

430.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

VAKFIKEBİR EKMEĞİNİN MİKROFLORA VE
AROMA MADDELERİNİN TESPİTİ

Neslihan DİKBAŞ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2003

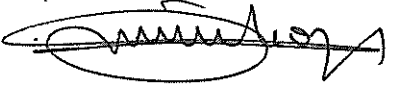
Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. H. Gürbüz KOTANCILAR danışmanlığında, Ziraat Yüksek Müh. Neslihan DİKBAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 24 / 04 / 2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Berrin ÖZKAYA

imza : 

Üye : Prof. Dr. Mükerrerem KAYA

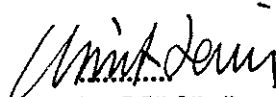
imza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. H. Gürbüz KOTANCILAR

imza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(imza)


Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

VAKFIKEBİR EKMEĞİNİN MİKROFLORA VE AROMA MADDELERİNİN TESPİTİ

Neslihan DİKBAŞ

Danışman: Yrd.Doç.Dr.H.Gülbüz KOTANCILAR

Bu çalışmada, geleneksel yöntemle üretilen Trabzon Vakfıkebir Ekmeğinin mikrobiyolojik ve aromatik özellikleri incelenmiş, direkt sistemle üretilen francala ekmeği ile karşılaştırılmıştır.

Trabzon il sınırları içerisindeki 8 farklı fırından alınan ekşi hamur örnekleri izole edilmiş, 158 laktik asit bakteri izolatu MIS sistemi (Microbial Identification System) kullanılarak identifiye edilmiş, laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus* (%46.74), *Enterococcus* (%19.61), *Streptococcus* (%17.72), *Lactococcus* (%6.95), *Pediococcus* (%5.05), *Leuconostoc* (%1.26) suşları tespit edilmiştir.

İndirekt sistemle üretilen Vakfıkebir Ekmeğinin Gaz Kromatografi/Kütle Spektrofotometre (GC/MS) sonuçlarına göre; ekşi hamurda en yüksek oranda etanol (%58.88), asetaldehit (%24.64), etilamin (%15.13), en düşük oranda 2-*n*-pentil furan ve octanal, eser miktarlarda ise 2-propanamin, 2,3-metil butanal, *n*-hexanol, *n*-nonanal, 2-furan-karboksialdehit tespit edilmiştir. Ayrıca son fermentasyon sonrası hamur örneklerinde en yüksek etanol (%79.88), izopropil amin (%14.86), asetaldehit (%4.29), en düşük oranda asetik asite rastlanmıştır, ekmeğin kabuk ve iç kısmından alınan homojen örneklerde ise en yüksek etanole (%98.57) rastlanmıştır, asetik asit de diğer örneklerle oranla Vakfıkebir ekmeğinde önemli bir yükselişte olduğu gözlenmiştir.

Direkt sisteme üretilen Francala Ekmeğinin GC/MS sonuçlarına göre; ilk fermentasyon sonrası en yüksek oranda etilamin (%52.32), aset aldehit (%33.52), etanol (%13.24) olduğu gözlenmiştir, ayrıca örnek içerisinde 2-propanamin, diasetil, hexanal, 2-*n*-pentilfuran, *n*-hexanol, *n*-nonanal gibi altı eser maddeye rastlanmıştır. Francala ekmeğinin son fermentasyon sonrası hamur örneklerinde en yüksek etanol (%98.74) olduğu gözlenmiştir, octanal, *n*-nonanal, 2-furan-karboksialdehit'in eser miktarda olduğu görülmüştür. Kabuk ve iç kısmından alınan homojen ekmeğin örneklerinde ise en yüksek oranda etanol (%98.17), eser miktarda da diasetil, izobutil alkol, octanal, *n*-nonanal, 2-furan-karboksialdehit'e rastlanmıştır.

Vakfıkebir ekmeğinin francala ekmeğine göre daha fazla volatil madde (17:11) içerdiği belirlenmiştir.

2003, 111 sayfa

Anahtar kelime: Vakfıkebir Ekmeği, ekşi hamur, identifikasyon, laktik asit bakterisi, aroma maddeleri

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DETERMINATION OF MICROFLORA AND AROMATIC COMPOUNDS OF VAKFIKEBIR BREAD

Neslihan DİKBAŞ

Supervisor: Assist.Prof.Dr. H.Gürbüz KOTANCILAR

In this study, microflora and aromatic compounds of Vakfikebir bread produced by traditional methods were compared to francala bread produced by direct system.

Sourdough samples were obtained from eight different bakers located in the city of Trabzon. Isolates from sourdough samples were identified by Microbial Identification System (MIS); *Lactobacillus* (46.74%), *Enterococcus* (19.61%), *Streptococcus* (17.72%), *Lactococcus* (6.95%), *Pediococcus* (5.05%), *Leuconostoc* (1.26%) strains were determined. They belong to *Lactobacilli* genus.

Vakfikebir bread produced by indirect system was studied with GC/MS, and the results were presented in the following: Ethanol (58.88%) had highest level in volatile compounds of sourdoughs. Acet aldehyde (24.64%), ethylamine (15.13%) were other compounds 2-n-pentylfuran and octanal had lowest level; 2-n-propan amine, 2,3-methyl butanol, *n*-hexanal, *n*-nonanal, 2-furan carboxyaldehyde, had trace levels. Sourdough samples obtained from main fermentation stage had ethanol (79.88%), isopropilamine (14.86%), acet aldehyde (4.29%), acetic acid was in the lowest levels. Samples from crumb and inner part of Vakfikebir bread were homogenized and analyzed by GC/MS and results showed that ethanol was in the highest levels at Vakfikebir bread were considerably higher than the other samples.

Results of GC/MS obtained from Francala bread produced by direct system during first fermentation were ethylamine (52.32%), acet aldehyde (33.52%), and ethanol (13.24%), respectively. Trace levels of 2-propanamine, diacetyl, hexanol, 2-n-pentylfuran, *n*-hexanal, *n*-nonanal, were found.

Samples from crumb and inner part of the Francala bread were homogenized and analyzed by GC/MS and it was found that ethanol (98.17%) was in the highest levels. In volatile compounds. Diacetyl, isobutyl alcohol, octanal, *n*-nonanal, 2-furan carboxyaldehyde were at trace levels.

It was found Vakfikebir bread had more volatile compounds than Francala bread (17:11).

2003-111 pages

Keywords: Vakfikebir bread, sourdough, identification, lactic acid bacteria, aroma compounds

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fon Saymanlığı tarafından desteklenen 2001/74 nolu proje ile gerçekleştirilmiş olup, katkılarından dolayı Atatürk Üniversitesi Rektörlüğüne teşekkür ederim.

Araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlarının yorumlanmasında ve her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. H. Gürbüz Kotancılar'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca her türlü yardımlarından dolayı Ziraat Fakültesi Dekanı hocam Sayın Prof. Dr. Mükerrerem Kaya'ya, projenin hazırlanması aşamasındaki yardımlarından dolayı Sayın Dr. M. Murat Karaoğlu'na, mikrobiyolojik laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Fikrettin Şahin'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Şengül'e, aroma analizi çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı Tetra Şirketler Grubundan Sayın Dr. Zahi Tim'e, aroma sonuçlarının değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı Eğitim Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Çakır'a, tez yazım sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş.Gör. Emre Gür'e, Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerine ve Fen Bilimleri Enstitüsü yöneticilerine özellikle Enstitü Müdürü Sayın Prof. Dr. Ümit Demir'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında her türlü maddi ve manevi desteklerini gördüğüm Sayın eşim Dr. Levent Dikbaş ve çocuklarım Asena ve Burak'a özellikle teşekkür ederim.

Neslihan Dikbaş

Nisan 2003

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	32
3.1. Materyal	32
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Francala ekmeğinin üretim prosesi	33
3.2.2. Trabzon Vakfıkebir Ekmeğinin üretim prosesi	34
3.2.3. Mikrobiyolojik analizler	35
3.2.3.1. Mikrobiyolojik analizler için hamur örneklerinin homojenizasyonu	35
3.2.3.2. Ekşi hamur örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizler	35
3.2.4. Laktik asit bakterilerinin geliştirilmesi ve izolasyonu	37
3.2.5. Maya izolasyonu	37
3.2.6. Kimyasal analizler	38
3.2.6.1. Gram boyama	38
3.2.6.2. Katalaz testi	38
3.2.6.3. Oksidaz testi	38
3.2.7. Yağ asitleri kompozisyonuna göre laktik asit bakterilerinin identifikasyonu	39
3.2.7.1. Yağ asitlerinin ekstraksiyonunda kullanılan çözeltiler	40
3.2.7.2. Yağ asitleri ekstraksiyon metodu	41
3.2.7.3. MIS sistemi (Microbial Identification System)	42
3.2.7.3.1. Gaz Kromatografisi	43
3.2.7.3.2. Kromatografi Sistemini Besleyen Gaz Tankları	44
3.2.7.3.3. Bilgisayar Sistemi ve Programlar (Sherlock system software, library generation software)	44
3.2.7.3.4. Lazer Yazıcı	44
3.2.8. Aroma analizi (Gas Cromotografy/Mass Spectrum (GC/MS)	44
3.2.8.1. Kütle spekturumun kaydedilmesi	48
3.2.8.2. Spesifik bileşenlerin tanımlanması	49
3.2.8.3. Headspace analizinin prensipleri	50
3.2.8.4. Headspace analizi	51
4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR	53
4.1. Mikrobiyolojik Bulgular	53
4.1.1. Laktik Asit Bakteri İzolatları	54
4.1.2. Maya İzolatları	61
4.2. Aroma Bulguları	63
5. SONUÇLAR	96
KAYNAKLAR.....	102

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrad derece
g	Gram
GC	Gaz Kromatografisi
Dk	Dakika
Kob	Koloni oluşturan birim
log	Logaritma
lt	Litre
mg	Miligram
MIS	Microbial Identification System
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
MRS	De Man Rogosa Sharp Agar
MS	Kütle Spektrometresi
OGYE	Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar
PCA	Plate Count Agar
ppm	Milyonda bir kısım
SDS	Saboraud Dextrose Agar
TAMB	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
VRBDA	Violet Red Bile Dextrose Agar
VRBA	Violet Red Bile Agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Alkol üretiminde amino asit prekursorları	10
Şekil 2.1. Buğday ekşi hamur asidifikasyonu	17
Şekil 2.2. Ekşi maya hamurunda maltozun <i>Lactobacillus brevis</i> var. <i>lindneri</i> ve <i>C. milleri</i> tarafından kullanılması.....	26
Şekil 3.1. Francala ekmeğinin üretim akış şeması	33
Şekil 3.2. Vakfıkebir Ekmeğinin üretim akış şeması	34
Şekil 3.3. Mikrobiyal identifikasyon sistem (MIS) ünitesi	43
Şekil 3.4. Gaz Kromatografisinin sistematik gösterimi	45
Şekil 3.5. Kütle Spektrometresinin şematik gösterimi	46
Şekil 3.6. A,B,C,D gibi dört madde için çok basit bir spektra. a) Maddeler ayrı ayrı b) karışım halinde eşit olmayan oranlarda	47
Şekil 3.7. GC/MS kombinasyonunda başarılı bir şekilde ayrıştırılan A,B,C,D örneklerinin kütle spektrometresi tarafından ayrı spektralarının gösterimi ...	49
Şekil 3.8. Farklı zamanlarda ortaya çıkan A, B, C, gibi üç bileşeni gösteren tipik bir Gaz Kromatogramı	50
Şekil 3.9. Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) ünitesi.....	52
Şekil 4.1. Ana fermentasyon sonrası gaz kromatogramı (Francala).....	64
Şekil 4.2. Son fermentasyon sonrası gaz kromatogramı (Francala).....	66
Şekil 4.3. Fırında pişirilen Francala ekmeğinin gaz kromatogramı	68
Şekil 4.4. Vakfıkebir ekmeği üretim prosesindeki 1.ekşi hamurun fermentasyon sonrası gaz kromatogramı	70
Şekil 4.5. Vakfıkebir ekmeği üretim prosesindeki hamurun son fermentasyon sonrası gaz kromatogramı	72
Şekil 4.6. Vakfıkebir ekmeğinin gaz kromatogramı.....	75
Şekil 4.7. a) Etilamin'in b) İzopropil amin'in kütle spektrumları ve kimyasal formülleri.....	78
Şekil 4.8. a) Etilasetat'ın b) Asetaldehit'in kütle spektrumları ve kimyasal formülleri..	79
Şekil 4.9. a) Diasetil'in b) Etanol'un kütle spektrumları ve kimyasal formülleri	80
Şekil 4.10. a) 2,3 Metil butanal'ın b) Propanol'un kütle spektrumları ve kimyasal formülleri	81
Şekil 4.11. a) Hexanal'ın b) İzobutil alkol'un kütle spektrumları ve kimyasal formülleri	82
Şekil 4.12. a) 3-Metil-1-butanol'un b) Heptanal'ın kütle spektrumları ve kimyasal formülleri	83
Şekil 4.13. a) n-pentanol'un b) 2-n-pentil-furan'ın kütle spektrumları ve kimyasal formülleri	84
Şekil 4.14. a) 3-Hidroksi-2-butanon'un b) Octanal'ın kütle spektrumları ve kimyasal formülleri	85
Şekil 4.15. a) n-Hexanol'un b) n-Nonanal'ın kütle spektrumları ve kimyasal formülleri	86
Şekil 4.16. a) Asetik asit'in b) 2-furan karboksialdehit'in kütle spektrumları ve kimyasal formülleri	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Alınan numunelerin ilk mikrobiyolojik testleri	36
Çizelge 3.2. Headspace şartları: (Turbomatrix 40 Headspace Sampler, Perkin Elmer)	51
Çizelge 3.3. GC şartları: Auto system XL, Perkin Elmer	51
Çizelge 4.1. Ekşi hamurların mikrobiyolojik sayım sonuçları (log/kob/g)	53
Çizelge 4.2. Ekşi hamur örneklerinden identifiye edilen laktik asit bakterileri	56
Çizelge 4.3. İzolasyon sonucu teşhis edilen maya türleri	62
Çizelge 4.4. Ana fermentasyon sonrası oluşan aroma maddeleri (Francala)	65
Çizelge 4.5. Son fermentasyon sonrası oluşan aroma maddeleri (Francala)	67
Çizelge 4.6. Fırında pişirilen Francala ekmeğinin aroma maddeleri	69
Çizelge 4.7. Vakfıkebir ekmeği üretim prosesindeki 1.ekşi hamurun aroma maddeleri	71
Çizelge 4.8. Vakfıkebir ekmeği üretim prosesindeki hamurun son fermentasyon sonrası aroma maddeleri	73
Çizelge 4.9. Vakfıkebir ekmeğinin aroma maddeleri	76
Çizelge 4.10. Vakfıkebir ve francala ekmeklerinin ve hamurlarının aroma bileşenlerinin karşılaştırılması (%)	89
Çizelge 4.11. Çalışmamızda tespit edilen kimyasal bileşiklerin koku karakteristikleri..	91

1.GİRİŞ

Tarihi insanın tarıma başlaması kadar eski olan ekmek, hamurun ateşte pişmesi anlamına gelen “ötmek” sözcüğünün zamanla dilimize yerleşmiş şeklidir. Ekmek hububat unlarına tuz, su, maya katılmasıyla hazırlanan kütle, yoğrularak uygun şartlarda fermente edildikten sonra, pişirilmesiyle yapılan mamule denilmektedir (Anonymous 1997). Ekmeğin tarihçesi oldukça eskiye dayanmaktadır. Bugünkü mayalı ekmeğe benzer bir ürünü M.Ö. 200 yıllarında Mısırlılar üretmiştir (Elgün ve Ertugay 1999).

