyon sırasında daha fazla su uzaklaşmasına vesile olacağından, daha gözenekli bir ürün oluşması beklenmektedir (Rogers ve ark., 2008).

Bu çalışmada kontrol örneğinin sahip olduğu daha düzgün yüzey, yetersiz dondurmadan kaynaklanmış olabilir. Kuru maddesinin diğer kültürlerle göre daha düşük olması, aynı sürede uygulanan dondurma işleminin yetersiz gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, dondurarak kurutma aşamasında bir miktar erime meydana gelmesi de mümkün olabilmektedir (Rogers ve ark., 2008). Aynı zamanda kontrol örneğinde liyofilizasyon işleminin yarattığı canlılık kaybının minimum seviyede olması, donmanın tamamen gerçekleşmemesiyle oluşan daha az sayıdaki buz kristallerinin bakteri hücrelerinde daha az tahribata sebebiyet vermesinden kaynaklanıyor olabilir. Ancak bu düzgün yüzeyli yapının depolama sırasında canlılığın korunmasında etkili olmadığı, pürüzlü yüzeye sahip olan diğer kültürlerin canlılığı daha iyi koruduğu görülmüştür.



Şekil 4.29. Kontrol kültürüne ait SEM görüntüleri (A:100X, B:1000X, C:5000X, D:10000X büyütme oranlarında)

Kazein içeren kültürlerin toz morfolojilerini gösteren SEM görüntüleri Şekil 4.30’de verilmiştir. AK ve RK kültürlerinin toz yapılarının birbirine oldukça benzemekte olduğu ancak RK örneğinin yüzeyinde daha fazla ve küçük boyutta kırık yapıların olduğu görülmektedir. RK kültürünün daha sürekli bir yapıda olduğu, yüzeyinde bulunan küçük parçacıkların daha sıkı bir şekilde birbirine bağlı olduğu veya tutunduğu görülmektedir. AK kültüründe ise parçacıkların daha serbest ve iri taneli olduğu fark edilmiştir. RK kültürünün sahip olduğu bu form, liyofilizasyon işlemi sırasında meydana gelen bakteri canlılığı kaybının nedenlerinden biri olabilir. Çok sayıda ve sıkışık gözeneklerden oluşan bu sert ve keskin hatlı yapı hücre tahribatına yol açmış olabilir. AK örneğindeki parçacıkların iri boyutta olması ve altındaki pürüzsüz yapı sayesinde bakteri canlılığını koruduğu düşünülebilir. Koruyucu maddelerin depolama esnasında canlılığı korumadaki yüksek performansı ise oluşturdukları bu yapıların dayanıklılığından ve madde/su migrasyonunu minimize etmesinden kaynaklanmış olabilir.

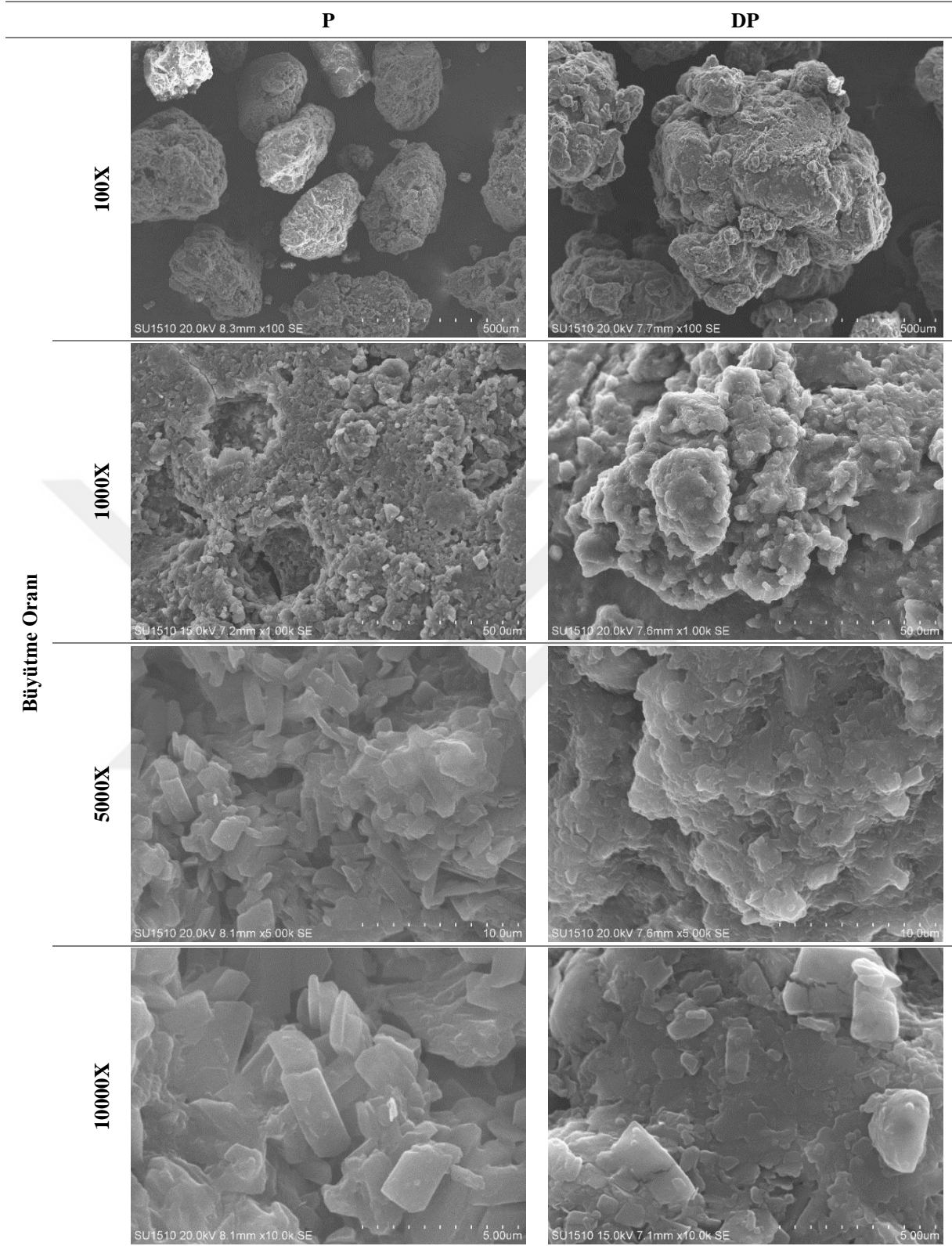


Şekil 4.30. AK ve RK kültürlerinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri

Önceki çalışmalarda, yağsız süt gibi protein içeren sistemler, sprey dondurma ya da emülsiyon dondurma tekniği ile hazırlandığında kazein misellerinin sistemin ara yüzeyine birikme eğilimi gösterdiği ve adsorbe edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca rennetle pıhtılaşmış kazein misellerinde, sulu ve sulu olmayan ortamlarda bariz olarak donma kırılması görüldüğü bildirilmektedir. Sulu bir ortamda kazein agregatları her zaman çapraz olarak kırılırken, dioksan gibi sulu olmayan bir ortamda bu agregatların ağırlıklı olarak yüzeyde kırıldığı bulunmuştur. Yağsız sütteki kazein misellerinin, bazen donma kırılmasından sonra güçlü plastik deformasyonlar gösterdiği, süt serum fazının ise herhangi bir kontaminasyonun veya süblimasyonun olmadığına pürüzsüz görüneceğini ifade etmişlerdir (Buchheim, 1982). Bu bilgiler, bu çalışmadaki kazein içeren örneklerdeki kırık yapıları açıklamaktadır. Özellikle rennet kazein ilavesinin bu yapı oluşumunu belirginleştirdiği de açıkça görülmektedir. Proteinlerin kuru formdayken (kurutulmuş sütte veya kurutulmuş protein konsantrelerinde) kırılma özellikleri ve ince yapısı hidratlanmış durumdakilere benzemekle birlikte, farklı şekillerde kurutulmuş süt ürünlerindeki globüler peynir altı suyu protein parçacıklarının ve rastgele sarmal kazein parçacıklarının yapısal boyutlarında belirgin farklılıklar bulunmuştur (Buchheim, 1982). Buna göre, bu tez çalışmasında elde edilen kültürlerin peynir altı suyu ve kazein protein içeriklerinin değişiklik göstermesi, morfolojik farklılıkların oluşmasını sağlamış olabilir.

Peynir altı suyu tozu ilavesinin toz kültürlerin yüzey morfolojisini oldukça etkilediği görülmektedir. P ve DP örneklerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.31'da verilmiştir. P kültür tozunun yüzeyinde daha çok çökeltilerin, DP kültüründe ise yükseltelerin olduğu görülmüştür. Genel itibari ile kazein ilave edilen kültürlerden ziyade daha çok kontrol örneğine benzerlik gösterdikleri, ancak daha fazla kırık yapı oluşumu gözükmemektedir. Kırık yapılar aynı zamanda kazein ilave edilen kültürlerin morfolojisini andırmaktadır. Başlangıçtaki kuru madde içeriği ve şeker miktarının fazla olması bu yapıların farklılaşmasına neden olmuş olabilir. Kontrol örneğine göre gözenekli olan bu yapıların, kazein ilaveli kültürlerde olduğu gibi, depolama sırasındaki canlılığı korumada olumlu etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Rajam ve ark. (2012), denature edilmiş ve edilmemiş peynir altı suyu protein izolatlarının sodyum alginatla birlikte dondurarak kurutmuşlardır. Elde ettikleri mikrokapsüllerin, buz kristallerinin süblimasyonu nedeniyle oldukça gözenekli ve süngerimsi bir yapıya sahip olduklarını, ayrıca *L. plantarum* hücrelerinin denature edilmiş peynir altı suyu protein izolatu + sodyum alginat jel ağı tarafından tamamen sarılmış olduğunu görmüşlerdir.



Şekil 4.31. P ve DP kültürlerinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri

Dondurarak kurumuş toz ürünler, düzensiz şekiller ve yüzeyler gösterirken, spreyle dondurarak kurumuş tozlar ise yüzeyde ince gözeneklere sahip ve neredeyse küresel partiküller olarak görünmektedir. Ayrıca, dondurarak kurutma aşamasında çökmeye maruz kalan peynir altı suyu proteinleri birçok kırık parçacık oluşumuna sebebiyet vermektedir (Dolly ve ark., 2011).

Haque ve Roos (2006) püskürtülerek kurutulmuş amorf laktoz ve laktoz/protein karışımlarının SEM görüntülerinde genellikle küresel formda göründüklerini, dondurarak kurumuş laktoz ve laktoz/protein karışımlarının ise kırık cam parçalarına benzediğini ifade etmişlerdir. Aynı zamanda dondurarak kurumuş laktozun kristal yapısının, iğne veya çubuk benzeri yapılara sahip olduğunu gözlemişlerdir.

4.6.8. Liyofilize kültürlerin termal davranışları

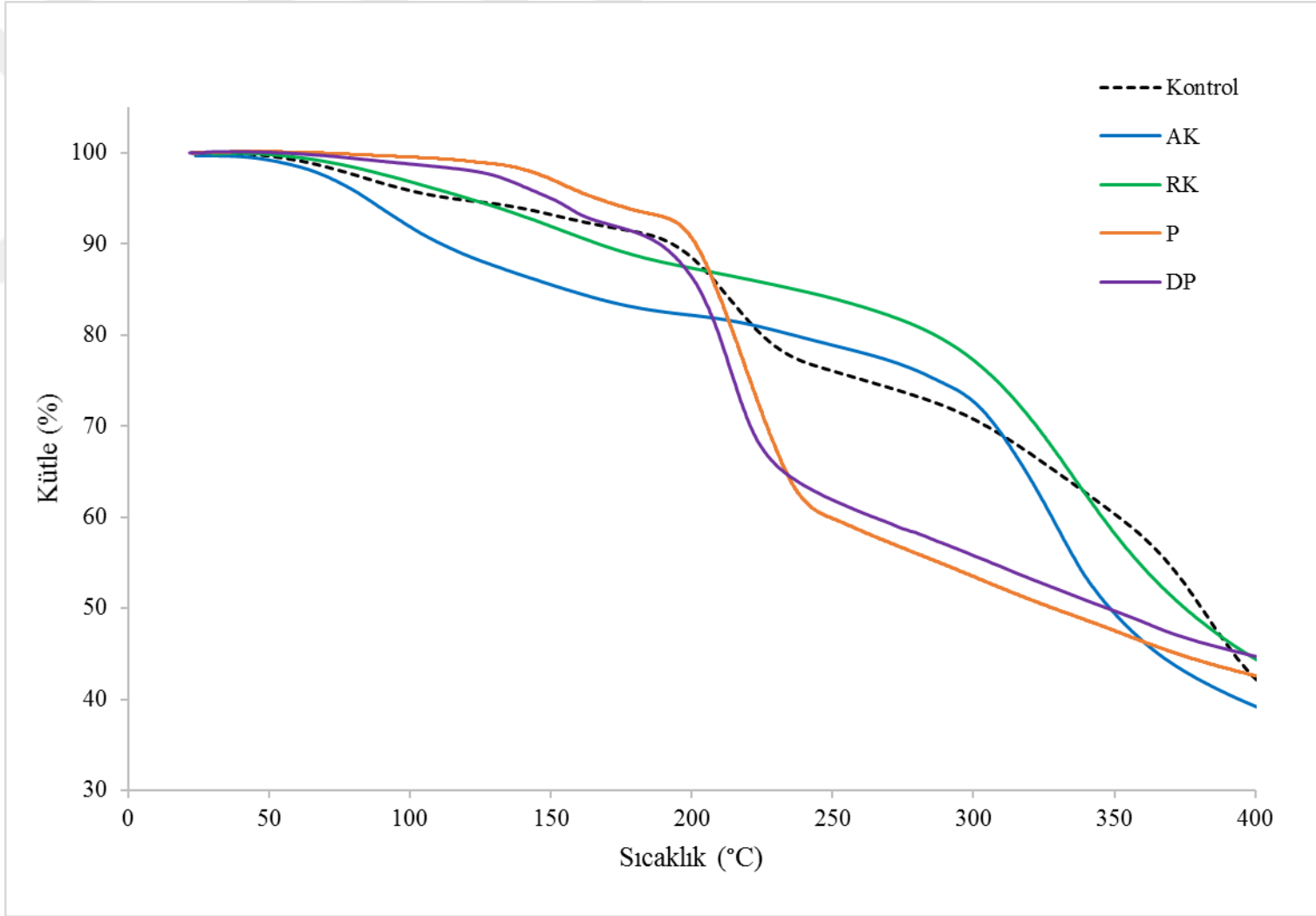
Kurutma koşullarına göre, ana süt bileşenleri Maillard reaksiyonu, protein denatürasyonu, protein agregasyonu, protein-yağ etkileşimleri ve protein-karbonhidrat bağlanması gibi kimyasal değişimlere veya laktoz kristalizasyonu, yapışkanlık, çökme ve aroma retansiyonu gibi fiziksel değişimlere neden olabilmektedir. Bu değişikliklerin niteliği ve kapsamı, süt tozunun kompozisyonu, işleme ve saklama koşulları gibi birçok değişkene bağlı olabilmektedir (Pugliese ve ark., 2016).

Süt tozunun termal özellikleri, yağ ve laktoz içeriğinden önemli ölçüde etkilenmektedir (Rahman ve ark., 2012; Lapčík ve ark., 2015). Sütün çok bileşenli bir karışım olması nedeniyle, termal davranışını kompleks bileşenlere bağlamak, sinerjistik etkilerin de hesaba katılması gerektiğinden, mümkün olamamaktadır (Lapčík ve ark., 2015). Farklı kriyojenik koruyucu içeren *L. plantarum* kültürlerine ait TGA ve DSC grafikleri sırasıyla Şekil 4.32 ve 4.33’de verilmiştir. TGA ve DSC grafiklerine bakılarak, kullanılan koruyucu maddelerin kültürlerin termal stabilitesi üzerine belirgin etkileri olduğu açıkça görülmektedir.