Ülkemizde tahılın bitkisel gıdalardaki yeri %66 olup bunun %56’lık kısmı sadece ekmek tarafından karşılanmaktadır (Anonymous 1982, Ercan ve Bildik 1993).

Ekmek karbonhidrat ve protein kaynağı olarak insan beslenmesinde yüksek öneme sahiptir. Öyle ki; tahıla dayalı bir beslenmenin hakim olduğu Türkiye’de fert başına tüketilen enerjinin %66’sı tahıldan, bunun %56’lık kısmı yalnızca ekmekten, proteinin %50’si yine ekmekten karşılanmaktadır (Elgün ve Ertugay 1999). Ülkemizde 1997 yılındaki ekmek üretiminin 9.507.000 ton olduğu rapor edilmiştir (Anonymous 1998). Farklı bölge, yaş, gelir gruplarına göre kişi başına ekmek tüketimi ülkemizde 100-800 g/gün arasında olup ortalama 400 g/gün’dür (Aykut ve Baysal 1978, Elgün ve Ertugay 1999).

Günümüzde ekmek hem dünyada hem de ülkemizde, insan beslenmesinde en sık kullanılan, bıkıp usanılmadan yenile gelen, bir tat ve aromaya sahip, diyetimiz için de oldukça fazla yer tutan, diğer gıda maddelerine oranla ucuz, doyurucu, ekonomik ve sosyal değeri bakımından vazgeçilmez bir gıdadır.

Asırlardır ekmek tüketen insanlar, uzun süren alışkanlıkların verdiği hassasiyetle bu konuda damak zevklerini oldukça geliştirmişlerdir. Bu nedenle alışık oldukları geleneksel lezzetlerden vazgeçememekte, her defasında da aynı lezzeti bulmak

istemektedirler. Trabzon Vakfıkebir Ekmeği de asırlardır Karadeniz Bölgesi'nde, ekşi hamur yöntemiyle yapılan geleneksel ekmek çeşitlerimizden sadece bir tanesidir. Bu ekmeğin tipik özelliği, indirek hamur metodunun uygulanması, kalın sert kabuklu, iri gözenekli, işlem süresinin uzun ve toleransının yüksek, daha aromatik, daha kaliteli, yüksek hacim ve gramajda olması, geç bayatlaması ve pişirme sıcaklığının düşük olmasıdır (Kotancılar *vd.* 1998).

Bu geleneksel tadı her zaman aynı şekilde tüketiciye sunmak oldukça zordur. Çünkü ülkemizde ve dünyada üreticiler kısa sürede ve kapasitenin üzerinde ekmek üretmeyi hedeflediklerinden, tüketiciyi geleneksel ekmek lezzetinden uzaklaştırmaktadırlar. Günümüzde %2-3 oranında kullanılan mayanın %5-6 oranına çıkarılması ile fermentasyon sürecinin en aza indirgenmesi, ekşi maya kullanımından tümüyle vazgeçilmesi sonucunda, alışılmış arzu edilen ekmek aromasından uzaklaşmış, bunun sonucunda süngerimsi yapıda kek benzeri ürünler tüketime sunulmaya başlanmıştır.

Trabzon Vakfıkebir Ekmeği, ülkemizin her yöresinde iyi bilinen ve talep edilen bir ekmek çeşididir. Karadeniz Bölgesi'nin çok göç vermesi nedeniyle göç edenlerin ekmek alışkanlıklarını gittikleri bölgeye taşımaları, bu ekmeğin yaygınlaşmasını sağlamıştır. Yöre insanı dışında da insanların bu ekmeği tanımaları beğenmeleri ve talep etmeleri üzerine, girişimciler Vakfıkebir ekmeği üretmek üzere Türkiye'nin her yerinde "Meşhur Trabzon Ekmeği" sloganı ile ekmek fırınları açmasına sebep olmuştur. Karadeniz'de tabiatın yerleşime müsait olmadığı, evlerin yerleşim merkezlerine çok uzak ve ulaşımın uzun sürmesi sebebi ile, uzun raf ömürlü bir ekmek çeşidine ihtiyaç olması tabidir. Yörede bu nedenle böyle bir ekmeğin üretilmesi zaruri hale gelmiş olabilir.

Karadeniz'de ekmek üreten fırıncıların genel kanısı, ülkenin diğer yerlerinde Vakfıkebir ekmeğinin aynı kalitede üretilmemesinin nedenlerini ekmeğin yapılış yönteminden çok bölgenin doğasından, kullanılan ekşi mayadan kısaca üretimin her aşamasındaki bölgeye ait farklardan kaynaklandığını ifade etmektedirler.

Ancak yöre dışında üretilen Vakfıkebir ekmeği orijinininden farklı bir tat, aroma, hacim, raf ömrüne sahiptir. Bundan dolayı, orijinal ekmeğin neden bölge dışında aynı kalitede üretilmemesinin sebeplerini araştırmak gerekmektedir. Bu amaçla, öncelikle ekmeğin yapısında bulunan temel özellikleri (mikrobiyolojik, aromatik) incelenmiştir.

Ekşi hamurlar üretim farklılıklarına göre üç gruba ayrılırlar;

TipI: 20-30°C’de sürekli gelişmeye bırakılarak elde edilen geleneksel hamurlardır. Çoğunlukla geleneksel hamurlarda üç aşamalı fermentasyon prosesleri kullanılır (Hammes ve Gänzle 1998). *Lactobacillus sanfrancisco* ve *Lactobacillus pontis* predominant laktik asit bakterileridir (Vogel *et al.* 1999). Aynı zamanda *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus brevis*’de bazı hamurlarda bulunmaktadır.

TipII: Fırıncılar maya ilavesi ile hamurun kabarması sonucunda elde ettikleri ekşi hamurlardır. Bu tip ekşi hamurda çok daha az zaman harcanır. Tek bir fermentasyon aşaması vardır ve sıcaklık 30°C’nin üzerindedir. TipII hamurlar çoğunlukla endüstriyel ürünlerde kullanılır. Dominant türler, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri* (Stoltz *et al.* 1995, Hammes ve Gänzle 1998), *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus fermentum* (Hammes ve Gänzle 1998), *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus amylovorus*’dur (Vogel *et al.* 1999).

TipIII: Hamurların kurutulmuş prepasyonlarıdır. Bunlar ekşi hamurların dondurulup-kurutulması sonucu ile elde edilir (Hammes ve Gänzle 1998).

Biyolojik bir metot olan fermentasyon ilk kez M.Ö. 6000 ve 1000 yılları arasında bira, ekmek, yoğurt, peynir ve et için kullanılmıştır. Bunlara ilaveten baharatlar ve otlarda kullanılmıştır. 1864 yılında Louis Pasteur gıdalardaki mikroorganizmaların bayatlamaya neden olduğunu ispatlamıştır (Wood 1995).

Ekşi hamurdaki laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan asitleşme, nişastanın mikrobial hidrolizi ve proteolitik etki, ekmeğin depolanması sırasında oluşan fizikokimyasal değişiklikleri meydana getirir ki, ekmeğin sertleşmesi ve bayatlamasının gecikmesi üzerine pozitif bir etki yapar (Corsetti *et al.* 2000).

Ekşi hamurdan elde edilen ekmeklerin karakteristikleri üzerindeki incelemelerin çoğu bu hamurun mikroflorası üzerinde yoğunlaşmaktadır. Çünkü bu tür ekmeklerin elastisitesi, kabarma özelliği, lezzeti ve raf ömrü gibi özellikleri, içindeki laktik asit bakterileri ile mayaların aktifleşme ve aralarındaki etkileşime bağlıdır (Hansen ve Hansen 1993).

Yaklaşık 5000 yıldır laktik asit bakterileri ve doğal mayalar ile üretilen iki fermentasyon reaksiyonu ekmek ununu maya ile kabartmak için kullanılmaktadır. Son 100 yılda ise mikroorganizmalar saf kültürler hazırlanarak ticari ekşi hamur ekmeklerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Wood 1995).

Laktik asit bakterileri, laktik asiti şekere dönüştürebilme yeteneklerinden dolayı deneysel olarak veya kesin bir biçimde bütün dünyada birçok gıda ve yem yapımında, peynir, yoğurt gibi süt ürünlerinde, zeytin gibi fermente edilmiş meyvelerde, sucuk ve ekşi hamur ekmeğinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır.

Laktik asit bakterileri grupları genetik olarak farklılıklar gösterir. Fermentasyon kapasitelerinden dolayı gıda endüstrisinde *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* önemli rol oynar. Bunlar, yaygın bir şekilde peynir, yoğurt, ekşi hamur ve diğer fermente edilmiş gıda maddelerinin üretiminde starter kültürü olarak kullanılmaktadır.

Fermentasyonla çiğ materyaller, mikroorganizmalar (maya, küf ve bakteriler) ile kabul edilebilir kalitede gıdalara dönüştürülür. Doğal fermentasyonda arzu edilen mikroorganizmaların gelişmesi için uygun şartlar ayarlanır ve bunun sonucunda ürünün

özel karakteristiğini veren metabolik ürünler üretilir. Ancak istenen mikroorganizmaların gelişmemesi veya patojenlerin gelişmesi durumunda kontrollü fermentasyon tercih edilir. Kontrollü fermentasyon için mikroorganizmalar izole edilir ve karakterize edilir. Daha sonra starter kültür olarak saklanır. Starter kültürler çığ (işlenmemiş) materyallere büyük sayıda ve en elverişli şartlarda inkübe edilir. Fermente edilmiş gıdaların tüketimi 1970'li yıllardan itibaren büyük bir artış göstermiştir. Bunlar, yoğurt, tereyağı, fermente edilmiş sosis ve geleneksel gıdalar (kefir, kumiss, tofu, geleneksel ekmekler) gibi ürünlerdir. Fermente gıdaların tüketimindeki artışın sebeplerinden biri de tüketicilerin bu gıdaların doğal ve sağlıklı olduğunu düşünmeleridir. Çünkü canlı mikroorganizmaların büyük miktardaki tüketimi, bilinçli tüketiciler için herhangi bir sakınca içermemektedir (Hansen *et al.* 1989).

Buğday ekşi hamur ekmekleri son yıllarda popüler hale gelmiştir. Çoğu zaman mümkün olan en iyi kalitede olmasalar da belki de bu olay starter kültürü veya hamurun nasıl hazırlanmasının gerektiğine ilişkin bilgi olmamasından kaynaklanmaktadır. İyi kalitede ekmek üretiminde uygun olarak hazırlanmış hamur esastır. Bütün ekşi hamur türlerinde başlangıçta bir starter kullanılır. Starterler olgunlaşmış bir hamurdan alınabildiği gibi, una havadan karışan bakteriler tarafından meydana getirilen doğal bir fermentasyonla da üretilmektedir. Bakteriyel kültürler olarak da kullanılan starterler, saf hamur kültürü veya starter kültürü olarak da adlandırılır (Brummer ve Lorenz 1991).

Laktik asit bakterileri ve bunların ürünleri olan gıdalar uygarlığın ilk zamanlarından beri vardır ve tükettiğimiz ürünlerin bir çoğunda bulunur. Bu sebepten dolayı bu ürünlerin güvenli ve doğal olması tüketiciler tarafından istenir. Ayrıca laktik asit bakterilerinin üretimiyle önemli bir çok patojen mikroorganizmanın gelişimi engellenir ve raf ömrü artırılır. Laktik asit bakterileri peynir, süt ve ekşi hamur gibi gıdaları korur (Corsetti *et al.* 2000).

Ekmek üretiminde laktik asit starterleri en sık kullanılanlardır (Gilliland 1988). Laktik asit bakterilerinin başlıca fonksiyonu asit ve lezzet oluşumuna katkıda bulunmaktır (Tunail ve Köşker 1986, Özalp 1988, Olson 1990). *Lactobacillaceae* familyasına ait

olan laktik asit bakterileri doğada çok yaygın oluşları, birçok gıda maddesinde sıkça rastlanan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında teknolojik açıdan önemli rol oynamaları nedeniyle gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır. Familyanın değişik özelliklerinin yanı sıra ortak özellikleri de Gram (+), katalaz negatif ve genellikle hareketsiz oluşlarıdır. Laktik asit bakterileri şekerleri fermente ederek karakteristik fermentasyon ürünü olan laktik asiti üreten, çubuk ve kok şeklinde bakteriler olup, doğada yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Şahin 1990).

Laktik asit bakterileri, heksozdan CO₂, laktik asit, asetik asit, etanol ve mannitol üreten heterofermentatif laktik asit bakterileri ve heksozdan esas olarak laktik asit üreten homofermentatif laktik asit bakterileri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Cinsler arasında ve hatta türler arasında bile çok büyük metabolik çeşitlilik olduğu belirtilmektedir (Gaudy ve Gaudy 1980, McDonald *et al.* 1987).