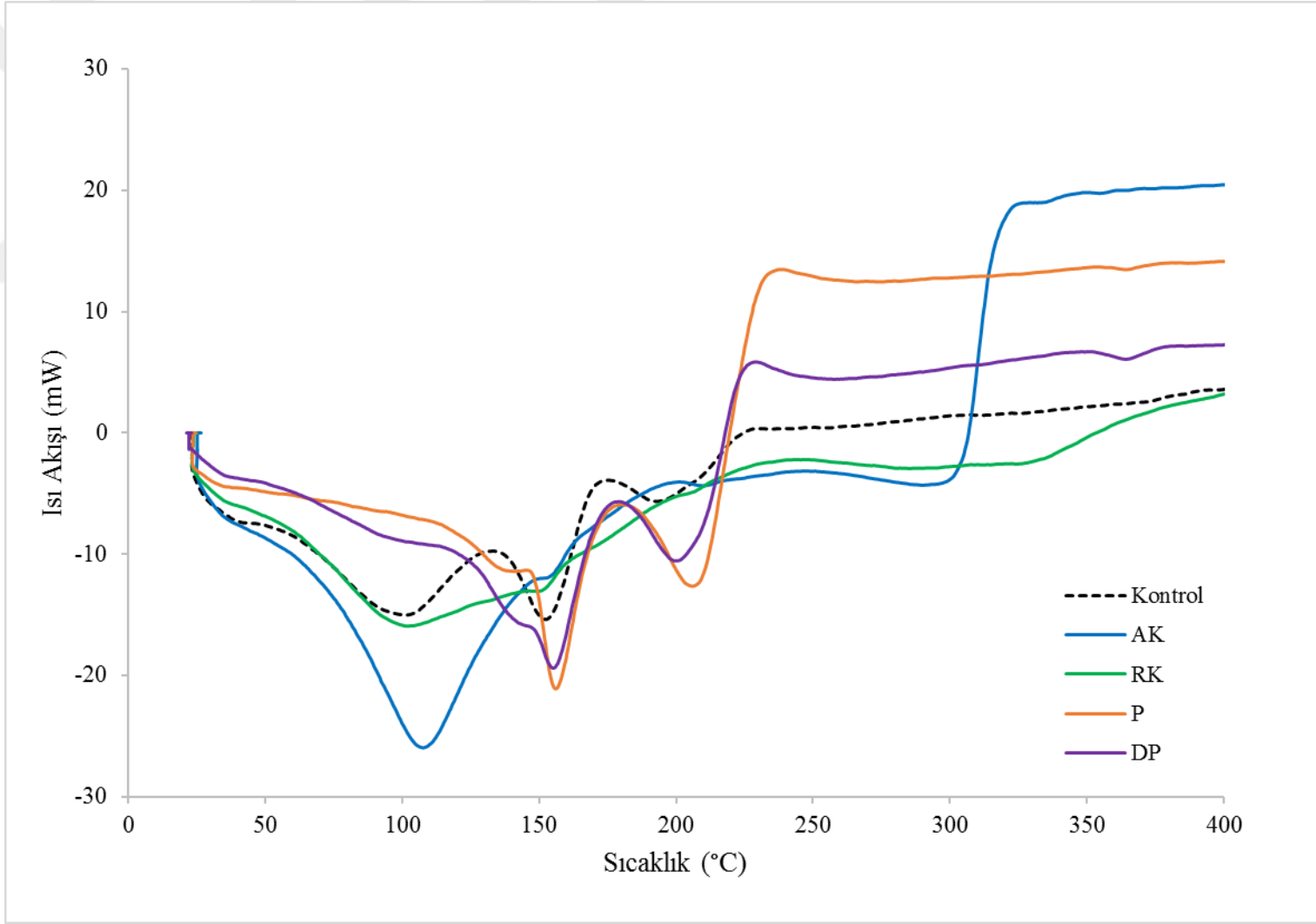
Nem, protein, yağ, mineral ve laktik asit gibi diğer bileşenlerin varlığı, süt tozlarının su absorpsiyonu, camsı geçiş sıcaklığı ve kristalizasyonu dâhil fizikokimyasal davranışlarını büyük ölçüde etkileyebilmektedir. Bir karbonhidratın cam geçiş sıcaklığı, moleküler ağırlığı ile ters orantılı olmaktadır. Süt tozundaki ana bileşen olan laktoz, nispeten yüksek bir camsı geçiş sıcaklığına (T_g : 97–116°C) sahiptir (Shrestha ve ark., 2007). Yağsız süt tozlarının camsı geçiş sıcaklığının, plastikleştirici görevi gören su miktarından etkilendiği bilinmektedir. Örneklerin nem içeriğinin artmasıyla camsı geçiş

sıcaklığının azalması beklenmektedir. Ozmen ve Langrish (2002), %1.65 ve %4.52 nem içeriğine sahip süt tozlarının camsı geçiş sıcaklıklarını sırasıyla 87.7°C ve 46.7°C olarak bulmuşlardır. Benzer şekilde Jouppila ve Roos (1994) dondurarak kurutma ile elde ettikleri yağsız süt tozunun çeşitli nem içeriklerindeki desikatörlerde depolanması sonucunda nem içeriğinin artmasıyla camsı geçiş sıcaklığının azaldığını bulmuşlardır. Literatürden edinilen bilgiler ışığında, bu çalışmada elde edilen kültürlerin nem içeriğinin fazla olması, camsı geçiş sıcaklarının DSC ile yapılan taramada kullanılan başlangıç sıcaklığının altında olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle elde edilen grafiklerde camsı geçiş sıcaklığı görünmemektedir.

Camsı durum stabilite için önemli olmasına rağmen, su ve katı bileşenler arasındaki spesifik etkileşimler, çeşitli su aktivitelerindeki bozulma kinetiğini farklı şekillerde etkileyebileceğinden, kimyasal ve biyolojik stabilitenin tek belirleyicisi olmamaktadır. Su aktivitesinin arttırılması camsı geçiş sıcaklığını düşürürken aynı formülasyon ile karşılaştırıldığında kuru durumdaki probiyotiklerin inaktivasyonunu da arttırmaktadır. Bununla birlikte, inaktivasyon hızı, probiyotiklerin tutuklandığı matris bileşenlerine daha fazla bağlı olmaktadır. Laktoz, trehaloz ve laktoz-trehaloz (1:1) şeker matrislerinde dondurarak kurutulmuş *Lactobacillus rhamnosus* GG hücrelerinde en yüksek canlılık matrisler camsı haldeyken bulunmuştur. Fakat depolama sırasında kurutulmuş probiyotik bakterilerin canlılığındaki kaybın önlenmesi için camsı halin sürdürülmesi tek başına yeterli olamamaktadır. Camsı haldeki bir laktoz matrisinde dondurarak kurutulmuş *Lactobacillus acidophilus* için, camsı olmayan sakaroz matrisine göre daha yüksek derecede inaktivasyon gözlenmiştir. Düşük su aktivitesinde indirgen şekerler içeren matrislerde meydana gelen esmerleşme reaksiyonları, kuru formdaki *Lactobacillus acidophilus*'un canlılığındaki kayıp ile ilişkilendirilmiştir (Hoobin ve ark., 2013).



Şekil 4.32. Farklı kriyojenik maddelerle hazırlanan *L. plantarum* liyofilize kültürlerinin TGA grafikleri



Şekil 4.33. Farklı kriyojenik maddelerle hazırlanan *L. plantarum* liyofilize kültürlerinin DSC grafikleri

Laktoz kristalizasyonu ve Maillard reaksiyonu, işleme ve depolama sırasında süt ve peynir altı suyu tozlarında meydana gelen iki temel değişikliktir. (Pugliese ve ark., 2016). Pek çok kurutma koşulunda, kristalleşmenin gerçekleşmesi için yeterli zaman olmadığından, kurutulmuş ürünün önemli bir miktarı amorf durumda kalır. Kurutma hızına bağlı olarak, elde edilen kurutulmuş ürün bir miktar kristalli malzeme de içerebilir. Ancak bu, münferit bileşenlerin işleme koşulları, bileşimi ve özelliğinden etkilenecektir (Bhandari ve Howes, 1999). Yağsız süt tozu üretiminde kullanılan spreyle kurutma işlemi, suyun hızlı bir şekilde uzaklaştırılması nedeniyle laktozun kristalleşmesine izin vermez. Suyun uzaklaşması ile laktoz, doğrudan çözünmüş halden katı benzeri, amorf bir camsı yapıya dönüşmektedir (Schuck ve ark., 2005). Liyofilize süt tozu üretiminde ise bu durum değişiklik gösterebilmektedir. Özellikle kurutma süresinin uzaması ile amorf haldeki laktozun tamamı ya da tamamına yakını kristal yapıya dönüşebilmektedir (Biliaderis ve ark., 2002).

Amorf laktozun sabit bir sıcaklıkta kristalleşmesi, depolama sırasında bağıl neme ve su içeriğine bağlıdır. Camsı laktoz metastabildir ve nem absorpsiyonuna eğilimlidir, nem kazanması ise plastikleşmeyle sonuçlanmaktadır. Plastikleşme ise, laktozun yeniden kristal haline düzenlenmesine neden olan moleküler mobilitiyi arttırmaktadır. Suyun plastikleşmesi ve camsı geçiş sıcaklığının (T_g) depolama sıcaklığının altına düşmesi sonucunda kristallenmenin meydana geldiği öne sürülmüştür. Depolama sıcaklığının T_g 'den yüksek olması ile moleküler mobilitenin ve difüzyonun artmasıyla kristalleşme meydana gelebilmektedir. Laktoz kristalizasyonu, kekleşme, çözünürlük kaybı, enzimatik olmayan esmerleşme, lizin kaybı ve lipit oksidasyon gibi birçok bozulma reaksiyonunu hızlandırmakta ve kurutulmuş süt ürünlerinin depolama stabilitesini ve kalitesini önemli ölçüde azaltmaktadır (Jouppila ve Roos, 1994; Jouppila ve ark., 1997).

Kurutma işleminden önceki süt konsantrasyonunun, laktoz doygunluğuna ve çekirdek oluşumuna neden olduğu ileri sürülmüştür, bu da süt tozlarındaki laktozun kristalleşme davranışını etkilemektedir. Bununla birlikte, süt tozlarındaki laktoz kristalleşmesinin 24°C 'de bağıl nemin %37'nin üzerinde olduğu depolama koşullarında meydana geldiğini doğrulanmıştır. Bu sonuç, kristalleşmenin kurutma yönteminden bağımsız olarak laktozun camsı geçişi ile kontrol edildiğini göstermektedir (Jouppila ve ark., 1997).

Süt tozlarındaki laktozun kristalleşmesinin, tuzlar gibi laktoz olmayan maddelerin miktarından ve doğasından etkilenmesi söz konusudur. Süt, yaklaşık ortalama 158.5 mmol/L oranında inorganik ve organik tuz içermektedir. Kristalleşmenin moleküler

düzye de laktoz/tuz etkileşimlerinden etkilendiği görülmüştür. Dondurarak kurutulmuş laktoz ve laktoz/tuz karışımlarında, kristalizasyon esas olarak laktozun fiziksel durumu tarafından yönetilmektedir. Kristalizasyon işleminin genellikle safsızlıkların varlığı ile geciktirilmektedir. Eser miktardaki safsızlıklar veya çok yüksek tuz konsantrasyonunun laktoz kristal oluşumunu üzerinde geciktirici bir etkisi olmaktadır (Elmonsef Omar ve Roos, 2007).

Camsı geçişin Maillard reaksiyonu gibi difüzyon kontrollü kimyasal reaksiyonların kinetiğini etkilediği bulunmuştur. Bir sistemin camsı geçiş sıcaklığının (T_g) altındaki yüksek viskozitesi, sınırlı moleküler mobilite ve bunun sonucu olarak reaksiyon hızının geciktirilmesiyle ilişkilendirilmiştir. Ancak suyun plastikleşmesi, laktozun amorf durumdan kristal haline dönüşmesine yol açabilen moleküler mobilitiyi arttırmaktadır. Kapalı sistemlerde, laktoz kristalizasyonu ile amorf laktozdan suyun salınması, a_w 'de bir artışa neden olmakta ve enzimatik olmayan esmerleşme gibi bozucu değişiklikleri hızlandırmaktadır. Kristalleşme, artan bağıl nem ve ısı işlem ile artmaktadır (Pereyra Gonzales ve ark., 2010). Bu çalışmada elde edilen kültürlerdeki laktozun başlangıçta bir kısmı amorf durumda olsa bile, depolama süresince tamamının kristalleşeceği düşünülebilir. Aynı zamanda yüksek nem içeriğine sahip olmaları da bu süreci hızlandırmış olacaktır.

Bir çalışmada aynı su aktivite aralığında laktoz/peynir altı suyu protein tozlarında, laktoz/kazein tozlarına kıyasla daha geç laktoz kristalizasyonu gözlenmiştir (Foster ve ark., 2005). Başka bir çalışmada da aynı nem içeriğine sahip dondurarak kurutulmuş laktoz ve laktoz/protein karışımlarının camsı geçiş ve kristalizasyon sıcaklıklarının püskürtülerek kurutulmuş laktoz ve laktoz/protein karışımlarından biraz yüksek olduğu, ancak dondurarak kurutulan laktoz/Na-kazeinat ve laktoz/jelatin karışımlarının ise kristalizasyon sıcaklıklarının püskürtülerek kurutulanlardan düşük olduğunu bildirmiştir (Haque ve Roos, 2006). Literatür göz önüne alınarak, kazeinle zenginleştirilen toz *L. plantarum* kültürlerinin, kristalleşme sürecinin diğer kültürlerle oranla daha erken başladığı tahmin edilmektedir.

Çizelge 4.24'te kültürlerin nem içerikleri ve TGA sırasında bu nemi kaybettikleri sıcaklık değerleri verilmiştir. Kültürlerin DSC eğrileri, içerdikleri serbest su tamamen uzaklaşana kadar endotermik bölgede kalmıştır, serbest suyun uzaklaştığı bu sıcaklıklardan sonra ise ekzotermik bir yükseliş göstermiştir.

Çizelge 4. 24. Liyofilize kültürlerin rubutet içerikleri ve TGA sırasında bu nem içeriğini tamamen kaybettiği sıcaklık değerleri

	Nem içeriği	Sıcaklık (°C)
Kontrol	16.14	213
AK	34.41	317
RK	21.03	292
P	5.80	174
DP	8.06	172

AK: Asit kazein ilave elde edilen kültür, RK: Rennet kazein ilave elde edilen kültür, P: PAST ilave elde edilen kültür, DP: DPAST ilave elde edilen kültür.

Kültürlerin Şekil 4.32’de görülen TGA eğrilerindeki azalma, 3 veya 4 bölgeye ayrılarak incelenmiştir. Yalnızca kontrol örneğinde 3 farklı eğimde gözlemlenen kütle kaybı, diğer örneklerin tümünde 4 bölgede görülmüştür. İlk iki bölgedeki azalma büyük oranda sistemdeki suyun kaybına bağlanabilir. 2. kısımdaki kütle kaybının artışına düşük nem koşulları altındaki Maillard reaksiyonu sırasında meydana gelen su kaybı eklenmiş olabilir.

Susuz bir sistemde, kimyasal reaksiyonların meydana gelmesi sınırlı moleküler hareketliliğe ve reaktanların (laktoz ve amino grupları) yakınlığına bağlı olmaktadır (Burin ve ark., 2000). Sütün yüksek laktoz içeriği ve lizin açısından zengin protein konsantrasyonu, sütü ve özellikle ara su aktivitesine sahip süt ürünlerini termal olarak indüklenen enzimatik olmayan esmerleşmeye karşı hassas hale getirmektedir. Süt ürünlerinde gerçekleşen bu Maillard reaksiyonları, işleme sırasında ısıtma ve orta ila yüksek sıcaklıkta uzun süreli tutuma ile indüklenmektedir. Esmerleşme reaksiyonlarının depolama sırasında süt tozlarında ana değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Thomsen ve ark., 2005).

Daha yüksek protein içerikli sistemlerde, reaksiyon derecesinin belirlenmesinde su kaybının esmerleşme gelişiminden daha hassas olabileceği belirtilmiştir (Burin ve ark., 2000). Bir çalışmada peynir altı suyu tozunda Maillard reaksiyonunu en yüksek oranda 0.44 kritik su aktivitesinde gerçekleştiğini ve burada, amorf laktozun serbest suyunun kristallenmeye başlaması sonucunda esmerleşme reaksiyonu için reaktanları harekete geçirdiğini bildirilmiştir (Saltmarch ve ark., 1981; Bhandari ve Howes, 1999).

Yaklaşık 200°C civarında başlayan 3. bölgede laktozun kristal kafesinden de suyun ayrılması, laktozun erimesi sonucunda termotahribatının başlaması ile kütle kaybı görüldüğü düşünülmektedir. 4 bölgedeki azalma, başlangıçta laktoz ve proteinlerin

dekompozisyonu ile gelişmekte ve genellikle karbonlu materyalin yok olmasına atfedilen (Cardoso ve ark., 2011) daha yavaş kütle kaybı ile devam etmektedir.