Ekşi maya tekniğinin üç önemli fonksiyonu mayalama, asit oluşumu ve aroma gelişimidir. Yapılan çalışmalar sonucunda, buğday ekşi hamur ekmeklerinde, ürünün karakteristiği önemli ölçüde laktik asit bakterilerinin ve mayanın aktivitesine bağlı olduğu ortaya konulmuştur. Mayaların, ekşi maya hamurunun kabarmasından sorumlu olduğu, heterofermentatif laktik asit bakterilerinin de tek başlarına yeterli kabarma kapasitesinde etkili olduğu belirtilmektedir. Laktik asit bakterileri ekmeğin elastisitesini, asitliğini ve lezzetini etkilemektedir. Özellikle heterofermentatif laktik asit bakterileri lezzet oluşumundan sorumlu olup, hamur ve ekmeğe tipik ekşi maya ekmeklerine özgü duyu özelliklerinin oluşmasında rol oynamaktadırlar. Homofermentatif laktik asit bakterileri ise iyi bir kabuk elastisitesi verecek asitliği oluştururken ekmeğin lezzeti üzerine önemli bir katkısı yoktur (Gobbetti *et al.* 1994a, Gobbetti *et al.* 1995). Aroma maddesi oluşumu güçlü ve uzun fermentasyona ihtiyaç duymaktadır (Sugihara 1985, Gilliland 1988). Laktik asit fermentasyonu çok kompleks olup, birçok aşamadan meydana gelir. Homofermentatif laktik asit fermentasyonunda temel materyal D-Glikoz olup EMP yolu ile pürivik asite dönüşmekte pürivik asit ise daha sonra enzimatik olarak D ve L-laktik asite indirgenmektedir. Heterofermentatif

laktik asit fermentasyonunda temel materyal D-Glikozdur. D-Glikoz HMP (Hegsozmonofosfat) yolu ile pürivik asit (ki bu daha sonra laktik asite indirgenir) ve asetil fosfata indirgenmekte, asetil fosfatta asetik asit ve CO₂ ya da bazı türlerce etanole dönüşmektedir (Seibel ve Brummer 1991).

Ekşi maya yapısında, homo ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ve mayaları değişen oranlarda içermektedir. Bunlar *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus crusei*, *Pediococcus saitoi*, *Lactobacillus boidinii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. exigus* *S. fructuum* gibi türlerdir (Thomsen ve Andersen 1988, Hammes 1990, Brummer ve Lorenz 1991).

Ekşi maya ekmekleri teknolojik yararlarının yanı sıra mikrobial bozulmalara karşı gösterdikleri direnç açısından da önemlidirler (Salovaara 1998). Ekmekte bozulmaya neden olan mikroorganizmalar; küfler ve rop hastalığının sebebi olan *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* ve *Bacillus cereus*'tur. Bu mikroorganizmalar protein ve nişastayı mikrobial amilaz ve proteazlar ile parçalayarak ve yapışkan polisakkaritler oluşturarak bozuk renkli, yapışkan bir ekmek içi ve kavunumsu bir koku oluştururlar. Un ve diğer hammaddelerdeki *Bacillus* sporları ısıya dayanıklıdır ve bazıları pişme işlemi sırasında en fazla 97-101°C'ye çıkabilen ekmek içi merkezindeki sıcaklığa birkaç dakika dayanabilmekte, sporların çoğu inaktif hale gelmeden ekmek içinde kalmakta, gelişme şartları sağlanınca vejetatif çoğalmaya neden olmaktadır (Bailey ve Von Holy 1993).

Salovaara (1998), ekmek yapımında ekşi maya hamuru kullanılmasının fonksiyonlarını şöyle sıralamıştır:

- Fermentasyon sırasında üretilen laktik ve asetik asitler düşük pH ve bozulmaya neden olan floranın inhibisyonu ve kontrolü, ekmeğin küflenerek bozulmanın geciktirilmesi, rop hastalığına neden olan *Bacillus subtilis*'in gelişiminin engellenmesi,

- Protein ve polisakkaritlerin şişmesi ve un bileşenlerinin modifikasyonu, çavdar hamurunun ekmek pişirme özelliklerinin geliştirilmesi, çavdar ekmeğinin kabuk özelliklerini geliştirmesi, çavdar ununun enzim aktivitesinin özellikle α -amilazın kontrolü,
- Mayanın ve heterofermantatif laktik asit bakterilerinin kabarma etkisi, daha kolay pişirilebilir hamur, daha yumuşak ve daha lezzetli ekmek kabuğu,
- Laktik ve asetik asitler ile diğer fermentasyon ürünleri gibi aroma bileşenlerinin birikimi,
- Fitat yıkımı yoluyla mineral biyoyararlılığının artırılması, doğal imajı ile ürünün karakterizasyonu,
- Ayrıca başka bir araştırmada ise hamur özelliğinin düzelmesi, ekşi maya hamuruna elastik özellik kazandıran ve suda çözünmeyen bir protein olan glutenin ekmek içerisinde pozitif etki yapmasına sebep olmaktadır (Salovaara ve Spicher 1986).

Ekmek aroması, ekmekte duysal olarak hafif bir etki yaratmasına karşın oldukça kompleks bir reaksiyon sonucunda meydana gelir. Ekmekte arzu edilen bu duysal özelliklere, formüle ilave edilen katkıların cinsi, kalitesi (un tipi, tuz ve şeker miktarı) hamur hazırlama şekli, fermentasyon koşulları, pişirme tipi gibi çeşitli faktörler etkilidir (Margality 1981). Kullanılan mikroorganizma türleri fermentasyon üzerine önemli etki yapmaktadır. Örneğin; ekşi hamur fermentasyonu ile üretilen ekmeğin aroması sadece ekmek mayası (*S. cerevisiae*) kullanılarak üretilenden çok daha zengin olmaktadır (Garly 1993, Hansen ve Hansen 1993).

Ekmekte arzu edilen bu duysal özelliklere kısmen formülasyona ilave edilen katkıları, esas olarak da fermentasyon ve pişirme sırasında oluşan kimyasal bileşikler neden olmaktadır (Dubois 1984, Özkaya 1984). Uçucu ve uçucu olmayan bu bileşiklerin hiç birisi ekmek yapımında kullanılan maddelerde bulunmayıp, bunların bir kısmı fermentasyon sırasında enzim ve mikrobiyal faaliyet sonucunda oluşur, bir kısmı da indirgen şekerlerle amino asitlerin yüksek sıcaklıkta birleşmesiyle meydana gelen ara ve son ürünlerdir (Margality 1981).

Ekmeğin lezzeti, içerisindeki ingredientlere, hamur fermentasyonuna ve pişirme prosesine bağlıdır. Ekmek kırıntısının tadı esas olarak fermentasyon sırasındaki enzimatik reaksiyonlardan oluşurken, ekmeğin kabuğundaki lezzet pişirilme sırasındaki temel reaksiyonlara bağlıdır (Hansen ve Hansen 1996). Hamurda lezzet bileşenlerinin çoğu şekerlerin maya fermentasyonu ile oluşur. Mayadan başka mikroorganizmalar da fermentasyon esnasında lezzet maddelerinin oluşmasında rol alırlar. Maya azot kaynağı olan amino asitleri kullanır. Fermentasyonda alfa-keto karboksilik asitler ve amonyak oluşur. Karboksilik asitler, CO₂ ve aldehit oluştururlar. Aldehitlerin redüksiyonu veya oksidasyonu ile alkoller ve asitler meydana gelir (Tamerler 1987, Karaoğlu ve Kotancılar 2002).

Ekşi hamurun kabarması ve alkol fermentasyonunda en etkili olan organizmalar mayalardır. Etkili maya mikroflorasının tespit edilmesi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda bulunan mayaların *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* ve *Torulopsis* cinslerine ait türler oldukları görülmüştür (Salovaara and Salovainen 1984, Spicher 1986).

Alkol fermentasyonu ticari maya ile yapılan ekmekte daha baskın olurken, buğday ve çavdar unu ve ekşi hamur yöntemi ile yapılan ekmeklerde laktik asit fermentasyonu daha baskındır. Beyaz ekmeğin hafif asit tadı, maya ve bakteriyel fermentasyon sonucu oluşan asetik, laktik, propionik ve pürivik asit gibi suda çözülebilir organik asitlerden kaynaklanmaktadır (Jackel 1992, Martinez-Anaya 1996, Karaoğlu ve Kotancılar 2002). Laktik asit bakterilerinin aroma oluşumuna etkileri, sadece karbonhidrat metabolizmasıyla sınırlı olmayıp serbest amino asit oluşumunda da rol oynamaktadırlar. Laktik asit bakterilerinin içerdiği proteaz ve peptidaz enzimleri fermentasyon sırasında hamur proteinlerini hidrolize ederek amino asitleri serbest hale geçirmekte ve böylece pişirme sırasındaki aroma bileşeni oluşumuna da dolaylı olarak katkıda bulunmaktadır. (Spicher ve Nierle 1984, Hansen *et al.* 1989, Collar *et al.* 1991, Hansen ve Hansen 1993).

Amino asitler maya ve laktik asit bakterilerinin aktivitesini artırır. Amino asit kullanım mekanizması, daha sonra asitlere okside edilen yada alkollere indirgenen aldehit oluşumuyla bir yada iki karbon atomunun kaybına dayanmaktadır. Bu mekanizma ile amino asitlerden bazı yüksek molekül ağırlıklı alkollerin oluşumu şekil 1.1’de gösterilmiştir (Martinez-Anaya 1996).

Tirosin		tirosol
Triptofan		triptofol
Fenilalanin		β -feniletanol
Valin		2-methyl-1-propanol
Lösin		1-pentenol
Alanin		etanol

Şekil 1.1. Alkol üretiminde amino asit prekursorları (Martinez-Anaya 1996).

Fermentasyonda laktik asit bakterileri, sitrat, fumarat, glukonat, malat, 2-oksaglutarat, prüvat gibi substratları anaerobik olarak metabolize eder ve asetoin, diasetil, 2,3-bütillenglikol gibi aroma bileşikleri oluşturur. Buğday ve çavdar unları düşük miktarlarda bu substratları içerir (Martinez-Anaya 1996, Karaoğlu ve Kotancılar 2002).

Ekmek yapımında temel madde olan un kendine has bir aromaya sahiptir. Un, ekmek yapımında bazı değişikliklere uğrayarak da ekmek aromasına katkıda bulunur. Ayrıca ekmek aromasına etkileri az olan uçucu bileşikler bazı aroma maddelerinin ön maddelerini içermektedirler (Martinez-Anaya 1996). Una karışan kepek ve ruşeym parçacıklarının aromayı olumsuz yönde etkiledikleri ve bu ekmeklerin hissedilir derecede farklı bir aromaya sahip oldukları ortaya konulmuştur (Chang and Chanbers 1992, Kotancılar vd. 1998).

Ekmek aroması ile ilgili üç temel enzimatik sistem α ve β -amilazlar, proteazlar ve lipoksigenazlardır. Aromada ikinci derecede katkıda bulunan enzimler ise invertaz, oksidaz ve lipazlardır (Karaoğlu ve Kotancılar 2002).

Hamur fermentasyonu sırasında oluşan aroma maddeleri pişirme sırasında aroma bileşiklerine dönüşmekte ve pişirme işlemi birçok aroma bileşeninin buharlaşmasına sebep olsa da bir kısmı pişmiş üründe kalmaktadır (Seibel and Brummer 1991).

Ekmek yapımında hamur mayasının kullanımı; gerçek orijini eski zaman medeniyetleri içinde olmakla birlikte mayanın aynı zamanda bira yapımını gerçekleştiren, Mısırlılar tarafından kullanıldığı kabul edilmektedir. Hamur mayasının kullanımı; diğer Akdeniz ülkelerine de yayılmış ve son olarak Batı Avrupa ülkelerine Romalılar tarafından getirilmiştir. Maya, 1700'lerde, bira yapımında bir yan ürün olarak elde edilmiş ve hamura ilave edilmiştir. 19. yüzyılın ortalarında ilk spesifik ekmek mayası Avusturya'da geliştirilmiş ve bu çalışma Hollanda'da bir maya fabrikasının kurulması ile devam etmiştir. Yaş pres mayanın geliştirilmesi, daha iyi saklanma kalitesine sahip olması ile mayanın daha geniş bir bölgede kullanımı sağlanmıştır. M.Ö. birkaç bin yıldan-19. yüzyılın ortalarına kadar insanoğlu fermentasyon işlemi, canlı bir mikroorganizmanın neden olduğunu bilmeden kullanmıştır. Bunun esrarengiz kalmasının nedeni de; organizmanın gözle görülmeyecek kadar küçük ve mikroskopun icat edilmemiş olmasıdır.

Maya mikroskobik, tek hücreli bir organizma olup mantar olarak sınıflandırılmaktadır. Maya hücreleri yaklaşık olarak oval şekilde, 7-17 mikron uzunlukta ve bir gram maya yaklaşık 15 milyon bağımsız hücre içermektedir. Yaklaşık 600 adet bilinen maya türü mevcut olmakla birlikte bunlardan sadece birkaç tanesi ticari öneme sahiptir. Ekmek üretiminde kullanılan maya türü; *Saccharomyces cerevisiae* "the sugar fungus of beer"dır.

Vogel (1999)'nin belirttiği gibi, ekşi hamurlarda mayaların değişik türleri bulunmaktadır. *S. cerevisiae* en çok bulunan veya en çok ilave edilen maya türüdür. *S. cerevisiae* oranı, mayalar için güvenilir identifikasyon ve sınıflama yöntemlerinin olmaması nedeni ile göreceli olarak fazla bulunuyor olabilir. Mayaların tespitine

yönelik sistemler ve yöntemler geliştirildiğinde *S. cerevisiae*'nın çok yüksek oranda tespit edilemeyeceği düşünülmektedir (Gobbetti 1998).

Ekmekte aromanın diğer önemli kaynağı ekmeğin kabuğudur. Çoğu tüketiciye göre, özellikle kabuklu Fransız ve İtalyan ekmeklerinin kabuk aroması tercih edilmektedir (Jackel 1992). Ekmek aromasının oluşmasında başlıca rolü üstlenen, pişirme sırasında cereyan eden karamelizasyon ve Maillard tipi kahverengileşme reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar kabukta meydana geldiğinden ekmeğin kabuğu iç kısımlarından aromaca daha zengindir. Buradaki aroma maddeleri daha sonra ekmeğin içine nüfuz etmektedir. Kabuk oranı fazla olan ekmeklerin tava ekmeklerinden aromaca daha zengin olduğu kabul edilmektedir (Ertugay 1983, Tamerler 1987, Elgün ve Ertugay 1999).

Pişirme sırasında oluşan aroma tipi, amino asit yapısından son derece etkilenmektedir. Mesela, prolinle birlikte dehidroksiaseton, kraker gibi bir aroma verirken, lizin, arginin ya da histidinle glikoz taze bir ekmek aroması verir. Şeker tipi, aromadan çok reaksiyon oranını etkilemektedir (Karaoğlu ve Kotancılar 2002).