Yağsız süt tozlarının DSC profillerinin saf protein konsantrlerine kıyasla daha büyük karmaşıklık gösterdiği, bunun nedeninin ise, muhtemelen diğer ekzotermik reaksiyonlar ile örtüşmesi olarak açıklanmıştır. Aynı zamanda, karışık sistemlerde camsı geçişin geniş olabileceği ve bunu DSC ile saptamanın güçleştiği bildirilmektedir. Ayrıca, şekerlerin proteinler üzerindeki bilinen plastikleştirici etkisi nedeniyle laktozun, proteinlerin camsı geçişinde azalmaya ve düşük sıcaklıklarda görülebilen diğer bazı geçişlerle örtüşmeye neden olabilmektedir (Pugliese ve ark., 2016).

Kültürlerin kimyasal içeriklerini ve meydana gelen kimyasal değişiklikleri daha isabetli olarak tahmin etmek ve yorumlayabilmek için DSC ve TGA sonuçlarını birlikte ele almak en doğru yaklaşım olacaktır. Kültürlerin DSC eğrilerinde belirgin olarak 3 endotermik, 1 ekzotermik pik gözlemlendiği söylenebilir. Yaklaşık 100°C dolaylarında gerçekleşen ilk endotermik pikin, peptit, polipeptit ve globulin peptitleri gibi spesifik süt proteinlerinin denatürasyonu olduğu tahmin edilmektedir. Genellikle, peynir altı suyu proteinlerinin (a-laktalbumin, b-laktoglobulin) denatürasyonunun, toz ürünün özelliğine ve üretimde kullanılan işleme bağlı olarak 50–90°C arasında bir sıcaklık bölgesinde meydana gelmesi beklenmektedir (Pugliese ve ark., 2016).

150°C etrafındaki 2. pik ise büyük ihtimalle su buharı desorpsiyonundan kaynaklanmaktadır (Ostrowska-Ligeza ve ark., 2012). Bu termal olayın bir kütle kaybı ile birleşmesi, termogravimetrik analizlerle de doğrulanmıştır. Aynı zamanda yine bu sıcaklıklarda endotermik bir reaksiyon olan kazein denatürasyonunun da gerçekleşmiş olabileceği ancak piklerin örtüştüğü tahmin edilmektedir. Kazeinin, 100°C’de 12 saatte, 130°C’de 1 saatte veya 150°C’de 3 dakikada koagüle olduğu bilinmektedir (Maćej ve ark., 2002).

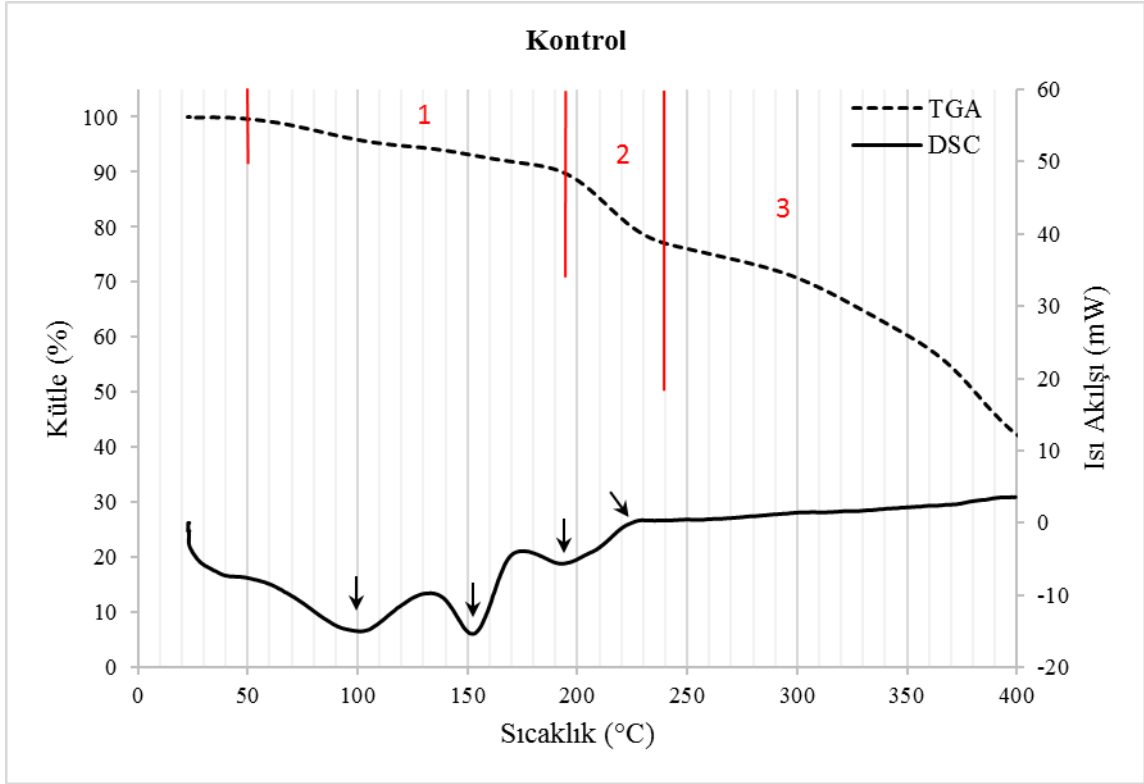
150–200°C arasında Maillard reaksiyonuna ait bir ekzotermik pik olabileceği ancak bunun diğer pikler arasında kalarak baskılanmış olabileceği düşünülmektedir. 200°C civarındaki 3. endotermik pik, laktozun kristal kafesine bağlı hidrasyon suyunun ayrılması ve laktozun erimeye başlamasını gösterdiği tahmin edilmektedir. Çünkü bu sıcaklıklardan sonra tamamen susuz hale gelen materyal artık kristalizasyon suyunu da kaybederek bozunmaya başlayacaktır. DSC analizlerinde saf kristalin α -laktoz monohidrattan su ayrılması tek bir ayrı aşamada 97–165°C de olurken, amorf laktozdan ise 5–135°Cde devamlı bir dehidrasyon ile olmaktadır. İlk pik daha düşük sıcaklıkta görülür ve gevşek bağlı suyu temsil eder. Bu genelde amorf haldeki protein veya laktoz

tarafından bağlanan sudur. Kristal suyunun ise saf laktoza daha sıkı bir şekilde bağlandığı, sadece daha yüksek sıcaklıkta salındığı ve desorpsiyonunun daha fazla enerji gerektirdiği bildirilmiştir (Berlin ve ark., 1971). α -laktose monohidrat %5 oranında kristal suyu içermektedir ve erime noktası 202°C'dir, susuz formdaki β -laktozun erime noktası ise 252°C olarak bildirilmektedir (Shendurse ve Khedkar, 2016). Brittain ve ark. (1991), susuz laktozun DSC termogramı esas olarak 235°C civarındaki erime endoterminden oluştuğu, bu erime olgusuna bileşiğin ayrışmasının da eşlik ettiğini bildirmişlerdir. Gombás ve ark. (2002), %100 kristalin formdaki laktozun DSC diyagramlarında kristal suyunun ayrılmasını 144°C'de, α ve β -formundaki laktozun erimesini sırasıyla 213 ve 224°C'de gözlemlemişlerdir.

Son olarak 200–250°C'nin (AK; 325°C) üzerinde DSC eğrilerinin ekzotermik bölgeye yükseldiği, bunun da bu yüksek sıcaklıklardan itibaren kimyasal bozunmaların başlamasının ve polimer omurgasının dekompoze olmasının neden olduğu yönünde tahmin yürütülmektedir.

Farklı kriyojenik madde ilavesi farklı TGA ve DSC eğrileri ile sonuçlanmıştır. Bu nedenle Şekil 4.34–38'da kültürler tek tek ele alınmış, TGA ve DSC eğrileri bir arada incelenerek termal davranışları detaylandırmıştır.

Kontrol kültürünün termogravimetrik analiz sırasında ısıtılmasıyla kütle kaybı 50°C'den itibaren başlamıştır ve yaklaşık 192°C'ye kadar sabit bir eğimde devam etmiştir. Bu bölgede gerçekleşen yaklaşık %11 oranındaki kütle kaybına neden olacak en büyük etmen, örnek içindeki suyun desorpsiyonudur. Çizelge 4.24'ten de görülebileceği gibi, örnek içerisindeki serbest suyun miktarı yaklaşık %16, bu suyun tamamen uzaklaştığı sıcaklık ise 213°C'dir. Daha sonra 192–240°C arasında %12 civarında oldukça hızlı bir kütle kaybı oluşarak, örnekteki toplam kütle kaybı %23'lere ulaşmıştır. 2. bölgedeki bu önemli azalma, örnek içinde kalan serbest suyun uzaklaşması, düşük nem koşulları altındaki Maillard reaksiyonu sırasında meydana gelen su kaybı ve aynı zamanda laktoz kristal suyunun da uzaklaşması nedeniyle hızlı bir kütle kaybı gözlenmiş olabilir. Yaklaşık 240°C'den itibaren başlayan üçüncü bölgede ise laktozun erimesi ve protein ve şekerlerin dekompozisyona bağlı olarak oluşan kütle kayıpları olduğu tahmin edilmektedir.

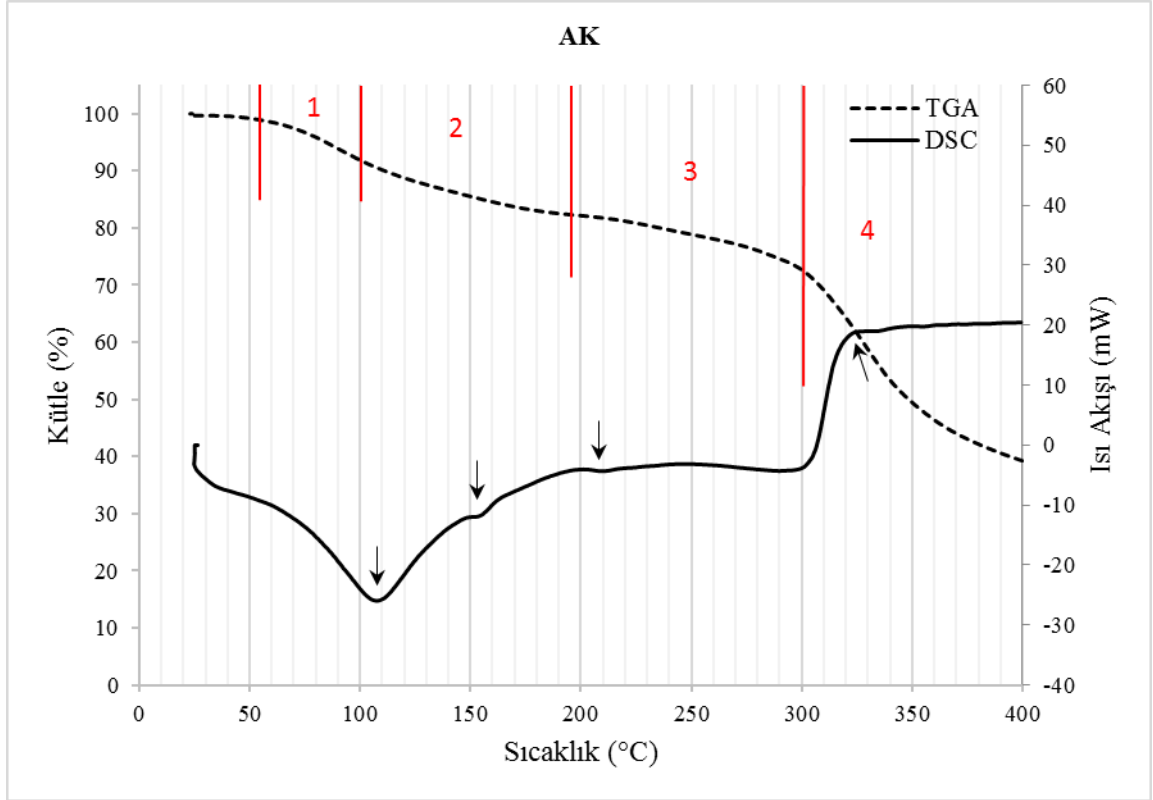


Şekil 4.34. Kontrol kültürüne ait TGA ve DSC eğrileri

DSC termogramında 50–130°C aralarında başlayan protein ve peptidlerin denatürasyonu 100°C’de maksimum noktaya ulaşmıştır. Bu sıcaklıklarda muhtemelen laktoalbümin ve laktoglobülinlerin denatürasyonu söz konusudur. Sıcaklığın artmasıyla 152°C’de maksimuma ulaşan endotermik pikin örnekten ayrılan serbest su kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda bu sıcaklıklarda kazeinin termal denatürasyonunun gerçekleşebileceği de unutulmamalıdır. Bu endotermik pikten sonra ekzo yöne doğru yükselen ısı akışı, yeniden azalarak endotermik duruma geçmektedir. Bu aralıkta oluşması beklenen ekzotermik Maillard reaksiyonunun, diğer endotermik piklerle örtüşerek bu şekilde görüldüğü tahmin edilmektedir. 192°C’de gerçekleşen 3 endotermik reaksiyon için kristal haldeki laktoz molekülünden hidrat suyunun ayrıldığı ve bunun sonucunda da erimeye başladığı düşünülmektedir. 230°C ve sonrasında ekzotermik davranan kontrol örneğinde bozunma reaksiyonlarının başladığı söylenebilir.

Çizelge 4.25. Kontrol kültürünün DSC ve TGA Termogramları

Pik	DSC		TGA		
	Sıcaklık aralığı (°C)	Maksimum pik (°C)	Bölge	Sıcaklık aralığı (°C)	Toplam Kütle Kaybı (%)
1. endotermik	50–130	100	1	50–192	11
2. endotermik	130–175	152	2	192–240	23
3. endotermik	180–210	192	3	240–400	58
4. ekzotermik	210–400	230	3	240–400	58



Şekil 4.35. AK kültürüne ait TGA ve DSC eğrileri

AK kültürünün TGA termogramından da görüldüğü gibi, 100°C'ye kadar olan %8'lik kütle kaybı, 2. ve 3. bölgelere göre nispeten hızlı gerçekleşmiştir ve muhtemelen örneğin nemini kaybetmesinden kaynaklanmaktadır. DSC eğrisinde 107°C de maksimuma ulaşan protein denaturasyonu da bu aralıkta başlamıştır. 2. ve 3. bölgelerde yaklaşık %10'ar kütle kayıpları görülmüştür ve sıcaklık 300°C'ye ulaşana kadar toplam kütle kaybı %28 olmuştur. Bu bölgelerdeki meydana gelen kütledeki azalmanın en büyük sorumlusu örnekteki serbest sudur. AK örneğinin yüksek su içeriği ve kazein ağ yapısının bu suyu sıkıca tutması nedeniyle, bünyesindeki suyun tamamının daha yüksek sıcaklıklara ulaşarak uzaklaştırılabilmiş olduğu tahmin edilmektedir. Çizelge 4.24'ten bu sıcaklığın 314°C olduğu görülmektedir. 154 ve 210°C'lerde 2 endotermik pik

gözlemlenmiş ve bunların diğer örneklerle benzer sıcaklıklarda olduğu görülmüştür. Ancak kazein ilave edilen kültürlerde dekompozisyon sıcaklığının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. AK örneğinin 326°C'den itibaren ekzotermik parçalanma reaksiyonları hız kazanmıştır. Bu yüksek dekompozisyon sıcaklığının, kültürün kazein protein içeriğindeki artıştan kaynaklanıyor olması muhtemeldir. Başka bir çalışmada kütle kaybı ve sıcaklık eğrisi kullanılarak, kazeinin minimum ve maksimum reaksiyona karşılık gelen başlangıç ve yarı yıkımını gösteren termal indeksleri sırasıyla $T_{%5} = 125^{\circ}\text{C}$ ve $T_{%50} = 355^{\circ}\text{C}$ olarak tespit edilmiştir (Purevsuren ve Davaajav, 2001). Bu çalışma bize göstermektedir ki kazeinin tamamen parçalanması için çok daha yüksek sıcaklıklar veya süreler gerektirmektedir. Dolayısıyla kazein miktarının fazlaşması ile kültürlerin dekompoze olduğu sıcaklıkların yükselmesi beklenebilir.

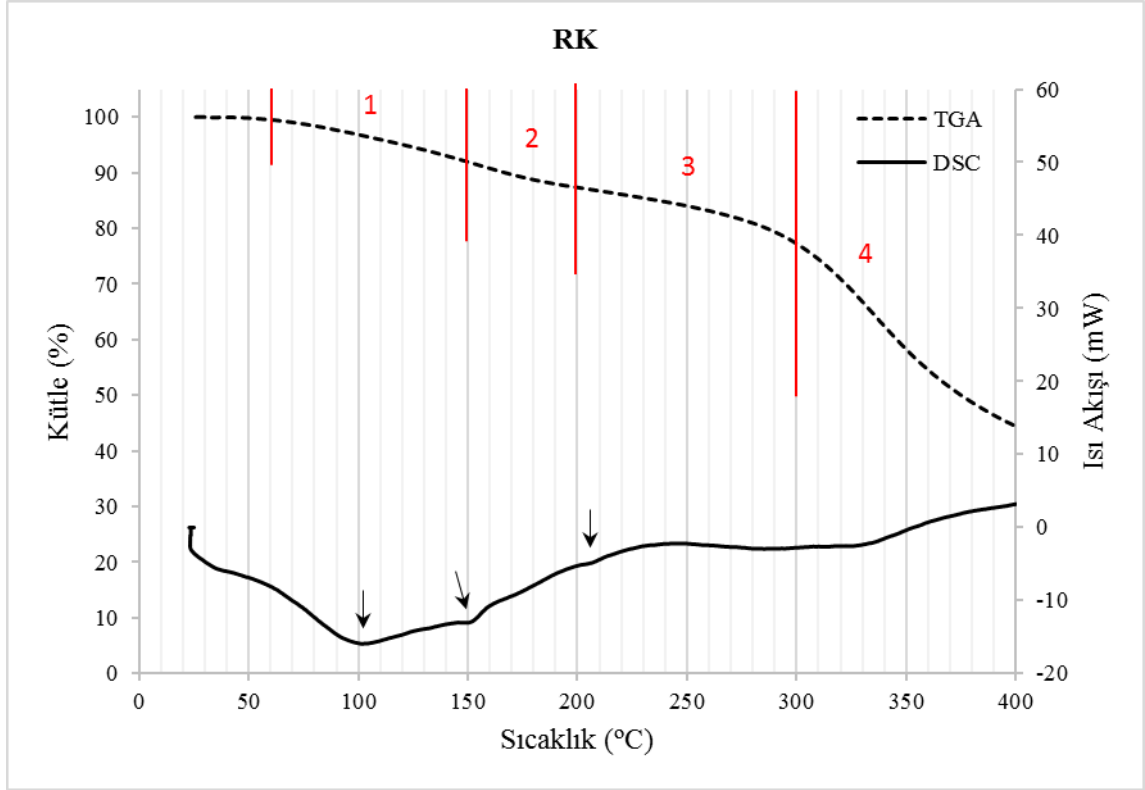
Çizelge 4.26. AK kültürünün DSC ve TGA Termogramları

DSC			TGA		
Pik	Sıcaklık aralığı (°C)	Max. pik (°C)	Bölge	Sıcaklık aralığı (°C)	Toplam Kütle Kaybı (%)
1. endotermik	55–140	107	1	55–100	8
2. endotermik	140–210	154	2	100–195	18
3. endotermik	200–220	210	3	195–300	28
4. ekzotermik	300–400	326	4	300–400	61

RK kültüründe kütle kaybı 55°C'de belirgin olarak başlamış ve 150°C'ye kadar yalnızca %8 oranında bir kütle azalması gözlenmiştir. 150–200°C aralığındaki 2. bölgede kısmen hızlanan kütle kaybı %5 olmuştur. 300°C'ye kadar toplam kütle kaybı %23 iken 400°C'de en yüksek hıza çıkmış ve %56'ya ulaşmıştır. Çizelge 4.24'den örneğin serbest suyunun tamamını yaklaşık 292°C'de kaybettiği özetlenmişti. Dolayısıyla ilk 3 bölgede kaybedilen kütle büyük oranda örneğin nem içeriği olduğu tahmin edilmektedir. Bu aradaki %2'lik kütle kaybını oluşturan fark ise benzer şekilde Maillard reaksiyonu ve laktoz kristalinden su ayrılması olarak yorumlanabilir. AK örneğinde olduğu gibi kütle en hızlı azaldığı yer 300°C'den itibaren başlayan 4. bölge olmuştur

RK kültürünün DSC eğrisi AK ile benzerlik göstermektedir. Maksimum 101°C'de gerçekleşen protein denaturasyonunu, 152°C'de gözlemlenen su desorpsiyonu ve kazein denatürasyonu, 207°C'de de laktoz kristalinden su ayrılması ve kristalin erimeye başlaması olayları takip etmiştir. Termal dekompozisyonu ise yaklaşık 335°C'den

İtibaren gözlenmeye başlamış, ancak bu ekzotermik yükseliş diğer kültürlerde görüldüğü gibi keskin bir şekilde değil, daha yavaş olarak artış göstermiştir.

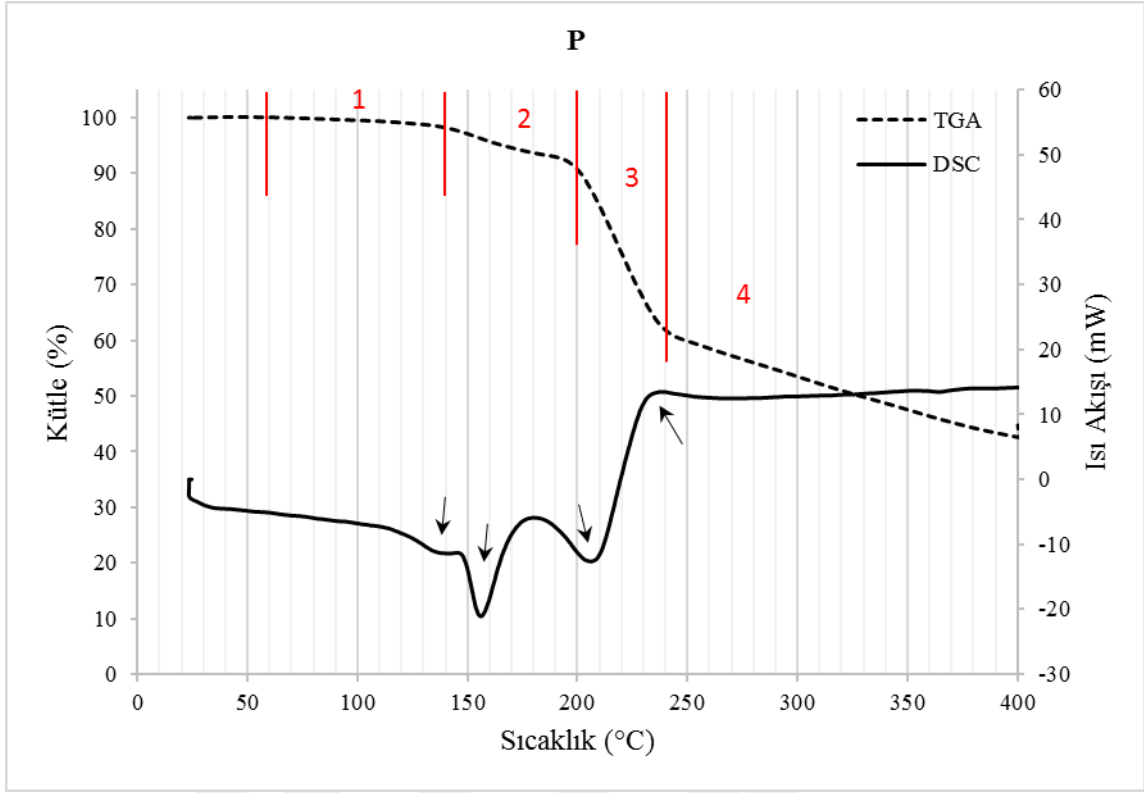


Şekil 4.36. RK kültürüne ait TGA ve DSC eğrileri

Pugliese ve ark. (2016), süt proteinlerinde peynir altı suyu proteinlerinin eşzamanlı açılma (unfolding) reaksiyonları (endotermik) ve açılan küresel peynir altı suyu proteinleri ile kazeinler arasındaki etkileşimler (ekzotermik) aynı sıcaklık aralığında üst üste binebileceğini bildirmektedir.

Çizelge 4.27. RK kültürünün DSC ve TGA Termogramları

Pik	DSC		TGA		
	Sıcaklık aralığı (°C)	Max. pik (°C)	Bölge	Sıcaklık aralığı (°C)	Toplam Kütle Kaybı (%)
1. endotermik	60–134	101	1	60–150	8
2. endotermik	145–168	152	2	150–200	13
3. endotermik	200–215	207	3	200–300	23
4. ekzotermik	335–400	–	4	300–400	56



Şekil 4.37. P kültürüne ait TGA ve DSC eğrileri

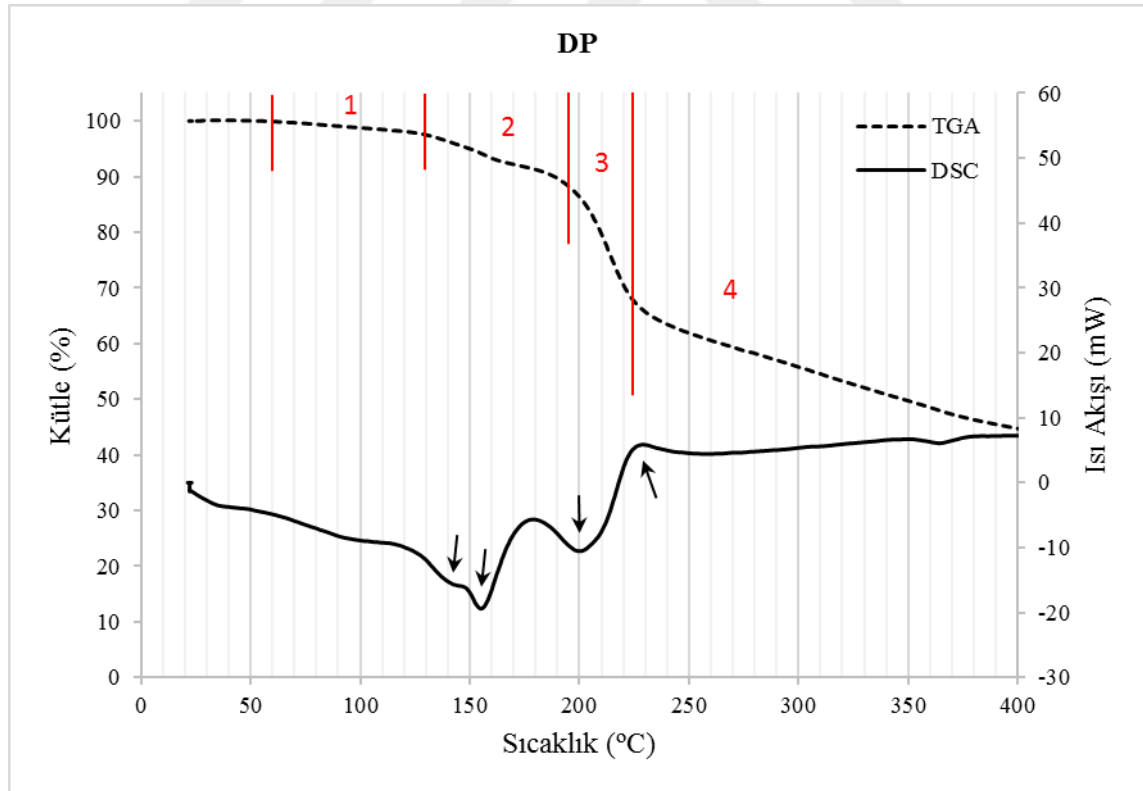
P ve DP örneklerinin hem TGA hem de DSC grafiklerinin birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Tespit edilen küçük farklılıkların, örneklerin mineral içeriklerindeki değişimden veya deneysel hata kaynaklı olduğu söylenebilir. Bu kültürlerde yaklaşık 145–150°C'ye kadar %2–3 oranında oldukça az bir kütle kaybı olduğu görülmektedir. Bunun sebebi, örneklerin sahip olduğu düşük nem içeriği olabilir. Örnekler Çizelge 4.24'te görüldüğü gibi 172–174°C'de nemini tamamen kaybetmiştir. Dolayısıyla 2. bölgede nispeten hızlanan kütle kaybının büyük oranda serbest suyun desorpsiyonu olduğu rahatlıkla söylenebilir. Daha sonrasındaki P kültürü için 200–240°C ve DP için ise 195–225°C sıcaklık aralıklarında önemli bir kütle kaybı yaşanmış ve reaksiyon çok hızlı seyretmiştir. Bu bölgede muhtemelen Maillard reaksiyonu nedeniyle oluşan su kaybindan, laktoz içeriğinin fazla olmasından dolayı ayrılan laktoz kristal suyunun daha yüksek oranda olmasından ve belki de laktozun kısmen dekompoze olmaya başlamasından kaynaklanan bir kütle kaybı gerçekleşmiş olabilir. Kültürlerdeki organik bileşenlerin dekompozisyona bağlı kütle kaybının 240 ve 225°C'den sonra gözlenmiştir ve bu reaksiyonların kontrol kültürüne benzer sıcaklıkta başlaması da dikkat çekmektedir.

P ve DP örneklerinin DSC analizinde laktoalbumin, laktoglobülin ve çeşitli peptidlerin denatürasyonunu gösteren ilk endotermik pik sırasıyla 138 ve 145°C'lerde

görülmüştür. Şekerlerin proteinlerin termal denatürasyonunu etkilediği ve termal stabilitesini arttırdığı pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Back ve ark., 1979; Bernal ve Jelen, 1985; Oshima ve Kinoshita, 2013). Bu bilgi ışığında, PAST ve DPAST ilavesinin laktoz şekeri içeriğini artırmasından dolayı denatürasyonun geciktiği düşünülmektedir. Bunun dışında diğer endotermik ve ekzotermik piklerin yaklaşık olarak tüm kültürlerde benzer olduğu görülmektedir. Yukarıda diğer kültürler için bahsedilen kimyasal değişimlerin, bu kültürlerde de oluştuğu düşünülebilir.

Çizelge 4.28. P kültürünün DSC ve TGA Termogramları

Pik	DSC		TGA		
	Sıcaklık aralığı (°C)	Max. pik (°C)	Bölge	Sıcaklık aralığı (°C)	Toplam Kütle Kaybı (%)
1. endotermik	125–145	138	1	55–145	2
2. endotermik	145–170	156	2	145–200	10
3. endotermik	190–220	206	3	200–240	39
4. ekzotermik	220–250	234	4	240–400	55



Şekil 4.38. DP kültürüne ait TGA ve DSC eğrileri

Çizelge 4.29. DP kültürünün DSC ve TGA Termogramları

Pik	DSC		TGA		
	Sıcaklık aralığı (°C)	Max. pik (°C)	Bölge	Sıcaklık aralığı (°C)	Toplam Kütle Kaybı (%)
1. endotermik	120–150	145	1	55–130	3
2. endotermik	150–170	156	2	130–195	12
3. endotermik	170–215	201	3	195–225	33
4. ekzotermik	215–250	228	4	225–400	55

Kapalı ambalajlarda ve yığın depolamada amorf laktozun kristalizasyonu, su aktivitesinde bir artışa ve esmerleşme reaksiyonları ve oksidasyon gibi en belirgin bozulma belirtilerinin hızlanmasına neden olmaktadır (Roos, 2002). Bu çalışmada üretilen kültür örneklerinde depolama sırasında meydana gelen a_w 'deki artışa ve renk değerlerindeki değişime laktoz kristalizasyonunun da etkisi olduğu söylenebilir.