Bir zamanlar gıda teknologlar, beslenme uzmanları ve tahılcılar, şayet besinsel ya da diyetetik faydaları olacaksa, tüketicilerin aroması azaltılmış ya da değiştirilmiş ürünleri kabul edebileceklerini düşünmekteydiler. Tecrübeler bunun böyle olmadığını gösterdi. Tüketiciler besinsel faydaları ister ve aynı zamanda alışık oldukları hoşlandıkları aromayı da tercih ederler. Beyaz ekmeğin hafif asit tadının, maya ve bakteriyel fermentasyon sonucu oluşan asetik, laktik, propionik ve prüvik asit gibi suda çözünebilir organik asitlerden geldiği bildirilmektedir. Ayrıca taze ekmeğin aromasının, kaproik, izokaproik, laurik, miristik ve palmitik gibi organik asitlerden olduğu kadar etil, amil ve izoamil gibi volatil alkollerin bileşiminden oluştuğu bildirilmektedir. Ekmek kabuğu ve kabuğa yakın kısımlarda bulunan karboniller, aseton, hidrosimetil furfural, izovaleraldehit, asetaldehit ve diğerlerini içermektedir. Ekmek aromasının çoğu, pişirme ve soğutma periyodu sırasında olduğu kadar fermentasyon süresince, kendi ingredientlerinden ve onların interaksiyonundan ileri gelir. Aromaya katkıda

bulunan ingredientler buğday unu fermente olabilir karbonhidratlar, maya, tuz ve şorteningdir. Ayrıca su da aromaya katkıda bulunan ingredientlerin interaksyonlarında rol oynar. Tuz, ekmek aromasına katkıda bulunan major bir maddedir. Tuzsuz pişmiş ekmek, yavan ve nişasta tadındadır. Şeker ekmeğin aromasına katkıda bulunan önemli bir maddedir. Ekmeğin tatlı, hoş bir lezzet alması için, %7-10'dan daha az oranda (una katılma oranı) katılması söz konusudur. Uygun kabarma ve tam bir fermentasyon için bu oran genellikle %4 civarındadır. Ortamdaki şekerin bu miktarı, maya tarafından karbondioksit (%46.5), etanol (%48.5) ve değişik aldehitler, ketonlar, alkoller, organik asitler, esterler ve diğer aroma ön maddelerine dönüştürülür. Aroma interaksyonları, diğer ingredientler ve fermentasyon süresince üretilen 100 ya da fazla volatil bileşikler arasında meydana gelir. Fermentasyon sonucu oluşan aroma maddelerinin, maya yerine standart kimyasal kabartıcılar kullanıldığı zaman daha belirgin olacağı açıktır (Jackel 1992).

El Dash (1971)'a göre flavor ekmekte en fazla taktir edilen doğal duyudur. Tüketiciler tarafından tecrübe edilen total duyuyu kapsayan bu terim: aroma ve tat algıları, dokunma duyular (tazelik), ağızda ve hatta bazı yazarlara göre dış görünüşdür (Martinez-Anaya 1996).

Ekmek aroması pek çoğu koku karakterinde olan pek çok bileşenin karışımıdır. Diğer gıdalarda olduğu gibi bu bileşenlerin hiçbiri tek başına ekmek aromasının anahtar bileşeni olarak düşünülemez. Fakat belirlenen nispi oranlarıyla sinestik bir yolda rol alırlar. Diğer yandan ekmekte belirlenen bir maddenin varlığı ekmekte aromaya iştirak etmeyebilir. Bununla birlikte konsantrasyonlar belli seviyenin üzerinde olmak zorundadır. Ekmek aroması bilim adamları için karmaşık konudur. Ekmek aromasının karakteristik özelliği identifiye edilen bileşiklerin herhangi birisiyle tayin edilemez. Fakat onlar ekmek içindeki kimyasal bileşenlerin kombinasyonunda oluşur (Martinez-Anaya *et al.* 1990).

Jackel (1992)'e göre ekmek aroması ingredientler, fermentasyon, degradasyon, termal reaksiyonlar gibi dört farklı kategoriden oluşur. Ekmek yapımındaki temel

ingredientlerden olan un, farklı aroma karakterlerine sahiptir. Ayrıca ekmeğin aromasına etkileri az olan volatil bileşenleri ve bazı maddelerin aroma prekursorlarını içermektedir.

Şekerlerin maya tarafından fermentasyonu ekmeğin aromasına farklı karakterler kazandıran pek çok volatil bileşiklerin oluşmasına sebep olur. Pişirme sırasında şekerlerde karamelizasyon ve enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları ekmeğin kabuk aroması ve rengini oluşturur. Bu durum fermente edilmemiş hamurdan yapılan ekmeklerin, fermente edilen hamurlardan yapılan ekmeklere kıyasla farklı bir aromaya sahip olmasıyla kanıtlanmıştır. Uzun fermentasyonda son derece önemli olan laktik asit bakterileri ve mayalanmış ürünler duyusal aromayı artırır (Martinez-Anaya 1996).

Geleneksel olarak ekşi hamurdan ekmeğin üretimi ekonomik ve sosyal alanda çok önemli rol oynamaktadır. Fakat hijyen standartlarının giderek yükselmesi hamura üretim sırasında dışarıdan bulaşan yabancı mikroorganizmaların tanımlanmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bunu başarmak için dünyanın değişik bölgelerinde üretilen ekşi hamurlarda yapılan biyokimyasal, morfolojik taramalar sonucunda, mayaların ve laktik asit bakterilerinin baskın gruplar olduğu tespit edilmiştir (Rocha and Malcata 1999).

Günümüzde geleneksel ekşi maya ile yani laktik asit fermentasyonuna dayalı ekmeğin üretimi gittikçe önem kazanmaktadır. Dünyada, bizim Trabzon ekmeğine benzer geleneksel ekmekler oldukça fazladır. Orta ve Doğu Avrupa, İskandinav ülkeleri ve Kuzey Amerika’da oldukça yaygın olarak üretilip, tüketilmektedir. Örneğin San Francisco Fransız ekmeği (Sugihara *et al.* 1970), geleneksel İsveç çavdar ekmeği (Lönner *et al.* 1986) ve İtalya’da tatlı ekmeğin çeşidi olan “Panettone” (Gobbetti *et al.* 1994a), geleneksel Alman (Spicher ve Schröder, 1978) ekmekleri ve Sudan’da yapılan ekşi hamurun starter olarak kullanıldığı “Kisra” bunlar arasında sayılabilir (Hamad *et al.* 1992).

Ekşi maya hamuru konusunda yapılan çeşitli çalışmalarda mikrofloranın belirlenmesine çalışılmıştır. Ekşi maya hamurunda maya ve bakteriler birlikte faaliyet gösterdiğinden

dolayı bu birliktelik doğal floraya dayanmaktadır. Sonuç olarak ekşi hamur ekmeği uygun hacim, güçlü aroma, iyi bir ekmek içi yapısı ve uzun raf ömrüne sahip oluşu ile tercih edilmektedir (Pederson 1979, Barber *et al.* 1989, Seibel and Brummer 1991).

Vakfıkebir ekmeği üzerinde yaptığımız bu çalışma, geleneksel yöntemle üretilen ve ülkenin hemen her yöresinde tüketilen bu popüler ekmeğin mikrobiyolojik ve aromatik özelliklerine ışık tutacak niteliktedir. Çalışmamız bu konuda yapılan ilk çalışmadır. Vakfıkebir ekmeğinin aromatik özelliği, bileşimindeki volatil maddelerin katkısı ile oluştuğu bir gerçektir.

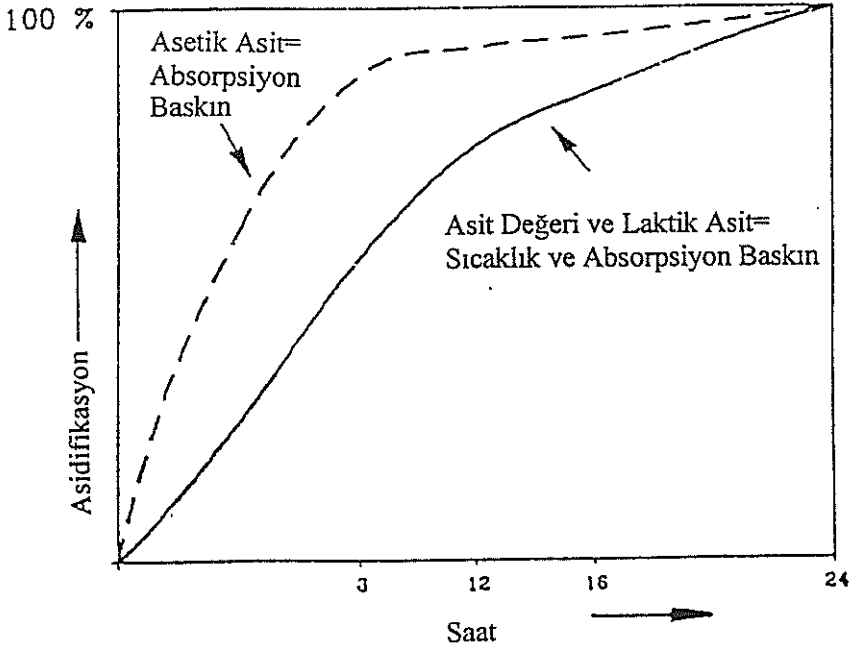
2. KAYNAK ÖZETLERİ

Federal Almanya'da ekşi maya üzerine yapılan bir çalışmada farklı su absorpsiyonu (buğday unundaki %60-100-150), farklı ekşi hamur oranları (%0,5-1-5-10-20), hamur sıcaklığı (25-30-35°C), ekşi hamur olgunlaşma zamanları (24 saate kadar) ve farklı küle sahip buğday unları (%0.55-1.05) kullanılarak; gaz üretme gücü, laktik ve asetik asit oranları araştırılmıştır. Buna göre; %60-100-150 su absorpsiyonlu buğday unları ve %0.5 ekşi hamur ilavesi yapılmış deneylerde asidifikasyon kaydedilmiştir. Saf kültür konsantrasyonu homo ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ve aynı zamanda ekşi hamurda değişen konsantrasyonlarda ve kompozisyonlardaki ekşi hamur mayaları starter olarak kullanılmıştır. Hamura, %0.5-5 oranındaki ekşi hamur ilave edildiği zaman yavaşça başlayan bir asit formasyonu meydana gelmiş olup, daha yüksek oranlar daha düşük son asit değeri üretilmiştir. Ekşi hamur gelişimi için %1-5 oranında ekşi hamur oranları hızlı bir pH düşmesine sebep olmamış, ekşi hamurdaki aktif mikroorganizmaların yeteri kadar gelişmesine imkan vermişler; bu da hamuru olası bir istenmeyen bir fermentasyondan korumuştur. Bazı koşullarda hamurda %10-20 ekşi hamur konsantrasyonu uygun bulunmuş, %0.55 küle sahip unlardan yapılan ekşi hamurlara %0.3 oranında maya ilavesinin 15 saate kadar asidifikasyonu azalttığı tespit edilmiştir. Hamurun 24 saatlik olgunlaşma periyodundan sonra, asitlerin oranına ekşi hamur miktarının büyük bir etkisi bulunmamış, %0.55 küle sahip undan yapılan ekşi hamurlarda oran üzerinde küçük bir etkisi olduğu, %1.05'lik küle sahip undan yada tamamen beyaz undan yapılan ekşi hamurlarda dikkate alınacak bir fark olmadığı görülmüştür. En düşük laktik asit oranı elde etmek için kullanılması gereken ekşi hamur miktarı undaki kül miktarına göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. %0.55'lik küle sahip unlar ile en düşük laktik asit içeriği %20 ekşi hamur ilavesi ile elde edildiği, halbuki %1'lik küle sahip un ise yalnızca %1'lik ekşi hamura ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir (Brummer and Lorenz 1991).

Ekşi hamurların ekmek yapımında kullanılması, yapım süresinin uzaması ve üretimin standart olmayışı gibi dezavantajları içermektedir. Kurutulmuş ekşi hamurların elde edilmesinin kolay olması bu problemlerin çözülmesine yönelik bir girişim olarak

sunulmuştur. Ancak kurutulmuş ekşi hamurların büyük bir dezavantajı, aromasının olmayışdır (Röcken and Voysey 1995).

Buğday ekşi hamurunda asidifikasyonun incelendiği bir araştırmada ekşi hamurun olgunlaşmasında başlangıçtaki asetik asit formasyonunun hızlı olduğu ve hamurun olgunlaşmasına göre daha kısa sürede maksimuma ulaştığı, olgunlaşma periyodunun sonuna kadar aynı seviyeyi korur. Laktik asit oluşumu ise daha yavaş ilerler, son asit değerleri uzun süreli hamur olgunlaşma periyodunun sonunda gözlenmektedir. Bunu sebebi şekil 2. 1'de görüldüğü gibi Laktik asit değerlerinin olgunlaşma sonunda en yüksek değere ulaşmasından kaynaklanır. Ortalama ısı ve absorpsiyon şartlarında hazırlanan ekşi hamurlarda asidifikasyon esas olarak 12 saat sonunda tamamlanır. Daha uygun koşullarda (daha sıcak ve daha yumuşak hamurlar) bu safhaya daha çabuk ulaşılır. Soğuk ve sert ekşi hamurlarda çalışıldığı zaman uygun asidifikasyonun elde edilmesi daha uzun olgunlaşma sürelerine ihtiyaç göstermektedir. Bu koşullar altında en elverişli seviyeye ulaşmak için 16 saate ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır. Laktik asit oluşumu esas olarak hamur sıcaklığından etkilenirken, absorpsiyonun ise en çok asetik asit oluşumundan etkilendiği tespit edilmiştir (Rabe 1981).



Şekil 2.1. Buğday ekşi hamur asidifikasyonu

Wood ve Hodge (1985), Salovaara (1998)'nin belirttiklerine göre Sanfrancisco ekşi maya ekmeginde baskın organizmalar olan *Candida milleri* (= *Torulopsis holmii*), *Saccharomyces exiguus*'un sporsuz formu ve *Lactobacillus brevis* var. *lindneri*, (= *Lactobacillus sanfrancisco*) bir çeşit simbiyotik yaşam sürmektedirler. Sanfrancisco ekşi maya hamurundan izole edilen mayanın maltozu kullanamayıp, ancak glukozu kullanabildiği, ayrıca sikloheximide dirençli ve asetik asite toleranslı olduğunu belirtmişlerdir. Ekşi maya ekosisteminde bu iki organizma arasında maltoz açısından herhangi bir rekabet söz konusu değildir. Çünkü *Lactobacillus brevis* maltozu kullanıp, glukozu açığa çıkarır, *C. milleri* ise glukozu kullanır. *Lactobacillus sanfrancisco* gelişme için maltoza ihtiyaç duyup glikozda az ya da hiç gelişmemektedir (Kline ve Sugihara 1971).