Bir çalışmada, camsı veya camsı olmayan laktoz matrisine gömülmüş mikroorganizmaların farklı sıcaklık ve nem ortamlarındaki stabilitesi araştırılmıştır. Su aktivitesi ve sıcaklığın, dondurarak kurutulmuş bakterilerin inaktivasyon oranları üzerindeki etkilerinin, cam geçiş teorisi ile tam olarak açıklanamayacağı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, camsı haldeki inaktivasyon oranlarının daha düşük olduğu, camsı olmayan durumda da mikroorganizmaların inaktivasyonunun sıcaklık ve su aktivitesinden büyük ölçüde etkilendiği bulunmuştur. Mikroorganizmalar gibi karmaşık biyolojik sistemlerin depolanması sırasında bir dizi farklı inaktivasyon mekanizması ortaya çıkmaktadır ve bunların bakterileri camsı bir matrise gömmek suretiyle tamamen önlenemeyeceğini bildirmişlerdir (Higl ve ark., 2007).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada farklı fırınlardan toplanan ve laboratuvarında üretilen doğal olarak fermente edilmiş ekşi hamurların bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri ile LAB sayıları belirlenmiştir. Bu hamurlardan izole edilen *L. plantarum* bakterisinin büyüme kinetiği, biyokütle özellikleri ve hamur oluşturma yeteneği incelenmiş ve bu bakterinin farklı kriyoprotektan içeren yağsız süt ortamında liyofilize edilerek toz kültürleri elde edilmiştir. Kriyoprotektan amacıyla yağsız süt ortamına %5 oranında asit kazein, rennet kazein, PAST ve DPAST ilave edilen kültürler 5 ay boyunca +4°C'de vakumlu ve ışık geçirmeyen ambalajlarda depolanmıştır. Başlangıçta ve depolama boyunca, bu koruyucu maddelerin elde edilen kültürlerin canlılık oranına ve bazı kimyasal ve biyokimyasal özelliklerine etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Piyasadan alınan ve rafine ve tam buğday unuyla geleneksel yöntemle üretilen ekşi hamurların TTA değerleri 4.87-25.7 mL NaOH arasında bulunmuştur ve buna göre içerdikleri laktik asit miktarları ise 4.4-22.7 mL olarak hesaplanmıştır. Ekşi hamur örneklerinin pH değerlerinin 3.43-5.49 arasında değiştiği görülmüştür. Hamurların asitlik ve pH'sına, üretim yöntemi ve şartları, kullanılan unun kül miktarı ve ihtiva ettiği LAB tür ve sayısı gibi faktörler doğrudan etki etmektedir. Ekşi hamurların L^* , a^* ve b^* renk değerlerinin sırasıyla 63.04 ila 81.48, -0.69 ila 5.82 ve 13.64 ila 20.26 arasında olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, ekşi hamurların sarılık özelliklerinin baskın olduğu; üretiminde kullanılan kepek ve tam buğday ununun kırmızılığı artırdığı ve L^* değerlerini düşürdüğü görülmektedir. Genel olarak buğday ununun ve kepeğinin sahip olduğu polifenol ve karotenoid gibi renk maddelerinin, formülasyona bağlı olarak hamurların renginde farklılık yaratabilmektedir. Ekşi hamurlardaki su aktivitesi (a_w) değerinin en yüksek 0.947, en düşük 0.885 olduğu, nem içeriğinin de %41.28 ila %53.50 arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur. Hamur verimi 200 olacak şekilde laboratuvarında üretilen ekşi hamurların, ortalama %53.28 ile en yüksek su içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Ekşi hamurların toplam laktik asit bakterisi sayısı en düşük 5.52, en yüksek ise 9.45 log kob/g olarak belirlenmiştir. 9 farklı ekşi hamur örneğinin yaklaşık 8.0 log kob/g ve üzerinde LAB içerdiği tespit edilmiştir. Ekşi hamurun, sahip olduğu doğal mikrofloranın farklılık göstermesi nedeniyle, genellikle değişkenlik gösteren bir ürün

olduğu bilinmektedir. Ekşi hamurlardaki bu farklılıklar, neticede nihai ürünü ve kalitesini de etkilemektedir. Bu çalışmada ekşi hamurların hammadde bileşimine ve oranına, üretim koşullarına, fermantasyon süre ve sıcaklığına, içerdiği LAB türlerine ve sayısına göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.

Tüm ekşi hamur örneklerinde sayımı yapılan LAB'nden morfolojik olarak farklı görünümüne sahip olan toplamda 79 LAB kolonisi içerisinde 47 koloninin Gram pozitif, katalaz negatif veya basil şeklinde olduğu belirlenmiştir. Seçilen bu koloniler yeterince saflaştırıldıktan sonra OD₆₀₀ değerleri ölçülmüştür. Daha sonra DNA'ları ekstrakte edilerek RAPD-PCR ile çoğaltılmış ve 16S rRNA gen sekans analizi yaptırılarak bakteriyel tanımlaması gerçekleştirilmiştir. OD₆₀₀ değeri en düşük 0.304, en yüksek 2.574 olarak okunmuştur. 44 koloninin OD₆₀₀ değerinin >1.0, 12 koloninin ise >2.0 olduğu tespit edilmiştir. OD₆₀₀ ölçüm sonuçlarına göre, izole edilen suşların büyük bir çoğunluğu oldukça yüksek canlılık ve üreme kabiliyeti göstermiştir. 16S rRNA gen sekanslama sonuçlarına göre *L. plantarum* olduğu tespit edilen suşlar arasından en yüksek hücre sayısına sahip olan ve en yüksek OD₆₀₀ değeri veren suş seçilerek, hem büyüme kinetiği ve biyokütle özellikleri araştırılmış, hem de dondurarak kurutma prosesinde kullanılarak toz kültürleri elde edilmiştir.

MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 28 saat boyunca takip edilen *L. plantarum* gelişimini; yaklaşık 3–4 saatlik bir lag (gecikme) fazı, ardından 18 saat süren ekspanansiyel (logaritmik) faz ve daha sonra da 4 saat süren durağan (stasyoner) faz takip etmiştir. Bakteri spesifik büyüme hızı μ_{max} 0.551 sa⁻¹ olarak, ikilenme (jenerasyon) süresi ise 1.26 sa (~76 dk) olarak hesaplanmıştır. *L. plantarum*'un yaklaşık 10 sa süren toplam logaritmik faz süresi boyunca 8 jenerasyon oluşturduğu ve durağan faza ulaştığında bakteri sayısındaki maksimum artışın 2.9 log₁₀ kob/mL olduğu görülmüştür. 24–28 saatlik inkübasyon sonunda *L. plantarum* tarafından üretilen toplam biyokütle ortalama 9.19 g/L olarak belirlenmiştir. Buna göre, 20 saatlik kültürasyon için biyokütle üretkenliği (φ) 0.460 g/L·sa olarak, yalnızca logaritmik büyüme fazındaki maksimum özgül üretkenlik ise 1.080 g/L·sa olarak hesaplanmıştır. Mikroorganizmaların logaritmik büyüme hızları, besin konsantrasyonu, pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu ve hücreler tarafından üretilen metabolitler gibi faktörlere bağlı olmasından ötürü, şartların değişmesi ile farklılık gösterecektir. *L. plantarum* için elde edilen bu sonuçlar, standart bir MRS ortamında elde edilmiş olup, kültürasyon şartlarında yapılacak değişiklikler ile planlanacak yeni çalışmalarda farklı kinetik modellerin oluşturulması için referans olabilecektir.

L. plantarum biyokütle $D_{3,2}$ (yüzey alanı ortalama çapı) ve $D_{4,3}$ (hacim ortalama çapı) değerleri sırasıyla 2.48 ve 4.38 μm olarak bulunmuştur. Literatüre bakılarak $D_{4,3}$ değerinin *L. plantarum* hücre boyutunun belirlenmesinde daha uygun sonuçlar verdiği görülmüştür. Partikül boyutu dağılımı sonuçlarından D_{50} değeri 4.36 μm , D_{90} değeri 9.01 μm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar literatürde bildirilen *L. plantarum* hücre boyutları ile uyumludur. Dolayısıyla lazer kırınımı yöntemiyle parçacık boyutunun analiz edilerek ortalama hücre büyüklüğünü belirlemenin mümkün olduğu ve bu yöntem, kullanım kolaylığı sağlayacağı düşünülerek önerilebilir. Ancak, bu yöntemin farklı mikroorganizmalar ile test edilmesi ve diğer hücre boyutu belirleme yöntemleriyle karşılaştırılarak doğrulanması gerekmektedir. Farklı olarak, hücre boyutu SEM görüntülerinden de faydalanılarak belirlenebilmektedir. Bu çalışmada, kurutulmuş *L. plantarum* biyokütlesinden elde edilen hücre boyutu ortalama 1.685 μm olarak ölçülmüştür. Biyokütlerdeki bakteri kuru madde oranının, kuru hücre boyutlarının normal hücre boyutlarına oranı ile benzediği tespit edilmiştir.

Buğday unundan *L. plantarum* ile hamurlar oluşturularak 30°C ve %80 bağıl nem ortamında 1, 15, 20 ve 25 saat boyunca fermente edilmiştir. Belirtilen fermentasyon sürelerinde hamurların asitliğinde, LAB sayısında, renk değerlerinde, işleme özelliklerinde ve hacminde oluşan değişimler takip edilmiştir. Başlangıç hamur pH'sı 6.24 iken, 15. saatin sonunda 4'ün altına düşmüştür. Sonrasında da pH'da önemli bir değişiklik olmamıştır. Hamurun TTA değeri 15 saatte 2.0 ml'den 10 ml NaOH'e yükselmiş ve 25. saatin sonunda ise 11.8 mL NaOH olarak belirlenmiştir. LAB hücre sayılarının, 25 saatlik fermentasyonun sonunda toplamda 1 \log_{10} kob/g arttığı görülmüştür. Bu çalışma ile 15 saatlik bir fermentasyonun, hem asitlik gelişimi hem de bakteriyel gelişme açısından önemli bir süre olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, tip II yöntemi kullanılarak *L. plantarum* kullanarak fermente edilen ekşi hamurlarda fermentasyon süresinin minimum 15 saat olması tavsiye edilmektedir.

L. plantarum fermentasyonunun genel olarak hamurun rengini etkilemediği, L^* , a^* ve ΔE^* değerlerinde bir fark yaratmadığı, yalnızca b^* değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0.05$) olduğu gözlenmiştir. Bu artışın nedeni olarak, mikrobiyal aktiviteler ve asitlik gelişimi sonucunda buğday unu içerisindeki karotenoidlerin etkilendiği düşünülmektedir.

Hamur hacmindeki artış 15 saatlik fermentasyonda %8.2, 20. saatte ise %10.3 olarak belirlenmiştir. 20-25. saatler arasında ise herhangi bir artış gözlenmemiştir. *L.*

plantarum'un doğrudan gaz üretme yeteneğinin olmaması ve hamurlardaki baskın mikroorganizma olması nedeniyle hacim artışının düşük olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada, *L. plantarum* katkılı hamurlarda fermentasyon süresinin artmasıyla yapışkanlık, adezyon işi ve iç yapışkanlık (hamur mukavemeti) değerlerinin arttığı görülmüştür. Fermentasyon sırasında artan asitlikle birlikte daha kohezif ve yapışkan hamur oluşumu tespit edilmiştir. Yapışkan hamurun işlenmesi teknolojik açıdan pek çok sorun oluştursa da, küçük ölçeklerde işlenerek ve hamurun temas ettiği yüzeylerde yağ veya un kullanılarak bu durumun üstesinden gelmek mümkün olmaktadır. Aynı zamanda mukavemeti yüksek hamurların ekmek kalitesini olumlu yönde etkilediği bilinmektedir.

Bu çalışmada kültürlerin liyofilizasyonunda temel koruyucu ortam olarak %10 (a/h) kuru maddeli yağsız süt kullanılmıştır. Bu yağsız süt ortamına kriyojenik madde olarak %5 (a/h) oranında asit kazein, rennet kazein, peynir altı suyu tozu ve %50 oranında demineralize edilmiş peyniraltı altı suyu kullanılmıştır. Dondurarak kurutulan kültürler, +4°C'de vakum altında ışık geçirmeyen ambalajlarda 150 gün boyunca saklanmış ve kültürlerin başlangıçta ve depolama boyunca canlı hücre sayıları ile bazı biyokimyasal ve fiziksel özellikleri belirlenmiştir. Liyofilizasyon işleminden hemen sonra yapılan canlılık sayımı sonucunda, rennet kazein içeren kültür hariç, diğer tüm kültürlerin, dondurarak kurutma prosesinde 1.16 ve 1.92 log kob/mL arasında değişen canlılık kaybı ile iyi bir koruyucu etki gösterdiği görülmüştür. En düşük canlılık kaybı kontrol kültüründe görülmüştür. Bu sonuçlar, kullanılan kriyoprotektif maddelerin, liyofilizasyon işlemine karşı koruyucu özelliğinin olmadığını ve tüm koruyucu etkinin yağsız süt ortamından kaynaklandığı düşündürmüştür. Rennet kazein içeren örnekte oldukça büyük bir canlılık kaybı olduğu görülmüştür. Rennet kazein ilavesinin yarattığı 6.27 log kob/mL oranındaki bu kayıp nedeniyle, kültür koruma yöntemi olarak tercih edilebilmesi mümkün görünmemektedir.

Kültürlerin depolama süresince canlılık oranlarında belirgin bir azalma olduğu görülmüştür. Canlılıktaki en belirgin düşüş, ilk 30 günlük depolama süresinde yaşanmıştır. Bu süre içerisinde en büyük canlılık kaybı 1.44 log kob/g olmak üzere kontrol örneğinde gözlemlenirken, bunu 0.58 ve 0.41 log kob/g ile sırasıyla RK ve AK örnekleri takip etmiştir. P ve DP kültürlerinin canlılığında ise yalnızca ortalama 0.3 log kob/g bir azalma tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan kriyoprotektif ajanların koruyucu etkinliği, 30 günlük bir depolama sonrasında bile bariz bir şekilde görülmüştür. 150 günlük depolama boyunca canlılıktaki en önemli azalma 3.5 log kob/g ile yine kontrol örneğinde belirlenmiştir. AK kültüründe 2 log kob/g bir düşüş olurken, RK, P ve DP

örneklerindeki canlılık kayıpları ise 1.43–1.74 log kob/g arasında kalmıştır. 120 günlük depolama periyodunda AK kültüründeki canlılığının oldukça başarılı bir şekilde korunduğu, ancak 120–150 gün arasında oldukça önemli bir kayba uğradığı tespit edilmiştir. AK kültürünün sahip olduğu yüksek nem içeriğinin, kültürün biyokimyasal olarak bozulmasına neden olarak canlılık kaybına yol açtığı tahmin edilmektedir.

Genel durum göz önüne alındığında, asit kazein kullanımının kültür koruma yöntemi olarak oldukça başarılı olduğu, kültürün başlangıç nem miktarının düşük tutularak kontrol altına alınmasıyla çok daha başarılı bir koruma sağlanabileceği düşünülmektedir. Büyük miktarlarda üretilen kültürlerin uzun süreli muhafazasında, en uygun koruyucu ajanların PAST ve DPAST olduğu görülmektedir. Dolayısıyla hem elde edilen kültür yapısı ve formu, hem de canlılığı korumadaki performansı nedeniyle PAST ve DPAST'ın kültür koruma yöntemlerinde koruyucu olarak kullanımı önerilmektedir.

Çalışmada kullanılan kriyoprotektif ajanların kurutma etkinliklerinin belirlenerek liyofilizasyon işlemine uygunluğu tespit edilmiştir. Uygulanan sabit liyofilizasyon süresinin, kültürlerin nem içeriklerine doğrudan etkilediği dolayısıyla her bir koruyucu maddenin kuruma etkinliğinin farklı olduğu görülmüştür. En uygun ve yeterli kurumayı sırasıyla %5.80 ve %8.06 nem içeriği ile P ve DP kültürleri göstermiştir. Kontrol, AK ve RK örneklerinin nem içeriği ise sırasıyla %16.14, %34.41 ve %23.03 olmak üzere oldukça yüksek kalmıştır. Başlangıç nem miktarları yüksek olan bu örneklerin su içerikleri depolama boyunca değişmezken, daha kuru olan P ve DP örneklerinin ise giderek nem miktarlarında artış gözlenmiştir. Bu artışın, kültürleri saklamak amacıyla kullanılan ambalajların nem bariyerinin zayıflaması nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Kazein içeren örneklerin, en yüksek nem değerlerine sahip olduğu, bilhassa da AK örneğinin oldukça yüksek su içerdiği belirlenmiştir. Rennet kazeinin oluşturduğu jellerin nispeten daha büyük gözeneklere sahip olması, daha fazla buzun süblime olmasına neden olarak, RK örneğinin AK örneğine kıyasla daha kolay kurumasında etkili olmuş olabilir. Genel olarak kazein molekülünün oluşturduğu protein ağ yapısı içerisinde hapsolan suyun, kuruma sırasında daha zor uzaklaşması nedeniyle bu örneklerin kuruma etkinliğinin oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun, özellikle dondurarak kurutma prosesiyle büyük miktarlarda kültür üretimi söz konusu olduğunda problem yaratacağı düşünülmektedir. Bu nedenle koruyucu ajan olarak kazeinlerin kullanılması halinde dondurarak kurutma prosesine girecek kültür miktarının azaltılması ve kurutma süresinin de uzatılması zorunlu bir uygulama olarak görülmektedir.

Liyofilize kültürler içinde en düşük su aktivite değerlerinin ortalama 0.515 ve 0.513 ile sırasıyla P ve DP örneklerine ait olduğu belirlenmiştir. En yüksek su aktivite değerine ise kazein ilave edilen örneklerde rastlanmış olup, bu kültürlerin depolama süresince su aktivite değerlerinin değişmediği görülmüştür. Kontrol örneğinin 30. gün depolama sonunda su aktivitesi belirgin olarak artmış, ancak sonraki depolama periyodunda tekrar değişmediği tespit edilmiştir. Su aktivite değerleri depolama sürecinden en fazla etkilenen örnekler, başlangıç su aktivitesi en düşük olan P ve DP kültürleri olmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen kültürlerin su aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Kültürlerin canlılığının ilk 30 günde önemli ölçüde azalmasına, depolama sırasındaki yüksek su aktivitesi (a_w) nedeniyle suyun sürekli yer değiştirmesiyle bağlantılı olabilir. Ancak bu olumsuz etkinin, kullanılan kriyoprotektanların desteği ile depolamanın devamında oldukça azaldığı görülmüştür.

Kültürler, %75 bağıl nem içeren ortamda 7 gün bekletilerek su sorpsiyon özellikleri belirlenmiştir. Su içeriği yüksek olan kontrol, AK ve RK örnekleri bu nemli ortamda desopsiyona uğramış, nispeten daha düşük nem içeriğine sahip P ve DP örnekleri ise su absorbe etmiştir. Depolama sırasında AK ve RK örneklerinin, tıpkı nem ve su aktivitesi değerleri gibi sorpsiyon özelliklerinin de değişmediği görülmüştür. Buna göre, AK kültürünün canlılığın korunmasındaki başarısı, depolama süresince su sorpsiyon davranışının değişmemesi olarak yorumlanabilir.

Kültür ortamına ilave edilen koruyucu maddelerin -her ne kadar %5 oranında olsa bile- kültürlerin renkleri üzerinde de etkili olduğu görülmektedir. Kazein ilavesinin L^* değerini düşürerek kültür rengini koyulaştırdığı ve a^* değerini yükselterek kırmızılığını artırdığı görülmüştür. P ve DP örneklerinin en yüksek L^* değerine ve en düşük a^* değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Kazein ilavesi kültürlerin kırmızılığını, PAST ilavesi ise yeşilliğini artırmıştır. Kontrol örneğinin L^* , a^* ve b^* değerleri, bu 2 grup koruyucu madde içeren kültürlerin arasında bir değer almıştır. En düşük b^* değerleri AK örneğinde, en yüksek ise DP örneğinde bulunmuştur. Depolama boyunca da kültürlerin renklerinde bir takım değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. Toplam renk farkı kontrol örneğinde 150 günlük depolama sonunda, P örneği için ise 60 gün ve sonrasında insan gözüyle fark edilir duruma gelmiştir. AK örneğinin ΔE^* değeri yalnızca 30. günde 3.25 iken, sonraki depolama sürelerinde 3'ün altında olduğu gözlenmiştir. RK ve DP örneklerinde tüm depolama sürelerinde toplam renk farkının oldukça yüksek olduğu, bilhassa da RK örneğinde açıkça görülmektedir. Liyofilizasyon ve/veya depolama sırasında meydana gelen renk değişimlerinin altında yatan en büyük nedenin, Maillard

reaksiyonu olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda kültürlerin su içeriklerinin de renk değerleri üzerinde etkili olduğu tahmin edilmektedir.

Kullanılan koruyucu maddelerin parçacık büyüğüne ve boyut dağılımına da etkisi olduğu görülmektedir. Toz kültürlerin partikül büyüklüklerinde görülen bu farklılıkların, kültürlerin bileşimlerinden ve nem içeriklerinden kaynaklanması muhtemeldir. En büyük parçacık boyutu ve en düşük üniformluk kazein ilave edilen örneklerde (AK ve RK), en küçük parçacık boyutu ve en yüksek üniformluk ise PAST ilave edilen (P ve DP) kültürlerde ölçülmüştür. P ve DP kültürlerinin büyüklük ve boyut dağılımları arasında fark gözlenmezken ($p>0.05$) diğer kültürlerin birbirinden farklı boyut ve dağılımda olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Örneklerin nem içeriğiyle partikül boyutlarının da paralellik gösterdiği ve en yüksek nem içeriğine sahip olan AK kültürünün, yine en yüksek parçacık boyutuna sahip olduğu bulunmuştur. Bunu sırasıyla RK, kontrol ve peynir altı suyu tozu ilaveli kültürler takip etmiştir. Genel olarak kültürlerin depolama ile partikül boyutlarının arttığı, toz üniformluğunun da azaldığı tespit edilmiştir.

Kontrol örneğinin SEM görüntülerinde çok daha düzgün yüzeye sahip olması dikkat çekmiştir. AK ve RK kültürlerinin toz yapıları birbirine benzemekle beraber, RK örneğinin yüzey görüntüsü daha fazla ve küçük boyutta kırık yapılarından oluşmuştur. RK kültürünün sahip olduğu çok sayıdaki sıkışık gözeneklerden oluşan bu sert ve keskin hatlı yapı form, liyofilizasyon işlemi sırasında meydana gelen bakteri canlılığı kaybının nedenlerinden biri olduğu tahmin edilmektedir. Kazein koruyucu maddelerinin depolama esnasında canlılığı korumadaki yüksek performansı, oluşturdukları bu yapıların dayanıklılığından ve madde/su migrasyonunu minimize etmesinden kaynaklanıyor olabilir. P kültür tozunun yüzeyinde çökelti, DP kültüründe ise yükselti oluşumu daha fazla gözlenmiştir. Genel olarak bu kültürler daha çok kontrol örneğini andırmakta, ancak yüzeyde daha fazla kırık yapının olduğu görülmüştür. Kontrol örneğine göre gözenekli olan bu yapıların, depolama sırasındaki canlılığı korumada olumlu etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Farklı kriyojenik madde kullanımı, kültürlerin TGA ve DSC eğrilerinde de farklılık yaratmıştır. Kültürlerin TGA eğrilerindeki azalma, 3 veya 4 bölgeye ayrı bölgeden oluşmuştur. İlk iki bölgedeki azalma büyük oranda sistemdeki suyun kaybını göstermektedir. 2. kısımda ise Maillard reaksiyonu sırasında oluşan su kaybının eklenmesi ile hızlanan bi kütle kaybı görülmüştür. Yaklaşık 200°C civarında başlayan 3. bölgede laktozun kristal kafesinden de suyun ayrıldığı ve laktozun erimesi sonucunda

termotahribatının başladığı düşünülmektedir. 4 bölgedeki azalma, laktoz ve proteinlerin dekompozisyonu ile karbonlu materyalin yok olması olarak yorumlanmıştır.

Kültürlerin DSC eğrilerinde belirgin olarak 3 endotermik, 1 ekzotermik pik gözlenmiş olup, yaklaşık 100°C dolaylarında gerçekleşen ilk endotermik pikin, peptit, polipeptit ve globulin peptitleri gibi spesifik süt proteinlerinin denatürasyonu olduğu tahmin edilmektedir. 150°C etrafındaki 2. pikin ise su buharı desorpsiyonundan kaynaklandığı varsayılmıştır. 150–200°C arasında Maillard reaksiyonuna ait bir ekzotermik pik olabileceği ancak bunun diğer pikler arasında kalarak baskılanmış olabileceği düşünülmektedir. 200°C civarındaki 3. endotermik pik, laktozun kristal kafesine bağlı hidrasyon suyunun ayrılarak laktozun erimeye başlaması olarak yorumlanmıştır. Son olarak 200–250°C'nin (AK; 325°C) üzerinde DSC eğrilerinin ekzotermik bölgeye yükseldiği, bunun da bu yüksek sıcaklıklardan itibaren kimyasal bozunmaların başlamasının ve polimer omurgasının dekompoze olmasının neden olduğu yönünde tahmin yürütülmüştür.

5.2. Öneriler

Teknolojik önemi oldukça fazla olan ve starter olarak kullanılan *L. plantarum* bakterisini, çok yönlü olarak araştırmak hem bilime hem de gıda endüstrisine katkı sağlayacaktır. Büyüme kinetiğinin ve biyokütle oluşturma yeteneğinin incelenmesiyle, bakterinin kullanım alanlarının belirlenmesi ve gıda içerisindeki etki mekanizmasının anlaşılabilir optimum fayda sağlayacak koşulların oluşturulması yönünde değerli bilgiler elde edilecektir. Bu çalışmadan da görülebileceği gibi, *L. plantarum*'un yüksek büyüme hızı ve biyokütle üretenliğine sahip olması ve hamur teknolojilerine sağlayacağı katkılar, bu bakterinin önemini daha da artırmaktadır. Bu noktada, starter kültürlerin uzun süreli muhafazası önem arz etmektedir. Gıda endüstrisi kültürlerin, ekonomik, kolay kullanıma sahip ve stabil olmasını tercih etmektedir. Bu amaçla, bu çalışmada *L. plantarum*'un gıda endüstrisi yan ürünlerinden faydalanılarak toz kültürleri üretilmiş ve stabiliteyi araştırılmıştır. Rennet kazein dışında, diğer koruyucu ortamlar ile oluşturulan kültürler başarılı bulunmuştur. Yağsız sütün kriyoprotektif özelliklerinin, kullanılan koruyucu maddelerle oldukça fazla geliştiği sonucuna net bir şekilde varılmıştır. Çalışmada elde edilen kültürlerdeki en büyük problem ise, ekonomik hale getirmek amacıyla büyük miktarlarda dondurarak kurutulan örneklerde, etkin bir kuruma sağlanamamasıdır. Bu nedenle daha küçük miktarlarda ve daha uzun sürelerde

liyofilizasyon işleminin uygulanması önerilmektedir. Sonuç olarak, starter kültürlerin derinlemesine araştırılması, yeni ve işlevsel ürünlerde kullanılacak tipik mikrobiyal floranın seçilmesinde belirleyici olacaktır. Bu kültürlerin stabilitesinin korunarak uzun süreli muhafazasını ve kullanımını kolaylaştıracak yöntemlerin geliştirilmesi, modern gıda endüstrisinin ihtiyaçlarını karşılamak için çok önemli bir adımdır.



6. KAYNAKLAR

- AACC. 1999. Method 10-09.01. Basic straight-Dough bread-Baking method—Long fermentation. 11th Ed. Cereals & Grains Association. St. Paul, MN, U.S.A. .
- Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., Sanni, A. I. and Banwo, K., 2018. Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage. *PeerJ*, 6, e5326. doi:10.7717/peerj.5326
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C. D. and Stapley, A. G. F., 2010. Spray-freeze-drying of whey proteins at sub-atmospheric pressures. *Dairy Science & Technology*, 90 (2), 321-334. doi:10.1051/dst/2010013
- Anonim. 2015. *A basic guide to particle characterization-WP120620*. Malvern Instruments. Malvern Instruments Ltd. Malvern, U.K.
- Anonim. 2020a. How to measure cohesiveness. Access Date: 15.03.2020. Retrieved from <https://www.stablemicrosystems.com/measurecohesiveness.html>
- Anonim. 2020b. How to measure stickiness/adhesiveness. Access Date: 15.03.2020. Retrieved from <https://www.stablemicrosystems.com/measurestickiness.html>
- Anonim. 2020c. Lysine. In *Encyclopædia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/lysine>: Encyclopædia Britannica, Inc.
- Anonim. 2020d. Milk proteins. *Food-Info Foundation*. Access Date: 11.04.2020. Retrieved from <http://www.food-info.net/uk/protein/milk.htm>
- Antheunisse, J., 1973. Viability of lyophilized microorganisms after storage. *Antonie van Leeuwenhoek*, 39 (1), 243-248. doi:10.1007/BF02578856
- Antognoni, F., Mandrioli, R., Potente, G., Taneyo Saa, D. L. and Gianotti, A., 2019. Changes in carotenoids, phenolic acids and antioxidant capacity in bread wheat doughs fermented with different lactic acid bacteria strains. *Food Chemistry*, 292, 211-216. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.061
- Arendt, E. K., Ryan, L. A. M. and Dal Bello, F., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol*, 24 (2), 165-174. doi:https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.011
- Armero, E. and Collar, C., 1997. Texture properties of formulated wheat doughs: Relationships with dough and bread technological quality. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-forschung*, 204 (2), 136-145.
- Aryana, K. J. and McGrew, P., 2007. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *LWT-Food Science and Technology*, 40 (10), 1808-1814. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.008
- Augustin, M. A., Clarke, P. T. and Craven, H., 2003. POWDERED MILK | Characteristics of Milk Powders. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food*

Sciences and Nutrition (Second Edition) (pp. 4703-4711). Oxford: Academic Press.

- Augustin, M. A. and Margetts, C. L., 2003. POWDERED MILK | Milk Powders in the Marketplace. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 4694-4702). Oxford: Academic Press.
- Back, J. F., Oakenfull, D. and Smith, M. B., 1979. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry*, 18 (23), 5191-5196. doi:10.1021/bi00590a025
- Bakhit, R. M. and Schmidt, S. J., 1992. Sorption behavior of mechanically mixed and freeze-dried NaCl/casein mixtures. *Journal of Food Science*, 57 (2), 493-496. doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb05524.x
- Berlin, E., Kliman, P. G. and Pallansch, M. J., 1971. Calorimetry and thermogravimetry of bound water in dried milk and whey powders. *Journal of Dairy Science*, 54 (3), 300-305. doi:https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(71)85833-2
- Bernal, V. and Jelen, P., 1985. Thermal stability of whey proteins – A calorimetric study. *Journal of Dairy Science*, 68 (11), 2847-2852. doi:https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81177-2
- Bhandari, B. R. and Howes, T., 1999. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, 40 (1), 71-79. doi:https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00039-4
- Biliaderis, C. G., Lazaridou, A., Mavropoulos, A. and Barbayiannis, N., 2002. Water plasticization effects on crystallization behavior of lactose in a co-lyophilized amorphous polysaccharide matrix and its relevance to the glass transition. *International Journal of Food Properties*, 5 (2), 463-482. doi:10.1081/JFP-120005798
- Bolla, P. A., Serradell Mde, L., de Urraza, P. J. and De Antoni, G. L., 2011. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *J Dairy Res*, 78 (1), 15-22. doi:10.1017/s0022029910000610
- Bozoğlu, T. F., Özilgen, M. and Bakir, U., 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology*, 9 (9), 531-537. doi:https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90082-2
- Bratbak, G. and Dundas, I., 1984. Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Appl Environ Microbiol*, 48 (4), 755-757.
- Brittain, H. G., Bogdanowich, S. J., Bugay, D. E., DeVincentis, J., Lewen, G. and Newman, A. W., 1991. Lactose, anhydrous. In K. Florey (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances* (Vol. 20, pp. 369-398): Academic Press.
- Buchheim, W., 1982. Aspects of sample preparation for freeze-fracture/freezetch studies of proteins and lipids in food systems. A review. *Food Structure*, 1, 189-208

- Burin, L., Jouppila, K., Roos, Y., Kansikas, J. and Buera, M. P., 2000. Color formation in dehydrated modified whey powder systems as affected by compression and T(g). *J Agric Food Chem*, 48 (11), 5263-5268. doi:10.1021/jf000240y
- Burns, P., Vinderola, G., Molinari, F. and Reinheimer, J., 2008. Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic lactobacilli. *International Journal of Dairy Technology*, 61 (2), 156-164. doi:10.1111/j.1471-0307.2008.00393.x
- Cardoso, J. C., Albuquerque, R. L. C., Padilha, F. F., Bittencourt, F. O., de Freitas, O., Nunes, P. S., Pereira, N. L., Fonseca, M. J. V. and Araújo, A. A. S., 2011. Effect of the Maillard reaction on properties of casein and casein films. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 104 (1), 249-254. doi:10.1007/s10973-010-1044-x
- Carvalho, A., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. and Gibbs, P., 2003. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Lait*, 83, 203-210. doi:10.1051/lait:2003010
- Castro, H. P., Teixeira, P. M. and Kirby, R., 1995. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44 (1), 172-176. doi:10.1007/BF00164498
- Cevoli, C., Gianotti, A., Troncoso, R. and Fabbri, A., 2015. Quality evaluation by physical tests of a traditional Italian flat bread Piadina during storage and shelf-life improvement with sourdough and enzymes. *European Food Research and Technology*, 240 (6), 1081-1089. doi:10.1007/s00217-015-2429-7
- Champagne, C., Gardner, N., Brochu, E. and Beaulieu, Y., 1991. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24 (3-4), 118-128. Retrieved from <https://eurekamag.com/research/002/250/002250734.php>
- Chandan, R. C., 2006. Functional properties of milk constituents. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of Food Products Manufacturing* (pp. 971-987).
- Chavan, R. S. and Chavan, S. R., 2011. Sourdough technology—A traditional way for wholesome foods: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10 (3), 169-182. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x
- Chen, W. and Hang, F., 2019. Lactic acid bacteria starter. In W. Chen (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Bioengineering and Industrial Applications* (1st ed.). Singapore: Springer.
- Chen, W. Z. and Hosney, R. C., 1995. Wheat flour compound that produces sticky dough: Isolation and identification. *Journal of Food Science*, 60 (3), 434-437. doi:10.1111/j.1365-2621.1995.tb09797.x
- Clementi, F. and Rossi, J., 1984a. Effect of drying and storage conditions on survival of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35 (3), 183-186. Retrieved from <https://www.ajevonline.org/content/ajev/35/3/183.full.pdf>