Yapılan bir çalışmada; Buğday ekşi hamurlarında heterofermentatif (*Lactobacillus brevis* 25a, B-21, L-62; *Lactobacillus sanfrancisco* L-99) ve homofermentatif (*Lactobacillus plantarum* B-39) laktobasiller tarafından üretilen asetik asit oluşumuna O₂ ve yüksek fruktoz içerikli ürünlerin (saf şeker, dönüşmüş şeker, fruktoz şurup) ilavesinin etkileri araştırılmıştır. Ekşi hamurun 44 saatlik fermentasyonundan sonra pH'sı ve toplam titre edilebilir asitlik (TTA), hamur ürünü ve suşa göre değişir. Beklenildiği gibi O₂'nin eklenmesi toplam titre edilebilir asitliğin *Lactobacillus plantarum* (15%)'dan ziyade heterofermentatif laktobasillerde (15-42%) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Fruktoz ilavesi sadece heterofermentatif suşlarda etkindir. Fakat genel olarak gözlenen oksijenleşmeden daha küçük bir etkiye sahiptir. Ekşi hamurda laktobasillerde asetik asit üretme yeteneği 44 saatte 0.16/100 gram unda 0.47, yani %0.65'i kadar değiştiğini bulmuşlardır (Martínez-Anaya *et al.* 1994).

Martínez-Anaya *et al.* (1990), dört maya (*Saccharomyces cerevisia*, *Saccharomyces fructuum*, *Candida boidini* ve *Hansenula suppelliculosa*) ve altı laktik asit bakterisi (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum* ssp. *arabinosus*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. cellobiosus*)'nin buğday hamurundaki aktivitelerini, mikroorganizmaların değişen tip ve sayılarında tek tek ve kombine olarak çalışmışlardır. Buğday hamurlarının laktik asit bakterileri 1.5 ve

3ml/100g una ($2.2-13.9 \times 10^{10}$ canlı hücre/ml) olacak şekilde iki grup halinde inoküle edilmiştir. Mayalarla kombinasyonları hazırlamak için en iyi performans gösteren seviye seçilmiştir. Mayalar hamurlara %2 ve %4 oranında *Saccharomyces cerevisiae* ($4.2-9.0 \times 10^9$ canlı hücre/g) ve %4-6 oranında diğer mayalar ($2.9 \times 10^9 - 3.1 \times 10^{10}$ canlı hücre/g) seviyelerinde olmak üzere iki şekilde ilave edilmiştir. Hamurun ve elde edilen ekmeğin pişirme kalitesi fermentasyon ve reolojik özelliklerini değerlendirmişlerdir. Bunlardan *Saccharomyces cerevisiae* haricindekilerde maya veya laktik asit bakterileri düzeyindeki artışın kullanılan mikroorganizmaların verimini artırmadığını, fakat *Saccharomyces cerevisiae* içeren tüm kombinasyonların yüksek ekmek kalitesi verdiğini belirtmişlerdir.

Rocha and Malcata (1999), değişik coğrafi bölgelerden aynı zirai yıl içerisindeki iki farklı zaman diliminde mısır ve çavdar ile üretilen ekşi hamurların mikrobiyolojik identifikasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada 400'den fazla laktik asit bakteri suşu izole edilmiş Biomerieux API galaties yöntemiyle taksonomik tanımlama yapılmıştır. En sık izole edilen maya *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelluculosa* olarak tespit edilmiştir. En sık izole edilen laktik asit bakterileri *Leuconostoc spp* (heterofermentatif) ve *Lactobacillus spp* (homofermentatif) olarak bulunmuştur. Laktobasiller arasında en baskın suşlar; *L. brevis*, *L. curvata*, Laktokoklarda: *L. lactis spp. lactis*, Enterekoklarda; *E. durans*, *E. faecium*, Streptokoklarda ise *S. constellatus* ve *S. equinus* olarak tespit edilmiştir.

Corsetti *et al.* (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, ekmeğin sertliği ve bayatlaması üzerine değişik ekşi hamur ve katkı maddelerinin kombine etkisini araştırılmış, *Saccharomyces cerevisiae* 141 ile üretilen ekmeklerde belirgin bir hacim artışı gözlenmiştir. Nişasta retrogradasyonunun etkili olduğu ve bu etkinin asidifikasyon seviyesine ve laktik asit bakteri suşuna bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışma *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus sanfranciscensis* 57, *Lactobacillus plantarum* 13 kullanılarak yapılmış, ekşi hamurlar standart ekşi hamur olarak seçilmiş ve bu hamurlara pentozanlar, endoksilenaz, *Lactobacillus hilgardii* 32 ilave edilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* 141, *Lactobacillus sanfranciscensis* 57, *Lactobacillus*

plantarum 13 ekşi hamurlarda en sık izole edilen ve ekşi hamur ekmeklerinin duyusal kalitesine pozitif etkisi olan suşlar olduğundan, standart olarak seçilmiştir. Ekşi maya ilavesi ile laktik asit bakterileri tarafından asitliğin artırıldığı, nişastanın mikrobiyal hidrolizi ve proteoliz sonucunda ekmeğin raf ömrü süresince fizikokimyasal değişikliklere neden olduğu ve bunun sonucunda ekmeğin sıklığı (firmness) ve bayatlamasında gecikmeye neden olduğuda belirtilmiştir. Laktik asit bakterileri (*Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus plantarum*) ve maya (*Saccharomyces cerevisia*) kullanıldığı zaman ekmek hacminde ve lezzetinde belirgin bir artış gözlenmiştir.

Vachon and Gelinas (1996), mayalanmış ve fermentasyona bırakılmış hamurlar üzerine yaptıkları çalışmada, laktik asit bakterilerinin (*E. faecalis*, *Leuconostoc cremoris*, *P. acidilactici* ve *P. damnosus*) etkilerini incelemişler, 24 saatlik fermentasyon sonucunda inoküle edilen laktik asit bakterilerinden laktik asit oluşumunun *P. acidilactici* ve *P. damnosus* ile yapılan örneklerde en yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar *Leuconostoc cremoris*, *P. acidilactici* örneklerde aseton, 1 propanol ve etanol oranlarının yüksek olduğunu da tespit etmişlerdir.

Boraam *et al.* (1993) tarafından yapılan bir çalışmada, geleneksel Fransız ekşi hamuru ile üretilen ekmeklerde fermentasyon için kullanılan laktik asit bakterileri ile mayalar incelenmiştir. En fazla izole edilen laktik asit bakterileri *Lactobacillus spp.*; *Lactobacillus plantarum* (%52), *Lactobacillus brevis* (%14), *Lactobacillus buchneri* (%8), *Lactobacillus casei alactosus* (%8), *Lactobacillus casei casei* (%6), *Lactobacillus casei rhaamonosus* (%2) olarak bulunmuştur. Aynı zamanda *Leuconostoc mesenteroides* ve *Pediococcus spp.* tespit edilen diğer suşlardır. İzole edilen mayalar ise *Saccharomyces cerevisiae* (%46.6) ve *Candida millieri* olarak tanımlanmıştır.

Javanainen and Linko (1993) yaptıkları çalışmada, buğday ekmeklerinin raf ömrünü artırmak için laktik asit ve propionik asit bakterilerini starter kültür olarak kullanmışlar, hamurun mayalanma kapasiteleri üzerine laktik asit ve propionik asitin etkilerini

incelemişlerdir. Mayalanma kapasitesinin ön fermentasyon boyunca oluşmuş asitler tarafından azaltıldığını belirtmişlerdir. 5.4-6'lık bir pH'ya 3.9-5.6'lık titrasyon asitliğine sahip olan ekşi hamurun raf ömrünün 10 gün arttığı tespit edilmiştir.

Corsetti *et al.* (2001) yaptıkları bir çalışmada, İtalya'nın güneyinde bulunan Apulia bölgesinden 25 buğday ekşi hamurunun mikroflorasını karakterize etmişlerdir. Ekşi hamurları başlıca *triticum durum* buğdayından üretilmiştir. Fizyolojik ve biyokimyasal testler ile yaklaşık 317 suşun %38'i tanımlanmış ve toplamda, izolasyonun %30'u *Lactobacillus sanfranciscensis* %20'si *Lactobacillus alimentarius*, %12'si *Leuconostoc citreum*, %7'si *Lactobacillus plantarum*, %6'sı *Lactococcus lactis spp. lactis*, %4 *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus acidophilus*, %2'si *Weissella confusa* ve %2'si *Lactobacillus delbrueckii spp. delbrueckii* olarak suşları saptanmış, *Saccharomyces cerevisiae* yüksek oranda bulunmuştur.

Gobbetti *et al.* (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, buğday ekşi hamurundan izole edilmiş birkaç tane *Lactobacillus* türünü, ekmek üretimi için starter olarak önermişlerdir. Toplamda izolasyonların %30 *Lactobacillus sanfransiscensis* olarak %20 *Lactobacillus alimentarius*, %14 *Lactobacillus brevis*, %12 *Leuconostoc citreum*, %7 *Lactobacillus plantarum*, %6 *Lactococcus lactis spp lactis* olarak saptamışlar, %2 *Weissella confusa* ve yüksek miktarda *Saccoromyces cerevisiae* bulmuşlardır. İzole edilen suşlardan *Lactobacillus*, buğday ekşi hamur ekmeklerinin asidifikasyonunu, asitliğini, proteolizisini, textürünü, ve raf ömrünü geliştirdiğini, ekşi hamur fermentasyonu sırasında proteolizisin laktik asit bakterileri ve mayalar arasındaki etkileşimi uyardığını gözlemlemişlerdir.

Vollmar ve Meuser (1992), laktik asit bakterileri ve maya içeren starter kültürlerin, devamlı ekşi hamur fermenterinin performansı üzerine olan etkilerini inceledikleri bir çalışmada; proses şartları altındaki mikroorganizmaların metabolik aktivitelerine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. 8 çeşit saf laktik asit kültüründen bir tanesi olan *Lactobacillus brevis spp. lindneri* en iyi sonuçları üretmiştir. Asitliğin uniform yükselişi tespit edilmiş toplam asidite içinde %23-33 oranında dengeli bir asetik asit oluşumu gözlenmiştir.

Lactobacillus fructivorans ile benzer iyi sonuçlar alınmıştır. Fermentenin performansı, ekşi hamurdan izole edilen mayaların starter kültür olarak ilavesi ile daha iyi daha geliştirilebilir ve stabilize edilebilir olduğu bulunmuştur. Maya ilavesi ile fermente olan ekşi hamurlar maya katılmayanlara göre belirgin olarak daha yüksek asit oluşumu göstermişlerdir. Hızlı asit oluşumu bütünüyle ilave asetik asit oluşumuna bağlıdır. Bu etki maya suşundan bağımsızdır. Maya ilaveleri belli bir seviye üzerinde olduğu zaman daha fazla etki göstermezler.

Corsetti *et al.* (1998), ekşi hamur laktik asit bakterilerinin ekmeğın sıklığı ve bayatlaması üzerindeki etkilerini inceledikleri bir çalışmada *L. sanfrancisco* CB1 ve *Lactobacillus plantarum* DC400 ilave edilerek üretilen ekmeklerdeki hacmin maya ilavesi ile üretilen ekmeklere göre yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. *S. cerevisiae* 141- *Lactobacillus plantarum* DC400 starter ilavesi ile üretilen ekmek başlangıçta en yüksek sertliğe sahipken sonuçta en düşük sertliğe sahip olduğu görülmüştür. 24 saatlik depolama sonrası *S. cerevisiae* 141, *L. sanfrancisco* CB1 veya *Lactobacillus plantarum* DC400 starterlerinin kullanılması yalnızca maya kullanılanlara göre entalpide çok düşük yüzdeli bir artışa sebep olmuştur. Entalpi diğer laktik asit bakterileri (proteolitik ve amilolitik olmayan) kullanıldığı zaman belirgin bir artış göstermişlerdir. Ayrıca laktik asit bakterileri ile üretilen ekmekler, ekmek üreticilerinin ürettiği mayalı ekmeklerden daha büyük hacimli ve daha düşük oranda sertliğe sahip sonuçlar vermiştir.

Laktik asit bakterileri ile birçok araştırma yapılmış, Hollanda'da ticari olarak satılan buğday ekşi hamur starterlerini araştıran Nout ve Creemers-Molenaar (1987) araştırmaları sonucunda ekşi hamurda *Lactobacillus brevis* var. *lindneri*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Saccharomyces exiguus* izole etmişlerdir.

Hamad *et al.* (1992), Sudan'da sorgumdan üretilen Kisra kabarmamış ekmeğının yapımında kullanılan hamuru araştırmışlardır. Kisra Ekmeği üretimi için geleneksel yolla fermente edilmiş olan sorgum hamurunu ıslak ve kuru olarak ilave etmişler, fermentasyon işlemleri boyunca kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapmışlardır.

Hamurların hücre sayısı 9×10^8 cfu/g seviyelerine ulaştığında bunların %99'undan fazlasının *Lactobacillus* olduğunu, ıslak sorgum hamuru örneklerinde *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus amylovorus*; kuru hamur örneklerinde *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus amylovorus* tespit edilmiştir. *Candida krusei* ise yüksek oranda bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada geleneksel Khamir ekmeği iki bölgeden (Bayadh ve Hamra) elde edilen sorgum unu kullanılarak ve ekmek sorgumunun su ile, 1:0,8 oranında baharat (soğan, sarımsak, limonsuyu) karışımı ile hazırlanmış ve 24 saatte 30°C fermente edilerek yapılmıştır. Toplam bakteri popülasyonu ve laktik asit bakterileri fermentasyon süresi ile artmış ve 16 saatte en yüksek sayısına ulaşmıştır. İlk fermentasyonda pH değeri 6.77'den 4.35'e düşmüş, ikinci ve üçüncü fermentasyonda sırasıyla 6.65'den 4.18'e ve 6.57'den 3.93'e düşmüştür. 24 saat boyunca fermentasyon sırasında izole edilen ve karakterize edilen mikroorganizma olarak; bakteriler (*P. pentosaceus*, *L. brevis*, *L. lactis subsp. lactis*, *L. cellobiosus*, *Klebsiella oxytoca*, *Kl. pneumomae*, *Enterobacter aerogenes*, *Ent. sakazakii*, *Serratia marcescens* ve *Ser. odourifera*), küfler (*Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus niger*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* ve *Mucor sp.*) ve mayalar (*Candida parapsilosis*, *C. orvegensis* ve *Rhodotorula glutinis*) bulmuşlardır (Gassem 1999).