- Clementi, F. and Rossi, J., 1984b. Effect of drying and storage conditions on survival of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35 (3), 183-186. Retrieved from <https://www.ajevonline.org/content/ajev/35/3/183.full.pdf>
- Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., Nickerson, C. A. and Schurr, M. J., 2008. Skim milk enhances the preservation of thawed -80°C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, 75 (1), 135-138. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.006>
- Collar, C., Andreu, P. and Martínez-Anaya, M. A., 1998. Interactive effects of flour, starter and enzyme on bread dough machinability. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung*, 207 (2), 133-139. doi:[10.1007/s002170050307](https://doi.org/10.1007/s002170050307)
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D. and Khutoryanskiy, V. V., 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162 (1), 56-67. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>
- Corsetti, A., 2013. Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. In M. Gobbetti and M. Gänzle (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (1st ed., pp. 85-103). US: Springer.
- Corsetti, A., Ciarrocchi, A. and Prete, R., 2016. Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. In *Reference Module in Food Science*: Elsevier.
- Corsetti, A. and Settanni, L., 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40 (5), 539-558. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.001>
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Garcia, N. and Viñas, I., 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 89 (5), 793-800. doi:[10.1046/j.1365-2672.2000.01182.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01182.x)
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Torres, R. and Viñas, I., 2002. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology*, 92 (5), 873-878. doi:[10.1046/j.1365-2672.2002.01596.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01596.x)
- Dar, B. N., Sharma, S., Singh, B. and Kaur, G., 2014. Quality assessment and physicochemical characteristics of bran enriched Chapattis. *International Journal of Food Science*, 2014, 689729. doi:[10.1155/2014/689729](https://doi.org/10.1155/2014/689729)
- Darby, T. M. and Jones, R. M., 2017. Chapter 10 - Beneficial Influences of *Lactobacillus plantarum* on Human Health and Disease. In M. H. Floch, Y. Ringel and W. Allan Walker (Eds.), *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* (pp. 109-117). Boston: Academic Press.
- Dattatreya, A. and Rankin, S. A., 2006. Moderately acidic pH potentiates browning of sweet whey powder. *International Dairy Journal*, 16 (7), 822-828. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.07.006>

- De Giulio, B., Orlando, P., Barba, G., Coppola, R., De Rosa, M., Sada, A., De Prisco, P. P. and Nazzaro, F., 2005. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (5), 739-746. doi:10.1007/s11274-004-4735-2
- De Vuyst, L. and Neysens, P., 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1), 43-56. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012
- Decock, P. and Cappelle, S., 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1), 113-120. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.04.012
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T. and Sağdıç, O., 2016. Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 116-124. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.030
- Deveci, H., 2004. Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors. *Hydrometallurgy*, 71 (3), 385-396. doi:https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00112-9
- Dias, C. O., dos Santos Opuski de Almeida, J., Pinto, S. S., de Oliveira Santana, F. C., Verruck, S., Müller, C. M. O., Prudêncio, E. S. and de Mello Castanho Amboni, R. D., 2018. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. *Food Bioscience*, 24, 26-36. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.05.006
- Dobraszczyk, B. J., 1997. The rheological basis of dough stickiness. *Journal of Texture Studies*, 28 (2), 139-162. doi:10.1111/j.1745-4603.1997.tb00108.x
- Dolly, P., Anishparvin, A., Joseph, G. S. and Anandharamakrishnan, C., 2011. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (mtcc 5422) by spray-freeze-drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *J Microencapsul*, 28 (6), 568-574. doi:10.3109/02652048.2011.599435
- Doyle, M. P., Steenson, L. R. and Meng, J., 2013. Bacteria in food and beverage production. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt and F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology* (pp. 241-256). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Dumont, F., Marechal, P.-A. and Gervais, P., 2004. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Applied and environmental microbiology*, 70 (1), 268-272. doi:10.1128/aem.70.1.268-272.2004
- Early, R., 2012. 17 - Dairy products and milk-based food ingredients. In D. Baines and R. Seal (Eds.), *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings* (pp. 417-445): Woodhead Publishing.

- Egli, T., 2009. Growth kinetics, bacterial. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 180-193). Oxford: Elsevier.
- Elmonsef Omar, A. M. and Roos, Y. H., 2007. Glass transition and crystallization behaviour of freeze-dried lactose–salt mixtures. *LWT-Food Science and Technology*, 40 (3), 536-543. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.12.007>
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., Bringel, F., Hubert, J. C. and Hasselmann, C., 1996. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Applied and environmental microbiology*, 62 (12), 4381-4387. Retrieved from <https://aem.asm.org/content/aem/62/12/4381.full.pdf>
- Everett, D. W. and Auty, M. A. E., 2017. Chapter 21 - Cheese microstructure. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter and D. W. Everett (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 547-569). San Diego: Academic Press.
- Fitzpatrick, J. J., Iqbal, T., Delaney, C., Twomey, T. and Keogh, M. K., 2004. Effect of powder properties and storage conditions on the flowability of milk powders with different fat contents. *Journal of Food Engineering*, 64 (4), 435-444. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.11.011>
- Fleming, H. P., 1984. Developments in cucumber fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology*, 34 (4), 241-252. doi:10.1002/jctb.280340404
- Fonseca, F., Béal, C. and Corrieu, G., 2000. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*, 67 (1), 83-90.
- Fonseca, F., Cenard, S. and Passot, S., 2015. Freeze-drying of lactic acid bacteria. In W. Wolkers and H. Oldenhof (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (Vol. 1257). New York, NY: Springer.
- Foster, K. D., Bronlund, J. E. and Paterson, A. H. J., 2005. The prediction of moisture sorption isotherms for dairy powders. *International Dairy Journal*, 15 (4), 411-418. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.003>
- Gaber, S. M., Johansen, A.-G., Schüller, R. B., Devold, T. G., Rukke, E.-O. and Skeie, S. B., 2020. Effect of freezing temperatures and time on mineral balance, particle size, rennet and acid coagulation of casein concentrates produced by microfiltration. *International Dairy Journal*, 101, 104563. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104563>
- Georgieva, R., Iliev, I., Haertlé, T., Chobert, J. M., Ivanova, I. and Danova, S., 2009. Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Dairy Journal*, 19 (11), 696-702. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.06.006>

- Georgieva, R., Koleva, P., Nikolova, D., Yankov, D. and Danova, S., 2009. Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23, 861-865.
- Giraud, E., Lelong, B. and Raimbault, M., 1991. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36 (1), 96-99. doi:10.1007/BF00164706
- Gobbetti, M., 1998. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology*, 9 (7), 267-274. doi:https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00053-3
- Gombás, Á., Szabó-Révész, P., Kata, M., Regdon, G. and Erős, I., 2002. Quantitative determination of crystallinity of α -Lactose monohydrate by DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 68 (2), 503-510. doi:10.1023/A:1016039819247
- González-Martínez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot, J. M. and Chiralt, A., 2002. Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (9), 334-340. doi:https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00160-7
- Grzegorzczak, M., Kancelista, A., Łaba, W., Piegza, M. and Witkowska, D., 2018. The effect of lyophilization and storage time on the survival rate and hydrolytic activity of *Trichoderma* strains. *Folia Microbiol (Praha)*, 63 (4), 433-441. doi:10.1007/s12223-017-0581-0
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N. and Scannell, A. G. M., 2011. Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds. *Food and Bioproducts Processing*, 89 (4), 346-355. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.10.001
- Gül, H., 1999. Isparta yöresinde kullanılan ekşi mayanın bileşimi ve fizyolojik özelliklerinin araştırılması ve ekmek yapımında kullanılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 65.
- Gül, H., Özçelik, S., Sağdıç, O. and Certel, M., 2005. Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochemistry*, 40 (2), 691-697. doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.044
- Hammes, W. P. and Vogel, R. F., 1995. The genus *Lactobacillus*. In B. J. B. Wood and W. H. Holzappel (Eds.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (pp. 19-54). Boston, MA: Springer US.
- Haque, M. K. and Roos, Y. H., 2006. Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7 (1), 62-73. doi:https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.12.004
- Hart, S. J. and Leski, T. A., 2006. Refractive index determination of biological particles. *Naval Research Laboratory, NRL/MR/6110--06-8967*, Washington, DC.

- Hays, H. C. W., Millner, P. A., Jones, J. K. and Rayner-Brandes, M. H., 2005. A novel and convenient self-drying system for bacterial preservation. *Journal of Microbiological Methods*, 63 (1), 29-35. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.02.014>
- Heckly, R. J., 1961. Preservation of bacteria by lyophilization. In W. W. Umbreit (Ed.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 3, pp. 1-76): Academic Press.
- Heidebach, T., Först, P. and Kulozik, U., 2009. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1670-1677. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.006>
- Hidalgo, A., Brandolini, A. and Pompei, C., 2010. Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chemistry*, 121 (3), 746-751. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.034>
- Higl, B., Kurtmann, L., Carlsen, C. U., Ratjen, J., Först, P., Skibsted, L. H., Kulozik, U. and Risbo, J., 2007. Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnology Progress*, 23 (4), 794-800. doi:10.1021/bp070089d
- Hoobin, P., Burgar, I., Zhu, S., Ying, D., Sanguansri, L. and Augustin, M. A., 2013. Water sorption properties, molecular mobility and probiotic survival in freeze dried protein-carbohydrate matrices. *Food & Function*, 4 (9), 1376-1386. doi:10.1039/c3fo60112a
- Hubálek, Z., 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46 (3), 205-229. doi:[https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
- Huppertz, T., Fox, P. F. and Kelly, A. L., 2018. 3 - The caseins: Structure, stability, and functionality. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in Food Processing (Second Edition)* (pp. 49-92): Woodhead Publishing.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A. and Rozès, N., 2008. Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International*, 41 (7), 738-744. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.05.007>
- Iacumin, L., Cecchini, F., Manzano, M., Osualdini, M., Boscolo, D., Orlic, S. and Comi, G., 2009. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 26 (2), 128-135. doi:10.1016/j.fm.2008.10.010
- Ibrahim, F. and Ouwehand, A. C., 2019. The genus *Lactobacillus*. In G. Vinderola, A. Ouwehand, S. Salminen and A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. Boca Raton: CRC Press.
- IDF 26/ISO 5537. 2004. Dried milk-Determination of moisture content. IDF. Brussels, Belgium.

- Janković, T., Frece, J., Abram, M. and Gobin, I., 2012. Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research*, 6 (1), 19-24.
- Jonasz, M. and Fournier, G. R., 2007. Chapter 5-The particle size distribution. In M. Jonasz and G. R. Fournier (Eds.), *Light Scattering by Particles in Water* (pp. 267-445). Amsterdam: Academic Press.
- Jouppila, K., Kansikas, J. and Roos, Y. H., 1997. Glass transition, water plasticization, and lactose crystallization in skim milk powder. *Journal of Dairy Science*, 80 (12), 3152-3160. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76286-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76286-6)
- Jouppila, K. and Roos, Y. H., 1994. Water sorption and time-dependent phenomena of milk powders. *Journal of Dairy Science*, 77 (7), 1798-1808. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77121-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77121-6)
- Kailasapathy, K., 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3 (2), 39-48.
- Katina, K., 2005. *Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread*. (Doctoral Thesis). VTT Publications, Espoo. (569)
- Katina, K. and Poutanen, K., 2013. Nutritional aspects of cereal fermentation with lactic acid bacteria and yeast. In M. Gobbetti and M. Gänzle (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (pp. 229-244). New York: Springer.
- Kelly, P., Woonton, B. W. and Smithers, G. W., 2009. 8 - Improving the sensory quality, shelf-life and functionality of milk. In P. Paquin (Ed.), *Functional and Speciality Beverage Technology* (pp. 170-231): Woodhead Publishing.
- Kılıç, S., 2008. *Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri*. Bornova, İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:542.
- Kim, C. S., Lee, S. A. and Kim, H. I., 1999. Development of buckwheat bread: 3. Effects of the thermal process of dough making on baking properties. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 4 (1), 6-13.
- Kinsella, J. E., Fox, P. F. and Rockland, L. B., 1986. Water sorption by proteins: Milk and whey proteins. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24 (2), 91-139. doi:[10.1080/10408398609527434](https://doi.org/10.1080/10408398609527434)
- Kirchman, D., 2001. Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments. In *Methods in Microbiology* (Vol. 30, pp. 227-237): Academic Press.
- Kneifel, W., 2003. Recombined and filled milks. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 4921-4926). Oxford: Academic Press.
- Landete, J. M., Rodríguez, H., Curiel, J. A., de las Rivas, B., de Felipe, F. L. and Muñoz, R., 2010. Chapter 43 - Degradation of phenolic compounds found in olive products by *Lactobacillus plantarum* strains. In V. R. Preedy and R. R. Watson

(Eds.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 387-396). San Diego: Academic Press.

- Lapčík, L., Lapčíková, B., Otyepková, E., Otyepka, M., Vlček, J., Buňka, F. and Salek, R. N., 2015. Surface energy analysis (SEA) and rheology of powder milk dairy products. *Food Chemistry*, 174, 25-30. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.017>
- Leifert, C., Waites, W. M., Camotta, H. and Nicholas, J. R., 1989. Lactobacillus plantarum; a deleterious contaminant of plant tissue cultures. *Journal of Applied Bacteriology*, 67 (4), 363-370. doi:10.1111/j.1365-2672.1989.tb02506.x
- Li, E. and Mira de Orduna, R., 2010. A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology*, 50 (3), 283-288. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02789.x
- Li, Z., Li, H., Deng, C., Bian, K. and Liu, C., 2015. Effect of Lactobacillus Plantarum DM616 on dough fermentation and chinese steamed bread quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39 (1), 30-37. doi:10.1111/jfpp.12205
- Liu, P. Y., Chin, L. K., Ser, W., Ayi, T. C., Yap, P. H., Bourouina, T. and Leprince-Wang, Y., 2014. Real-time measurement of single bacterium's refractive index using optofluidic immersion refractometry. *Procedia Engineering*, 87, 356-359. doi:<https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.11.743>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J. A. and Franco, D., 2018. Chapter 3-Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: General aspects and overall description. In F. J. Barba, A. S. Sant'Ana, V. Orlien and M. Koubaa (Eds.), *Innovative Technologies for Food Preservation* (pp. 53-107): Academic Press.
- Lu, Z., Breidt, F., Jr., Fleming, H. P., Altermann, E. and Klaenhammer, T. R., 2003. Isolation and characterization of a Lactobacillus plantarum bacteriophage, phiJL-1, from a cucumber fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 84 (2), 225-235. doi:10.1016/s0168-1605(03)00111-9
- Lucey, J. A., 2017. Chapter 7 - Formation, structural properties, and rheology of acid-coagulated milk gels. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter and D. W. Everett (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 179-197). San Diego: Academic Press.
- Maćej, D., Jovanovic, S. and Denin Djurdjevic, J., 2002. The influence of high temperatures on milk proteins. *Hemijska Industrija*, 56 (3), 123-132. doi:10.2298/HEMIND0203123M
- Maier, R. M. and Pepper, I. L., 2015. Chapter 3-Bacterial growth. In I. L. Pepper, C. P. Gerba and T. J. Gentry (Eds.), *Environmental Microbiology (Third Edition)* (pp. 37-56). San Diego: Academic Press.