İtalya'da üretilen Sanfransisco ekşi maya hamuru, Almanya ve İsviçre'de üretilen çavdar ekşi maya hamuru üzerindeki çalışmalar sonucunda hamur mikroflorasında *L. reuteri*, *L. curvatus*, *L. brevis* ve *L. hilgardii*, *L. sanfrancisco*, *L. casei* bulunmuştur (Okada *et al.* 1992).

Gobbetti *et al* (1994b) İtalya'nın Umbria bölgesine özgü buğday ekşi maya hamuru üzerinde yapmış oldukları bir araştırmada, laktik asit bakterileri suşlarından; *L. brevis spp lindneri*, *L. plantarum*, *L. farciminis*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. alimentarius*, *L. brevis*, maya izolasyonundan ise *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Saccharomyces exiguus*, *Hansenula anomala*'yı izole etmişlerdir. Aynı araştırmacılar İtalyan buğday ekşi maya hamurunu genel olarak incelemiş ve laktik asit

bakterilerilerinden *L. plantarum*, *L. farciminis*, *L. alimentarius*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* spp, *delbruecki*, *L. brevis* spp *lindneri*, *L. brevis*, *L. fructivorans*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*'a rastlamışlardır.

Spicher and Schröder (1978) yapmış oldukları çalışmada, ekşi maya hamurlarından laktik asit bakterilerilerini izole etmişler ve *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus brevis* var. *lindneri*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fructivorans*'ı bulmuşlardır.

Lönner *et al.* (1986), İsveç tipi çavdar ekmeğinin yapımında kullanılan ekşi hamurdaki mikroflora ve pH değişikliklerini incelemişlerdir. Son ekşi hamurda pH yaklaşık 4.1, laktik asit bakteri konsantrasyonu 1×10^9 canlı hücre/g olarak tespit edilmiştir. Bu safhada baskın olarak tespit edilen laktik asit bakterileri *Laktobasillus* spp. diğeri *Pediococcus pentosaceus* olarak identifiye edilmiştir. Mayalar ise laktik asit bakterilerine göre daha yavaş gelişmiştir. Maya izolasyonunda en fazla *Saccharomyces delbrueckii*'ye rastlanmıştır. Ekşi maya kullanılarak yapılan ekmeklerin daha düzgün şekilli ve daha yumuşak olduğu bildirilmiştir.

Spicher (1987) yaptığı bir çalışmada, İtalya, İsviçre, Almanya ve İsveç'te üretilen Pannettone ve buğday ekmekleri üretiminde kullanılan buğday ekşi maya hamurlarından homofermentatif laktik asit bakterileri ve heterofermentatif laktik asit bakterileri türlerini araştırmış, homofermentatiflerden *L. plantarum*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. homohiochii*, *L. brevis*, *L. hilgardii* ve heterofermentatif türlerden *L. brevis* var. *lindneri*, *L. sanfrancisco*, *L. viridencens*, *Streptococcus* spp; bulmuştur. Ayrıca en önemli maya türlerinden *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces servazzi* ve *Candida milleri*'ni tespit etmiştir.

Çeşitli ekşi maya hamurlarından izole edilen laktik asit bakterilerinin ürettiği organik asitler dışındaki antimikrobiyal maddeler arasında bavaricin A (Larsen *et al.* 1993), plantaricin A, plantaricin C, plantaricin 149, (Daeschel *et al.* 1990), Pediocin AcH, (Ennahar *et al.* 1996) plantaricin ST 31 (Todorov *et al.* 1999) bakteriosinleri, BLIS C 57 adlı bakteriosin benzeri inhibitör maddeler (Messens and De Vuyst 2002) ve reutericyclin adlı yeni bir antibiyotik (Gänzle *et al.* 2000) sayılmaktadır.

Çağlar öncesinde kendiliğinden kabaran ekmekler, şimdiki ekşi maya örneklerine benzemekte olup fermantasyon, laktik asit bakterileri ve mayaların karışık kültür fermantasyonu ile ekmeğin dokusunu ve lezzetini oluşturan alkol, karbondioksit, organik asitler ile lezzet maddelerinin üretimine dayanmaktadır (Sugihara 1985, Wood and Hodge 1985).

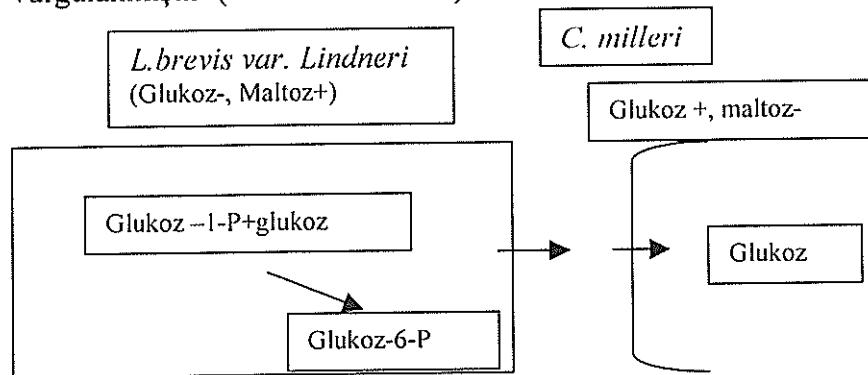
Ekşi maya sağladığı teknolojik yarar ve aromasının yanı sıra, mikrobiyal bozulmaya dirençleri açısından da önem arz etmektedir. Ekmek hamurunun bu fungustatik etkisi, laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit ve özellikle de asetik asitten kaynaklanmaktadır (Salovaara 1998). Ekmekte bozulmaya neden olan mikroorganizmalar küfler ve rop hastalığına neden olan *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* bakterileridir. Heterofermentatif laktik asit bakterilerinin ürettikleri asetik asit, ekmekte bozulmaya neden olan Rop hastalığının etmeni *Bacillus* endosporlarının çimlenmesini de inhibe etmektedir (Topal ve Köşker 1980, Salovaara and Valjakka 1987, Salovaara 1998). Voysey and Hammond (1993) tarafından bildirildiğine göre, bu bozulmaya neden olan mikroorganizmaların gelişimini engellemek için hamur formülasyonu içerisine organik asitleri ya da yaklaşık %15 oranında ekşi maya ilavesini önermektedir (Messens and De Vuyst 2002).

Lavermicocca *et al.* (2000) yaptıkları bir çalışmada, ekşi maya hamurundan izole edilen *Lactobacillus plantarum* 21B'nin fungisidal etkisini saptamışlar ve *Lactobacillus plantarum* 21B kültür filtratından anti fungal bileşikler olarak fenilaktiz ve 4-hidroksifenil laktik asitleri tanımlamışlardır.

Hamurun iyi kabarmasından dolayı ekmek hacminin iyi olduğu (Kline and Sugihara 1971, Spicher 1986), tat ve aromanın daha üstün olduğu (Salovaara and Valjakka 1987), bu ekmeklerde bayatlamamanın geciktiği belirtilmiştir (Salovaara and Katunpaa 1984, Tamerler 1986). Foramitti and Mar (1982), ekşi hamur sisteminde fermentasyon uzun sürdüğü için asit miktarının yükselmesine ve ekmeğin teknolojik kalitesinin artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, ekşi hamurda bulunan mayalar izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Fenotipik çalışmalardan elde edilen sonuçlar daha sonra moleküler çalışmalar ile doğrulanmış ve suşlarının %95'inden daha fazlasının *Candida humilis* türüne ait olduğu doğrulanmıştır. *Candida humilis*'in baskınlığının zamanla daha kararlı hale geldiği belirlenmiştir. *C. humilis*'in ekşi hamurda varlığı daha önceden bildirilmesine rağmen baskınlığının yeni bir bulgu olduğunu açıklamışlardır (Gullo *et al.* 2003).

Yapılan bir çalışmada; ekmek aroması üzerine amino asit konsantrasyonunun etkisini belirlemek için fermente edilmiş hamurlar ile pişirme denemeleri yapılmıştır. Ekmek unu yoğunluğu artırılarak, laktik asit bakterileri ile hazırlanan hamurlar starter olarak kullanılmış ve buğday ekmeğinin kızarıklık aromasının *Lactobacillus pontis* ile belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Sonuçta aroma üzerine buğday ekmeği hamurunda serbest amino asitlerin, özellikle de ornitin'in konsantrasyonunun etkili olduğu vurgulanmıştır (Thiele *et al.* 2002).



Şekil 2.2. Ekşi maya hamurunda maltozun *Lactobacillus brevis* var. *lindneri* ve *C. milleri* tarafından kullanılması (Salovaara 1998).



Sanfrancisco ekşi maya ekmeginde dominant organizmalar olan *Candida milleri*=*Torulopsis holmii*, *Saccharomyces exiguus*'un sporsuz formu ve *Lactobacillus brevis* var. *lindneri* (= *Lactobacillus sanfrancisco*) bir çeşit simbiyotik yaşam sürmektedirler (Wood and Hodge 1985). Ekşi maya hamurundan izole edilen *Lactobacillus sanfrancisco*'nun gelişimi için maltoza gereksinim duyduğunu, glikozda çok zayıf gelişebildiğini yada hiç gelişemediğini belirtmişlerdir (Wood and Hodge 1985). Ekşi maya ekosisteminde bu iki organizma arasında maltoz açısından herhangi bir rekabet söz konusu olmadığını belirtmiştir. Çünkü *Lactobacillus brevis* var *lindneri* sadece maltozu kullanarak glikozu açığa çıkartmakta ve maltozu kullanamayan *C. milleri* bu glikozu kullanmaktadır (şekil 2.2) (Salovaara 1998). Sanfrancisco ekşi maya hamurundan izole edilen mayanın maltozu asimile edemediğini ancak glikozu asimile edebildiğini, ayrıca sikloheximide dirençli ve asetik aside toleranslı olduğunu belirtmişlerdir (Sugihara *et al.* 1970).

Ekşi hamur fermentasyonu sırasında ekmek aroması üzerine etkili olan asitler (özellikle laktik asit ve asetik asit) alkoller, (etanol, propanol, isoamil alkol, isobütanol, isopropanol, 3-metil butanol vb.) esterler, (asit ve alkol formundaki asetoin, aldehyt ve ketonlar) ve çeşitli karbonil bileşikleri (diasetil, 2-propanon, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2,3-butandion, n-hekzanal, 2-heptanol, 3-hidroksil-2-butanol) oluşmaktadır (Pederson 1979).

Ekşi hamur tekniği ile üretilen ekmeklerde en yüksek oranlarda 2-propanon, 3-metil butanol, benzil alkol ve 2-fenil alkol bulunduğunu ve ekşi hamur ekmeklerinin daha yoğun bir aromaya sahip olduğu ileri sürülmüştür (Patterson *et al.* 1992).

Damiani *et al.* (1996), daha önceki çalışmalarında izole ettikleri heterofermentatif ve homofermentatif laktik asit bakterisi ve maya izolatlarını starter kültür olarak kullanarak, ekşi maya hamurunda oluşturdıkları aroma maddelerini belirleyip starter kültür formülasyonu oluşturmaya çalışmışlardır. Bu çalışma sonunda heterofermantatif laktik asit bakteri izolatlarının, özellikle etilasetat, bazı alkol ve aldehytleri, homofermantatif laktik asit bakteri izolatlarının diasetil ve diğer karbonilleri ürettikleri

saptanırken, maya izolatlarının izoalkoller (2-metil-1-propanol ve 2,3 metil-1-butanol) sentezledikleri belirlenmiştir. Mikrobiyal interaksiyonların etkisini belirlemek üzere yapılan ekşi maya hamuru starter denemeleri sonucunda *Lactobacillus brevis* ssp. *lindneri*, *Lactobacillus plantarum* ve *Saccharomyces cerevisiae* ya da *Saccharomyces exiguus* kombinasyonu ile hazırlanan formülasyon önerilmiştir.

Yapılan bir çalışmada 4 farklı laktik asit bakterisi (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus sanfrancisco* ve *Lactobacillus brevis*) ile fermente edilen ekşi maya hamurlarındaki asitlik ve aroma bileşiklerinin oluşumu üzerine kullanılan üç farklı un tipinin etkisi araştırılmıştır. Ekşi maya hamurunun asitlendirilmesi ve laktik asit üretiminin başlıca un tipi tarafından etkilendiği saptanmış, en fazla laktik asitin düşük randımanlı ve tam unlardan hazırlanan hamurlardan oluştuğu gözlenmiştir. Oluşan asitlik üzerinde kullanılan starter kültürün de etkisi olduğu ancak bu etkinin kullanılan un tipinin etkisinden daha az olduğu saptanmıştır. Uçucu aroma bileşenlerinin kullanılan starter kültüre bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla beraber bazı aroma bileşenlerinin oluşumu için starter kültür ile kullanılan un tipi arasında bir etkileşim görülmüştür. Heterofermentatif kültürlerle, özellikle *Lactobacillus sanfrancisco* ile fermente edilen ekşi maya hamurlarında, etil asetat ve etanol oluşumunda kullanılan un tipinin önemli etkisi belirlenirken, en yüksek miktarlar tam un ve düşük randımanlı undan hazırlanan ekşi maya hamurlarında elde edilmiştir (Hansen and Hansen 1993).

Hansen *et al.* (1989) yaptıkları bir başka araştırmada ise, laboratuvar fermentöründe starter kültür kullanılarak, farklı fermentasyon sıcaklıklarında yarı akışkan çavdar ekşi maya hamurunda fermentasyon süresince oluşan asitler ve uçucu bileşenler incelenmiştir. Yapılan analiz sonucunda en yoğun ve ekmek benzeri aroma olarak tanımlanan karakterlerin 2-propanon, 3-metil-1-butanal, benzil alkol ve 2-feniletanol'den kaynaklandığı belirlenmiştir. Homofermentatif kültürlerle fermente edilen çavdar ekmeklerinde 2-metil-1-propanol ve 2,3 metil-1-butanol isoalkollerinin yüksek miktarlarda olduğu belirlenirken, heterofermentatif kültürlerle fermente edilen ekmeklerde ise yüksek asetik asit içeriği saptanmıştır. Asitlikteki en hızlı artış 35°C'de

fermentasyonun 16-20. saatlerinde görülmüş ve stabil asitlik düzeyine ulaşılmıştır. Etil asetat, 2-metil-1-propanol, 2,3 metil-1-butanol, etil-*n*-hekzanoat ve diasetil'in starter kültür veya fermentasyon sıcaklığı ile değiştiği saptanmıştır.

Bir başka çalışmada ise dört farklı *Lactobacillus* cinsi starter kültürü ile fermente edilen buğday ekşi maya hamurundan elde edilen uçucu bileşenlerinin miktarları, kimyasal olarak asitlendirilen hamurlardan elde edilenler ile karşılaştırılmıştır. Starter kültür ile fermente edilen ve kimyasal olarak asitlendirilerek elde edilen bu her iki hamurda oluşan aroma maddelerinin üretimi üzerinde, maya ilavesinin etkisini incelemek üzere dört farklı ekşi hamur mayası kombine edilmiştir. Sonuç olarak ekşi maya hamuru ile karşılaştırıldığında kimyasal olarak asitlendirilmiş hamurlarda daha az aroma maddesi tanımlanmıştır. Bu aroma maddelerinin içeriklerinin kullanılan starter kültüre göre değiştiği saptanmıştır. Heterofermentatif kültürlerle özellikle *Lactobacillus sanfrancisco* ile fermente edilen ekşi maya hamurlarında etil asetat ve etanolün daha yüksek miktarlarda üretildiği saptanmış, maya ilavesi ile uçucu bileşenlerin sayısı ve miktarında artış olduğu belirlenmiştir. Etanol, 2-metil propanol ve 2,3 metil-1-butanol miktarlarının *Saccharomyces cerevisiae* ilave edilen ekşi maya hamurlarında en yüksek olduğu, A suşu maya ilave edilen hamurlarda ise etilasetat'ın en yüksek olduğu saptanmıştır. Etil asetat dışındaki esterlerin miktarlarının oldukça düşük olduğu belirtilmiş, asetoin ve diasetil karbonilleri, A suşu ilavesi ile hazırlanan ekşi hamurlarda düşük miktarlarda tespit edilmiştir (Hansen and Hansen 1994).

Buğday ekmeği kırıntısının aroma bileşenlerinin oluşumunda, hamura maya ilavesinin etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, ekşi maya hamurları tek başına laktik asit bakterileri ve maya kombinasyonu ile fermente edilmiştir. %5-20 ekşi maya ilave edilmiş ekmeklerde, ilave edilmemiş kontrol ekmeklerine göre somun ekmeklerinin hacminde artış olmuştur. Ekşi maya hamuru ekmeklerinde asetik asit, 2-metil propanoik asit ve 3-metil butanoik asit miktarlarının daha yüksek olduğu, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* ya da *Lactobacillus sanfrancisco* ile fermente olan ekşi hamur ilave edilmiş somun ekmeklerinde kontrol örneklerinden daha yüksek miktarda 2- yada 3-metil-1-butanol oluştuğu saptanmıştır. Starter kültürler ile ekşi

hamur mayaları arasında etkileşimler olduğu görülmüş ve etanol, 2-metil propanol, 2,3 metil-1-butanol, 2-fenil etanol, benzil alkol, asetik asit, 2-metil propanoik asit ve 3-metil propanoik asit bileşiklerinin üretimlerinin kullanılan starter kültür ve ekşi hamur mayasına bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. *Lactobacillus sanfrancisco* ile fermente edilen ekşi maya hamuru ile %5-15 ilavesiyle elde edilen ekmek daha hoş a giden, yumuşak ve ekşi koku ve tadı olduğu saptanmıştır. *Lactobacillus plantarum* ekmeklerinin ise daha kuvvetli ekşi ve hoş a gitmeyen kokusu ve metalik ekşi tadı olduğu, ancak hamura *Saccharomyces cerevisiae* ilave edildiğinde ekmeğin daha aromatik buğday ekmeği aromasına eriştiği, bunun nedeninin de daha yüksek 2,3 metil-1-butanol, 2-metil propanoik asit, 3-metil butanoik asit ve 2-fenil etanol içeriğinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Hansen ve Hansen 1996).

Lund *et al.* (1989) yaptıkları araştırmada, 30°C’de fermente edilen yarı akışkan ve normal çavdar ekşi maya hamuru için dört heterofermentatif (*Lactobacillus sanfransisco*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, tanımsız bir *lactobacilli*) ve üç homofermentatif (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus alimentarius*) laktik asit bakterileri starter kültür olarak kullanmış, asit ve uçucu bileşenlerin üretimi araştırılmıştır. Asit üretiminin yarı akışkan ekşi maya hamurlarında ve heterofermentatif kültürlerle üretilen örneklerde en yüksek olduğu saptanmıştır. Uçucu bileşenlerin içerikleri arasında en yüksek farkın yarı akışkan ve normal ekşi maya hamurları arasında görülürken, homo yada heterofermentatif kültürler ile üretilen hamurlar arasında da farklar gözlenmiştir. Yarı akışkan hamurda homofermentatif kültürlerde etanol ve etil asetatın yüksek miktarlarda (dominant pikler) olduğu belirlenirken, normal ekşi maya hamurlarında heterofermentatif kültürlerde etil asetat dışındaki esterlerin ve homofermentatif kültürlerde karbonillerin göreceli olarak yüksek olduğu belirtilmiştir.

Saccharomyces exiguus, *C. krusei*, *Pichia norvengensis*, *Hansenula anomala* ekşi hamurlarda laktik asit bakterileri ile bulunan mayalardır. Laktik asit bakterileri/Maya oranı ekşi hamurlarda genellikle 100/1’dir (Gobbetti *et al.* 1994a).

Piştirilmiş ekşi hamur örneklerinin organoleptik, sağlık ve besleyici özellikleri laktik asit bakterileri ile mayaların birbirleri ile olan ilişkilerine bağlıdır. Laktik asit bakterileri ile mayalar arasındaki etkileşimler buğday hamurundaki fermentatif aktiviteye, asetik ve laktik asit üretimine, proteolitik aktiviteye ve pişirme performansına, işlem şartlarına ve ilave edilen mayaların tipine, oranlarına ve ekşi hamurlardaki homo ve heterofermentatif laktobasillerin hangisi ile birlikte olduğuna bağlıdır (Spicher *et al.* 1981, Spicher ve Nierle 1984).

Ekşi maya fermentasyonunda mayalar ve laktik asit bakterilerinin sürdürdükleri simbiyotik yaşam sonucunda, mayalar ve heterofermentatif laktik asit bakterileri hamurun kabarmasından sorumlu olurken, laktik asit bakterileri ekmeğin elastisitesini, asitliğini ve lezzetini etkilemektedir. Ekşi maya hamur fermentasyonu sırasında, ekmek aroması üzerine etkili bileşikler olarak asitler (özellikle laktik asit, asetik asit), alkoller (etanol, propanol, isoamil alkol, isobütanol, isopropanol, 3-metil bütanol vb.), esterler (asetik ve alkol formundaki aseton, aldehit ve ketonlar) ve çeşitli karbonil bileşikleri (diasetil, 2-propanon, 2-metil-1-bütanol, 3-metil-1 bütanol, 2,3-bütandion, n-hekzanal, 2-heptanon, 3-hidroksi-2-bütanon) oluşmaktadır. Ekşi maya hamur mikroflorasının belirlenmesi ile fermentasyonda rol oynayan organizmaların ürettikleri aroma bileşenlerin karakterizasyonu sonucunda bu tip ürünlerin üretimini standardize edecek starter kültürlerinin geliştirilmesinin mümkün olduğunu bildirmişlerdir (Hancıoğlu ve Karapınar 2002).

Düşük pH, laktik asit, asetik asit oranları yüksek olan, spontan ekşi hamurlardan yapılan ekmeklerin en yüksek hacimli ve en düşük bayatlama oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca azot bileşikleri özellikle amino asitler hamur mikroorganizmaların metabolizmasında ve karakteristik lezzete sahip ekmek üretiminde önemli bir rol oynamaktadır (Barber *et al.* 1989).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Trabzon Vakfıkebir Ekmeğinin mikrobiyolojik özelliklerinin incelenmesi amacı ile bu ekmeğin orijini olarak bilinen Trabzon il sınırları içerisindeki 8 farklı fırından hamur örnekleri alınmış ve direkt sistemle üretilen francala ekmek hamuruyla karşılaştırılmıştır. Bu fırınlar; Büyük Liman Ekmek Fırını (Vakfıkebir), Baştan Ekmek Fırını (Vakfıkebir), Pazar Ekmek Fırını (Vakfıkebir), Yeni Fırın (Vakfıkebir), Harman Ekmek Fırını (Beşikdüzü), Güven Ekmek Fırını (Esiroğlu), Merkez Fırını (Esiroğlu) ve Yılmaz Ekmek Fırınıdır (Esiroğlu).

200g 1. ekşi hamurdan alınan örnekler, litrelik steril cam kavanozlara konarak, 4°C'den düşük sıcaklıkta derhal Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarına getirilmiş ve bekletilmeden her bir örnek için VRBD (Violet Red Bile Agar) (Merck), VRB Agar (Merck), MRS Agar (De Man Rogosa Sharp Agar) (Merck), M17 (IDG), OGYE (Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar) (IDG), PCA (Plate Count Agar) (Merck) besiyerlerine dilüsyonlar hazırlanarak uygun metotlar ile ekim yapılmıştır.

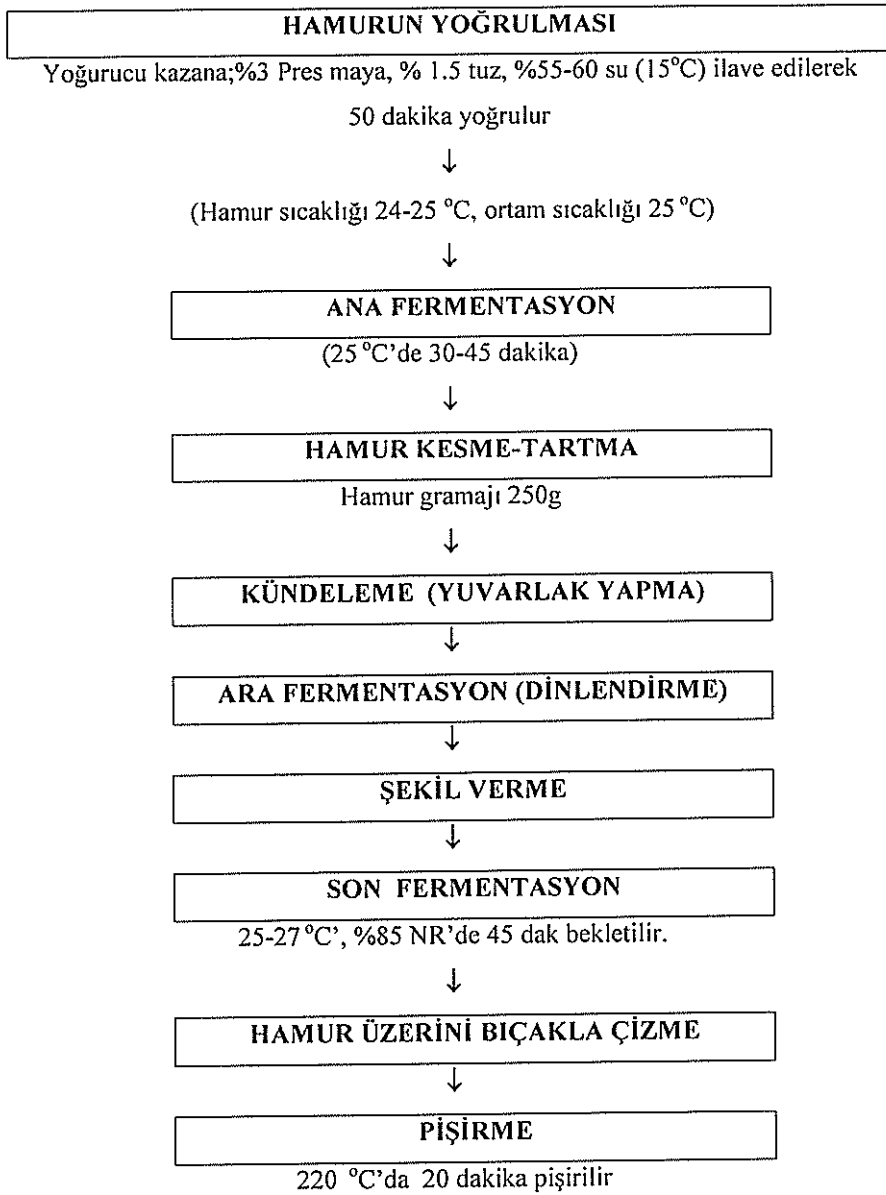
İndirek sistemle üretilen Vakfıkebir Ekmeği'nin ekmek ve hamurundaki aroma maddelerinin tayini için Yılmaz Ekmek Fırınından (son fermentasyonunu tamamlamış ve fırına sürülmek üzere olan hamur ile fırından çıktıktan hemen sonra Vakfıkebir Ekmeğinden); mukayese amacıyla da direkt sistemin uygulandığı Erzurum Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Pilot Ekmek Fabrikasından (ana fermentasyon ve son fermentasyon sonrası hamurdan ve piştikten sonra Francala Ekmekten) örnekler alınmıştır. Her iki fırından alınan 50'şer gramlık hamur ve ekmek örneklerindeki uçucu aroma maddelerinin kaybolmaması için daha önceden temin edilen -196°C'lik sıvı azot tankına konulmuştur. Karayolu ile aroma madde analizinin

yapılacağı Gebze TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezin'deki Gıda Teknolojisi Laboratuvarına numunelerin özellikleri kaybolmadan bizzat ulaştırılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Francala ekmeğinin üretim prosesi