- Maisnam, D., Rasane, P., Dey, A., Kaur, S. and Sarma, C., 2017. Recent advances in conventional drying of foods. *Journal of Food Technology and Preservation*, 1, 25-34.
- Malik, K. A., 1988a. A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 8 (5), 259-271. doi:https://doi.org/10.1016/0167-7012(88)90008-5
- Malik, K. A., 1988b. Survival and stability of microorganisms during freeze-drying. *Cryobiology*, 25 (6), 517-518. doi:https://doi.org/10.1016/0011-2240(88)90324-0
- Mao, B. and Yan, S., 2019. Lactic acid bacteria and fermented fruits and vegetables. In W. Chen (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Bioengineering and Industrial Applications* (1st ed., pp. 181-209). Singapore: Springer.
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A. and Morales, M. E., 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 15-25. doi:https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010
- Martínez-Cervera, S., Salvador, A., Muguera, B., Moulay, L. and Fiszman, S. M., 2011. Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (3), 729-736. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.035
- Mechmeche, M., Kachouri, F., Yaghlane, H. B., Ksontini, H., Setti, K. and Hamdi, M., 2017. Kinetic analysis and mathematical modeling of growth parameters of *Lactobacillus plantarum* in protein-rich isolates from tomato seed. *Food Science and Technology International*, 23 (2), 128-141. doi:10.1177/1082013216665706
- Mellefont, L. A., McMeekin, T. A. and Ross, T., 2003. The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 83 (3), 281-293. doi:https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00377-X
- Métris, A., George, S. M., Peck, M. W. and Baranyi, J., 2003. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods*, 55 (3), 821-827. doi:https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.006
- Mis Solval, K., Chouljenko, A., Chotiko, A. and Sathivel, S., 2019. Growth kinetics and lactic acid production of *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *L. acidophilus* NRRL B-4495, and *L. reuteri* B-14171 in media containing egg white hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*, 105, 393-399. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.058
- Miyamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S. and Komatsu, Y., 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*, 41 (3), 251-255. doi:https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2282

- Morales, F. J. and van Boekel, M. A. J. S., 1998. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation. *International Dairy Journal*, 8 (10), 907-915. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00014-X)
- Morgan, C. and Vesey, G., 2009. Freeze-Drying of Microorganisms. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (pp. 162-173). Oxford: Academic Press.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A. and Vesey, G., 2006. Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66 (2), 183-193. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Morichi, T., 1974. Preservation of lactic acid bacteria by freeze-drying. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 8 (3), 171-176.
- Morton, H. E. and Pulaski, E. J., 1938. The preservation of bacterial cultures. I. *Journal of Bacteriology*, 35 (2), 163-183.
- Muhammad, Z., Ramzan, R., Huo, G.-C., Tian, H. and Bian, X., 2017. Integration of polysaccharide-thermoprotectant formulations for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*, appraisal of survivability and physico-biochemical properties during storage of spray dried powders. *Food Hydrocolloids*, 66, 286-295. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.040>
- Najafpour, G. D., 2007. Chapter 5-Growth kinetics. In G. D. Najafpour (Ed.), *Biochemical Engineering and Biotechnology* (pp. 81-141). Amsterdam: Elsevier.
- Nakamura, L. K., 1996. Chapter 4 - Preservation and maintenance of Eubacteria. In J. C. Hunter-Cevera and A. Belt (Eds.), *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (pp. 65-84). San Diego: Academic Press.
- O'Kennedy, B. T., 2009. 19-Dairy ingredients in non-dairy food systems. In M. Corredig (Ed.), *Dairy-Derived Ingredients* (pp. 482-506): Woodhead Publishing.
- O'Kennedy, B. T., 2011. 2 - Caseins. In G. O. Phillips and P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Food Proteins* (pp. 13-29): Woodhead Publishing.
- O'Regan, J., Ennis, M. P. and Mulvihill, D. M., 2009. 13 - Milk proteins. In G. O. Phillips and P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids (Second Edition)* (pp. 298-358): Woodhead Publishing.
- Oshima, H. and Kinoshita, M., 2013. Effects of sugars on the thermal stability of a protein. *The Journal of Chemical Physics*, 138 (24), 245101. doi:10.1063/1.4811287
- Ostrowska-Ligeza, E., Górska, A., Wirkowska, M. and Koczoń, P., 2012. An assessment of various powdered baby formulas by conventional methods (DSC) or FT-IR spectroscopy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 110, 465-471.
- Otero, M. C., Espeche, M. C. and Nader-Macías, M. E., 2007. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic

- applications. *Process Biochemistry*, 42 (10), 1406-1411. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.008>
- Ozmen, L. and Langrish, T. A. G., 2002. Comparison of glass transition temperature and sticky point temperature for skim milk powder. *Drying Technology*, 20 (6), 1177-1192. doi:[10.1081/DRT-120004046](https://doi.org/10.1081/DRT-120004046)
- Palmfeldt, J. and Hahn-Hägerdal, B., 2000. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 55 (1), 235-238. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00176-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00176-8)
- Park, S. Y. and Lim, S. D., 2015. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* FH185 isolated from human feces. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35 (5), 615-621. doi:[10.5851/kosfa.2015.35.5.615](https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.5.615)
- Pereyra Gonzales, A. S., Naranjo, G. B., Leiva, G. E. and Malec, L. S., 2010. Maillard reaction kinetics in milk powder: Effect of water activity at mild temperatures. *International Dairy Journal*, 20 (1), 40-45. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.07.007>
- Picot, A. and Lacroix, C., 2003. Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. *International Dairy Journal*, 13 (6), 455-462. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00050-5)
- Poutanen, K., Flander, L. and Katina, K., 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 26 (7), 693-699. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.011>
- Prado Barragán, L. A., Figueroa, J. J. B., Rodríguez Durán, L. V., Aguilar González, C. N. and Hennigs, C., 2016. Chapter 7-Fermentative Production Methods. In P. Poltronieri and O. F. D'Urso (Eds.), *Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products* (pp. 189-217): Elsevier.
- Pugliese, A., Paciulli, M., Chiavaro, E. and Mucchetti, G., 2016. Characterization of commercial dried milk and some of its derivatives by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123 (3), 2583-2590. doi:[10.1007/s10973-016-5243-y](https://doi.org/10.1007/s10973-016-5243-y)
- Purevsuren, B. and Davaajav, Y., 2001. Thermal analysis of casein. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 65 (1), 147-152. doi:[10.1023/A:1011532819792](https://doi.org/10.1023/A:1011532819792)
- Rahman, M. S., Al-Hakmani, H., Al-Alawi, A. and Al-Marhubi, I., 2012. Thermal characteristics of freeze-dried camel milk and its major components. *Thermochimica Acta*, 549, 116-123. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tca.2012.09.005>
- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S. and Anandharamakrishnan, C., 2012. Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 4 (4), 891-898. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.06.006>

- Rezvani, F., Ardestani, F. and Najafpour, G., 2017. Growth kinetic models of five species of Lactobacilli and lactose consumption in batch submerged culture. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 48 (2), 251-258. doi:10.1016/j.bjm.2016.12.007
- Rogers, S., Wu, W. D., Saunders, J. and Chen, X. D., 2008. Characteristics of milk powders produced by spray freeze drying. *Drying Technology*, 26 (4), 404-412. doi:10.1080/07373930801929003
- Roos, Y. H., 2002. Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders. *Le Lait*, 82 (4), 475-484.
- Roos, Y. H., Caroline, F. and Naritchaya, P., 2017. Freezing and freeze-drying. In Y. H. Roos and Y. D. Livney (Eds.), *Engineering Foods for Bioactives Stability and Delivery* (pp. 247-260). New York: Springer.
- Ross, K. F. A., 1955. A critical method of measuring the diameter of living bacteria with the interference microscope. *Nature*, 176 (4492), 1076-1077. doi:10.1038/1761076a0
- Ross, K. F. A., 1957. The Size of Living Bacteria. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, s3-98 (44), 435-454. Retrieved from <https://jcs.biologists.org/content/joces/s3-98/44/435.full.pdf>
- Ross, K. F. A. and Billing, E., 1957. The water and solid content of living bacterial spores and vegetative cells as indicated by refractive index measurements. *Journal of General Microbiology*, 16 (2), 418-425. doi:10.1099/00221287-16-2-418
- Salim-ur-Rehman, Paterson, A. and Piggott, J. R., 2006. Flavour in sourdough breads: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (10), 557-566. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.03.006>
- Saltmarch, M., Vagnini-Ferrari, M. and Labuza, T., 1981. Theoretical basis and application of kinetics to browning in spray-dried whey food systems. *Progress in food and nutrition science*, 5, 331-344.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U. and Foerst, P., 2011. Storing Lactic acid bacteria: current methodologies and physiological implications. In E. Tsakalidou and K. Papadimitriou (Eds.), *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria. Food Microbiology and Food Safety*. Boston, MA: Springer.
- Sarode, A. R., Sawale, P. D., Khedkar, C. D., D., K. S. and D., P. R., 2016. Casein and caseinate: Methods of manufacture. In B. Caballero, P. Finglas and F. Toldrá (Eds.), *The Encyclopedia of Food and Health* (Vol. 1, pp. 676-682). Oxford: Academic Press.
- Sarra, A., Celluzzi, A., Bruno, S. P., Ricci, C., Sennato, S., Ortore, M. G., Casciardi, S., Del Chierico, F., Postorino, P., Bordi, F. and Masotti, A., 2020. Biophysical characterization of membrane phase transition profiles for the discrimination of outer membrane vesicles (OMVs) from *Escherichia coli* grown at different temperatures. *Frontiers in microbiology*, 11, 290-290. doi:10.3389/fmicb.2020.00290

- Schuck, P., Blanchard, E., Dolivet, A., Méjean, S., Onillon, E. and Jeantet, R., 2005. Water activity and glass transition in dairy ingredients. *Le Lait*, 85 (4-5), 295-304. doi:<http://dx.doi.org/10.1051/lait:2005020>
- Selmer-Olsen, E., Birkeland, S.-E. and Sørhaug, T., 1999. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. *Journal of Applied Microbiology*, 87 (3), 429-437. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00839.x
- Shendurse, A. M. and Khedkar, C. D., 2016. Lactose. In B. Caballero, P. M. Finglas and F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 509-516). Oxford: Academic Press.
- Shrestha, A. K., Howes, T., Adhikari, B. P. and Bhandari, B. R., 2007. Water sorption and glass transition properties of spray dried lactose hydrolysed skim milk powder. *LWT-Food Science and Technology*, 40 (9), 1593-1600. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.003>
- Shu, G., Wang, Z., Chen, L., Wan, H. and Chen, H., 2018. Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 90, 70-76. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.013>
- Sinha, R. N., Dudani, A. T. and Ranganathan, B., 1974. Protective effect of fortified skim milk as suspending medium for freeze drying of different lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 39 (3), 641-642. doi:10.1111/j.1365-2621.1974.tb02969.x
- Song, X., Zhu, W., Pei, Y., Ai, Z. and Chen, J., 2013. Effects of wheat bran with different colors on the qualities of dry noodles. *Journal of Cereal Science*, 58 (3), 400-407. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.08.005>
- Southward, C. R., 2003a. Casein and caseinates-Methods of manufacture. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 943-948). Oxford: Academic Press.
- Southward, C. R., 2003b. Casein and Caseinates-Uses in the Food Industry. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 948-958). Oxford: Academic Press.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A. and Hall, S. J., 2017. Chapter 2 - Microbial growth kinetics. In P. F. Stanbury, A. Whitaker and S. J. Hall (Eds.), *Principles of Fermentation Technology (Third Edition)* (pp. 21-74). Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Stokes, R. H. and Robinson, R. A., 1949. Standard Solutions for Humidity Control at 25° C. *Industrial & Engineering Chemistry*, 41 (9), 2013-2013. doi:10.1021/ie50477a041
- Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R. and Danner, H., 2009. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the

- viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (1), 167-177. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04192.x
- Suslow, T. V. and Schroth, M. N., 1981. Bacterial culture preservation in frozen and dry-film methylcellulose. *Applied and environmental microbiology*, 42 (5), 872-877.
- Şimşek, Ö., Çon, A. H. and Tulumoğlu, Ş., 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*, 17 (4), 263-270. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.011
- Thomsen, M. K., Lauridsen, L., Skibsted, L. H. and Risbo, J., 2005. Temperature effect on lactose crystallization, Maillard Reactions, and lipid oxidation in whole milk powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (18), 7082-7090. doi:10.1021/jf050862p
- Tiwari, S. K. and Srivastava, S., 2008. Characterization of a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14. *Food Biotechnology*, 22 (3), 247-261. doi:10.1080/08905430802262582
- Trsic-Milanovic, N., Aleksandar, K., Josip, B. and Dimitrijevic-Brankovic, S., 2001. The influence of a cryoprotective medium containing glycerol on the lyophilization of lactic acid bacteria (NOTE). *Journal of the Serbian Chemical Society*, 66. doi:10.2298/JSC0107435T
- Tsvetkov, T. and Brankova, R., 1983. Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*, 20 (3), 318-323. doi:https://doi.org/10.1016/0011-2240(83)90020-2
- Tunail, N., 2009. *Mikrobiyoloji* (1. ed.). Ankara: Pelin Ofset, 161-162.
- Valentina, V., Pratiwi, R., Hsiao, P., Tseng, H., Hsieh, J. C. and Chen, C., 2016. Sensorial characterization of foods before and after freeze-drying. *Austin Food Sciences*, 1 (6), 1027.
- Vinderola, G., Champagne, C. P. and Desfossés-Foucault, É., 2019. The production of lactic acid bacteria starters and probiotic cultures: An industrial perspective. In G. Vinderola, A. Ouwehand, S. Salminen and A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Boca Raton: CRC Press.
- von Wright, A. and Axelsson, L., 2019. Lactic acid bacteria: An introduction. In G. Vinderola, A. Ouwehand, S. Salminen and A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Boca Raton: CRC Press.
- Wang, G., Yu, X., Lu, Z., Yang, Y., Xia, Y., Lai, P. F. H. and Ai, L., 2019. Optimal combination of multiple cryoprotectants and freezing-thawing conditions for high lactobacilli survival rate during freezing and frozen storage. *LWT-Food Science and Technology*, 99, 217-223. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.065
- Wang, G. Q., Pu, J., Yu, X. Q., Xia, Y. J. and Ai, L. Z., 2020. Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685

- Wang, Y. C., Yu, R. C. and Chou, C. C., 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93 (2), 209-217. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.001>
- Widdel, F., 2007. Theory and measurement of bacterial growth. *Di dalam Grundpraktikum Mikrobiologie*, 4 (11), 1-11.
- Würth, R., Foerst, P. and Kulozik, U., 2018. Effects of skim milk concentrate dry matter and spray drying air temperature on formation of capsules with varying particle size and the survival microbial cultures in a microcapsule matrix. *Drying Technology*, 36 (1), 93-99. doi:10.1080/07373937.2017.1301952
- Yan, B. and Zhang, H., 2019. Lactic acid bacteria and fermented cereals. In W. Chen (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Bioengineering and Industrial Applications* (1st ed., pp. 145-179). Singapore: Springer.
- Yang, N. L. and Sandine, W. E., 1979. Acid-Producing Activity of Lyophilized Lactic Streptococcal Cheese Starter Concentrates1. *Journal of Dairy Science*, 62 (6), 908-915. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83347-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83347-0)
- Ying, D. Y., Phoon, M. C., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I. and Augustin, M. A., 2010. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: Relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science*, 75 (9), E588-E595. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01838.x
- Yoon, K. Y., Woodams, E. E. and Hang, Y. D., 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97 (12), 1427-1430. doi:10.1016/j.biortech.2005.06.018
- Zadow, J. G., 2003. Whey and whey powders-Production and uses. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 6147-6152). Oxford: Academic Press.
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suarez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J. and Giraffa, G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28 (5), 1033-1040. doi:10.1016/j.fm.2011.02.009
- Zárate, G. and Nader-Macias, M. E., 2006. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. *Process Biochemistry*, 41 (8), 1779-1785. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.024>
- Zayed, G. and Roos, Y. H., 2004. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 39 (9), 1081-1086. doi:[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00222-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00222-X)
- Zhang, J., Liu, W., Sun, Z., Bao, Q., Wang, F., Yu, J., Chen, W. and Zhang, H., 2011. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected

from western region in Inner Mongolia of China. *Food Control*, 22 (5), 767-774.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.012>

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. and van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56 (6), 1875-1881.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gamze ÜÇOK
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Ilgın, 21.03.1987
Telefon : 0535 373 01 95
Faks : -
e-mail : gamzeozugur@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Nuh Mehmet Baldöktü Anadolu Lisesi, Melikgazi, Kayseri	2005
Üniversite	: Erciyes Üniversitesi, Talas, Kayseri	2009
	: Anadolu Üniversitesi, Tepebaşı, Eskişehir	2010
Yüksek Lisans	: Erciyes Üniversitesi, Talas, Kayseri	2011
Doktora	: Erciyes Üniversitesi, Talas, Kayseri	2011-2016
	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	2016-2020

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2009-2013	Hitit Üniversitesi	Arş. Gör.
2013-	Necmettin Erbakan Üniversitesi	Arş. Gör.

YABANCI DİLLER

İngilizce (B2),
 Almanca (A2)

YAYINLAR

Üçok, G. and Hayta, M. 2015. Effect of sourdough addition on rice based gluten-free formulation: rheological properties of dough and bread quality. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 7(5): 643-649. (*Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır.*)

Üçok, G., Sert, D. 2018. The effect of lactic acid bacteria cultures in different sourdough on dough and bread characteristics. *The International Symposium on Food Rheology and Texture*, October 19-21, Istanbul, TURKEY. (*Doktora tezinden yapılmıştır.*)

Üçok, G. and Sert, D., 2020. Growth kinetics and biomass characteristics of *Lactobacillus plantarum* L14 isolated from sourdough: Effect of fermentation time on dough machinability. *LWT*, 129, 109516. (*Doktora tezinden yapılmıştır.*)