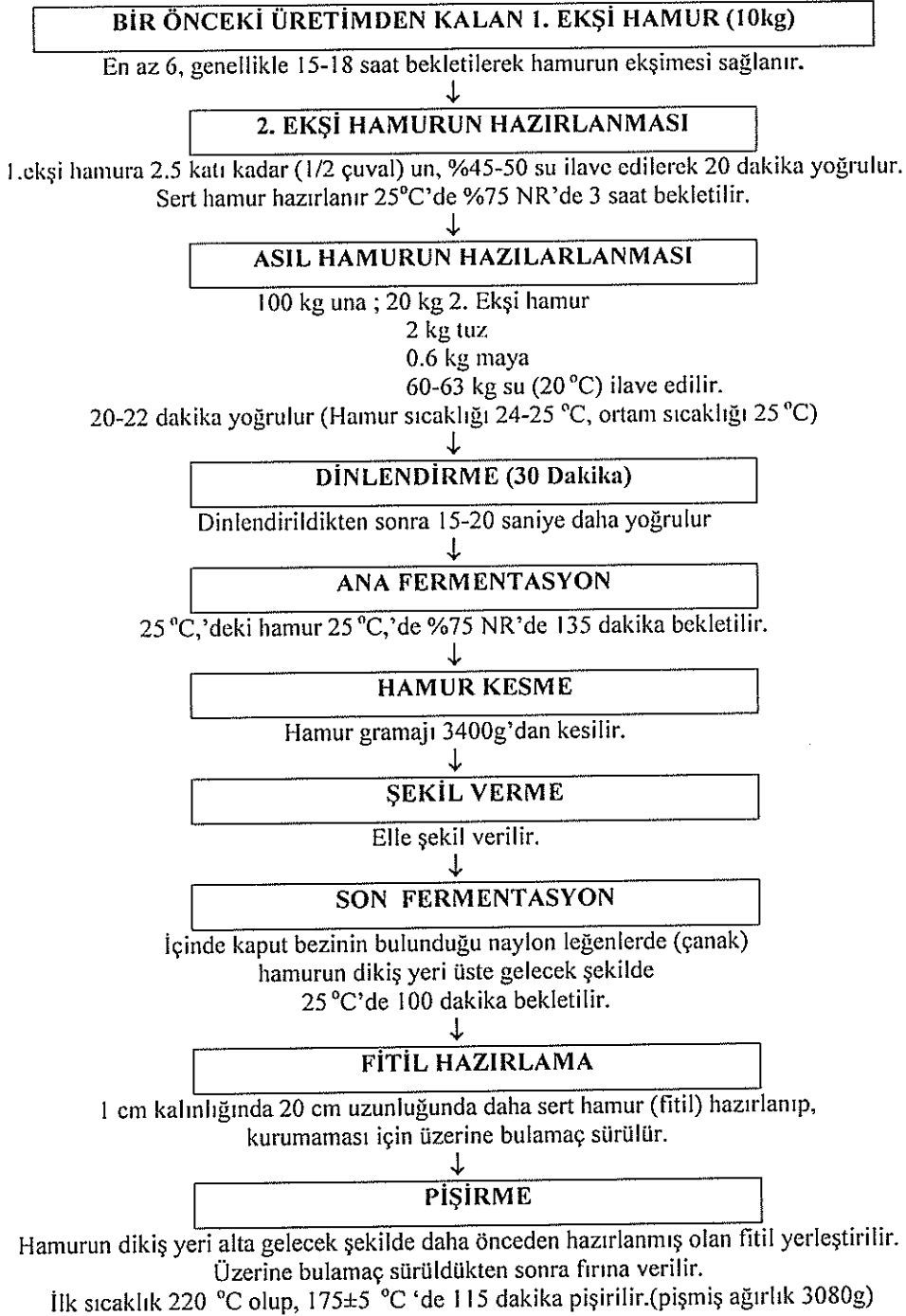
Direkt sistemle üretilen Francala Ekmeğinin işlem prosesi şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Francala ekmeğinin üretim akış şeması

3.2.2. Trabzon Vakfıkebir Ekmeğinin üretim prosesi

Trabzon Vakfıkebir Ekmeğinin üretim prosesi şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2. Vakfıkebir Ekmeğinin üretim akış şeması (Kotancılar vd 1998).

3.2.3. Mikrobiyolojik analizler

3.2.3.1. Mikrobiyolojik analizler için hamur örneklerinin homojenizasyonu

Stomacher torbasına steril bıçak ve spatula kullanılarak, 11g ekşi hamur örneği tartılmış ve üzerine 99ml fizyolojik tuzlu su (%0.85'lik NaCl çözeltisi) ilave edilerek Stomacher'de (Lab. Stomacher Blender 400-BA 7021 Sewart Medikal) 1.5 dakika homojenize edilmiş, bu işleminden sonra dilüsyonlar hazırlanarak ekim yapılmıştır.

3.2.3.2. Ekşi hamur örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizler

Sekiz ayrı fırından alınan ekşi hamur örnekleri yukarıda belirtilen yöntemle homojenize edilerek uygun dilüsyonları hazırlanmıştır. Koliform bakterileri için 10^{-2} - 10^{-3} dilüsyonlardan VRBDA (Violet Red Bile Dextrose Agar) (Merck) ve VRBA'a (Violet Red Bile Agar) (Merck) kullanarak yayma metoduyla ekim yapılmış ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Hartman *et al.* 1985). *Enterobacteriaceae* sayımı için ise VRB Agar (Merck) besiyeri kullanılmış ve ekimi uygun petriler 30 °C'de 48 saat aneorobik şartlarda inkübe edilmiştir.

Total aerobik mezofilik bakteriler (TAMB) için uygun dilüsyonlarından steril petri kutularına 1ml alınarak üzerine 40-45°C'deki PCA'dan (Plate Count Agar) (Merck) 13-15 ml ilave edilmiştir. 30°C'de 48 saat'lik inkübasyondan sonra 30-300 arasında koloni içeren petri kutularında sayım yapılmıştır (Messers *et al.* 1985).

Laktik asit bakterilerinden laktobasiller için spesifik olan MRS Agar besiyerine yüzeye yayma metodu ile ekim yapılarak 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Laktik asit bakterilerden laktokoklar için spesifik olan M17 (IDG) Agar besiyerine yüzeye yayma metodu ile ekim yapılmıştır. İnkübasyon ise yine 30°C'de 72 saat süre ile yapılmıştır.

Mayalar için uygun dilüsyonlardan OGYE agara (Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar) yayma metodu ile ekim yapılarak 25°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Baumgart *et al.* 1993). M17 ve MRS Agar besiyerlerine mayaların gelişimini engellemek için 50mg/lt sikloheksimid (Sigma) ve 10mg/lt sodyum azid (Sigma) ilave edilmiştir (Beek and Priest 2002).

Numunelerin ilk mikrobiyolojik testleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Alınan numunelerin mikrobiyolojik analizleri

Mikroorganizma Grubu	Besiyeri	İnkübasyon Süresi (saat)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)
Koliform Bakterileri	VRBD	48	30
	VRB	48	37
Total Aerobik Mezofilik Bakteriler	PCA	48	30
Laktobasiller	MRS	72	30
Laktokoklar	M17	72	30
Mayalar	OGYE	48	25

3.2.4. Laktik asit bakterilerinin geliştirilmesi ve izolasyonu

Yukarıda bahsedildiği gibi homojenize edilen ekşi hamur örneklerinden hazırlanan uygun dilüsyonlar (10^{-4} ve 10^{-5}) petri kutularına 0.1 ml alınarak önceden hazırlanan sikloheksimid ve sodyum azidli MRS ve M17 agarlara yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler anaerobik koşullarda (%10 CO₂, %90 N₂) 30°C'de 72 saat inkübe edilmiştir (Collins ve Layne 1984). İnkübasyon sonucunda gelişen tipik görünüşlü koloniler (besiyeri üzerinde gelişen 1-2 mm çaplı açık sarı, krem renkli, beyaz, yuvarlak orta büyüklükte, buğday tanesi şekilli, krem- kehribar renkli koloniler) mikroskopik görünüm, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testlerine tabi tutulmuştur. Gram pozitif, katalaz negatif, kok veya çubuk şekilli bakterileri içeren koloniler (her örnek için 12 koloni) MRS broth'a aşılanarak 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MRS agara çizgi usulü ekim yapılmış ve plaklar anaerob şartlarda 30°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tek düşmüş kolonilerden MRS broth'a aşılanmış 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda Gram boyama ve mikroskopik görünüm, katalaz ve oksidaz testleri tekrarlanmış ve saf görünümlü, kok veya basil şeklindeki muhtemel laktik asit bakterileri seçilmiştir.

Çalışmada her ekşi hamur örneğinden 192 izolat alınmış, mikroskopik görünüm, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri sonucunda 182 adetinin muhtemel Laktik asit bakterisi olduğu belirlenmiş ve 158'i MIS sistemi (Microbial Identification System) ile identifiye edilmiştir.

3.2.5. Maya izolasyonu

Maya izolasyonu için uygun dilüsyonlarda (10^{-5} ve 10^{-6}) OGYE agara (Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar) yayma metodu ile ekim yapılmış ve 25°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mikroskop altında incelenmiş, muhtemel maya seçilmiş ve tek düşmüş kolonilerden nutrient broth'a aşı yapılmış 25°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra OGYE agara çizim

usulü ekim yapılmıştır. Tekrar mikroskopik muayeneden sonra MIS sisteminde izolasyon için SDS (Sabouraud Dextrose Agar) (Difco) agara çizgi usulü ekim yapılmış, her örnekten alınan 10 izolatın (90 izolat) hepsinde mayaya rastlanmış ve MIS sistemi ile identifiye edilmiştir.

3.2.6. Kimyasal analizler

3.2.6.1. Gram boyama

İzolatların 24 saatlik genç kültürlerinde Sert (1992)'in verdiği yönteme göre, Gram boyama yapılmış ve menekşe renkli koloniler Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.2. Katalaz testi

MRS agarda geliştirilmiş (en fazla 2 günlük) koloniler üzerine %3'lük H_2O_2 damlatılmış ve mikroskop (Olympus H01) altında gözlenen koloniler etrafında gaz habbeciklerinin görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirmiştir (Bilgehan 1996).

3.2.6.3. Oksidaz testi

İzolatlar nutrient agara çizgi usulü ekilmiş ve aerob şartlarda 30°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu gelişen kolonilerin üzerine %0.5'lik tetrametil parafenildiamin dihidroklorit damlatılmış 1-2 dakika içerisinde kırmızı-mavi renk alan koloniler pozitif, renk değişikliği olmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir (Çon 1995).

3.2.7. Yağ asitleri kompozisyonuna göre laktik asit bakterilerinin identifikasyonu

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu bölüm 3.2.4'de açıklandığı gibi Speck (1976), Collins and Layne (1984), Çon (1995), Bilgehan (1996) belirttiği yöntemlerle tespit edilmiştir.

İzole edilen laktik asit bakterileri MIS kullanılarak identifiye edilmiştir. MIS cihazı (MIDI, version 6.0, Newark, DE) için örnek hazırlama Anonymous (1999)'a göre yapılmıştır. Bu sistem Türkiye'de ilk kez 1999 yılında Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde kurulmuştur.

MIS sistemi kullanılarak tanımlanan laktik asit bakterilerinden yağ asitlerinin ekstraksiyonu için yapılan işlemler yöntem 3.2.7.2'de verilmiştir. MRS broth'dan agar'a çizim usulü ekim yapılmış ve 30°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon peryodunu takiben, 4 fazlı çizim yapılmış petrilerin 3 ve 4 numaralı fazlarından canlı bakteri hücreleri steril öze ile toplanarak ($\cong$ 40 mg) steril bir cam test (ekstraksiyon) tüpüne (5ml) aktarılmıştır. Test tüplerini üzerlerine izolat numaraları yazılarak ağızları kapatılmıştır.

Laktik asit bakterilerinin identifikasyonun yapılabilmesi için, izole edilen muhtemel laktik asit bakterilerinin yağ asidi, metil esterlerin izolasyonu ve ekstraksiyonu yapılmıştır. Daha sonra MIS kullanılarak bakterilerin tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.1. Yağ asitlerinin ekstrasyonunda kullanılan çözeltiler

Yağ asitlerinin ekstrasyonu için kullanılan kimyasal çözeltiler aşağıda verilmiştir (Anonymous 1999).

Çözelti 1: Saponifikasyon Çözeltisi (Sabunlaşma)

Sodyum Hidroksit (ACS grade)	45 g
Metil alkol (HPLC grade)	150 ml
Saf su	150 ml

Önce metil alkol ile saf su karıştırılmış ve daha sonra sodyum hidroksit ilave edilmiştir.

Çözelti 2: Metilasyon çözeltisi:

Hidroklorik asit (6.00N)	325 ml
Metil alkol (HPLC grade)	275 ml

Çözelti 3: Ekstraksiyon çözeltisi

Hekzan (HPLC grade)	200 ml
Metil-tert-Butil Eter (MTBE, HPLC grade)	200 ml

MTBE hekzan üzerine ilave edilerek karıştırılmıştır.

Çözelti 4: Bazik yıkama çözeltisi

Sodyum Hidroksit (ACS grade)	10.8 g
Saf su (deiyonize)	900 ml

Bakterilerin identifikasyonu, yağ asitleri profiline göre MIS cihazı kullanılarak yapılmıştır (Stoakes *et al.* 1994, Brown and Leff 1996, Küfrevioğlu vd 1999).

3.2.7.2. Yağ asitleri ekstraksiyon metodu

İdentifikasyon işleminde aşağıda sırasıyla verilen metod uygulanmıştır.

- 1) Test edilecek bakterinin tek bir kolonisinden steril bir öze ile MRS agar (Merck) besiyerine dört fazlı çizgi usulü ekim, Test edilecek mayalar SDS agar besiyerine,
- 2) Ekim yapılmış petrilerin $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 ± 3 saat inkübasyonu, Mayaların $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 ± 3 saat inkübasyonu,
- 3) İnkübasyon periyodunu takiben, dört fazlı çizim yapılmış petrilerin üçüncü ve dördüncü fazlarından bakterilerin steril bir öze ile toplanarak steril cam tüplere alınması ve kapaklarının kapatılması,
- 4) Her bir test tüpüne Çözelti 1'den 1 ml ilave edilmesi ve 5-10 saniyelik çalkalamadan sonra 5 dakikalık süreyle 100°C 'lik su banyosunda bekletilmesi. Bu işlemi takiben tekrar 5-10 saniye çalkalandıktan sonra 25 dakika 100°C 'lik su banyosunda inkübasyon. Bu şekilde bakterilerin hücre çeperleri parçalanarak yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmış olmaktadır.
- 5) Test tüplerine Çözelti 2'den 2 ml ilave edilip 5-10 saniye çalkalamadan sonra 80°C 'de 10 dakika süreyle su banyosunda bekletme ve hemen 2 dakika süreyle buz içerisinde hızlı soğutmaya bırakma. Bu uygulama ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenmiş olmaktadır.
- 6) Soğutulmuş tüplere Çözelti 3'den 1.25 ml ilave edilip 10 dakika süreyle çalkalama. Böylece alt kısımda asidik, üst kısımda ise organik faz oluşturulup bir pastör pipeti vasıtasıyla alt kısımdaki asidik fazın atılarak üst kısımdaki organik fazın tür içerisinde muhafaza edilmesi.
- 7) En son aşamada her tüpe 3'er ml Çözelti 4 ilave edilip 5 dakika süreyle çalkalandıktan sonra 10 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletme. Beklemeyi takiben tür içerisinde ayrışan üst fazdan 0.2-0.3 ml alınarak gaz kromatografisi tüplerine transfer edilip ağzı sıkıca kapatılan tüpler MIS üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirilmektedir.
- 8) Daha sonra sistem kılavuzunda belirtildiği gibi örnekler analiz edilerek bakterilerin mayaların tanısı yapılmıştır.

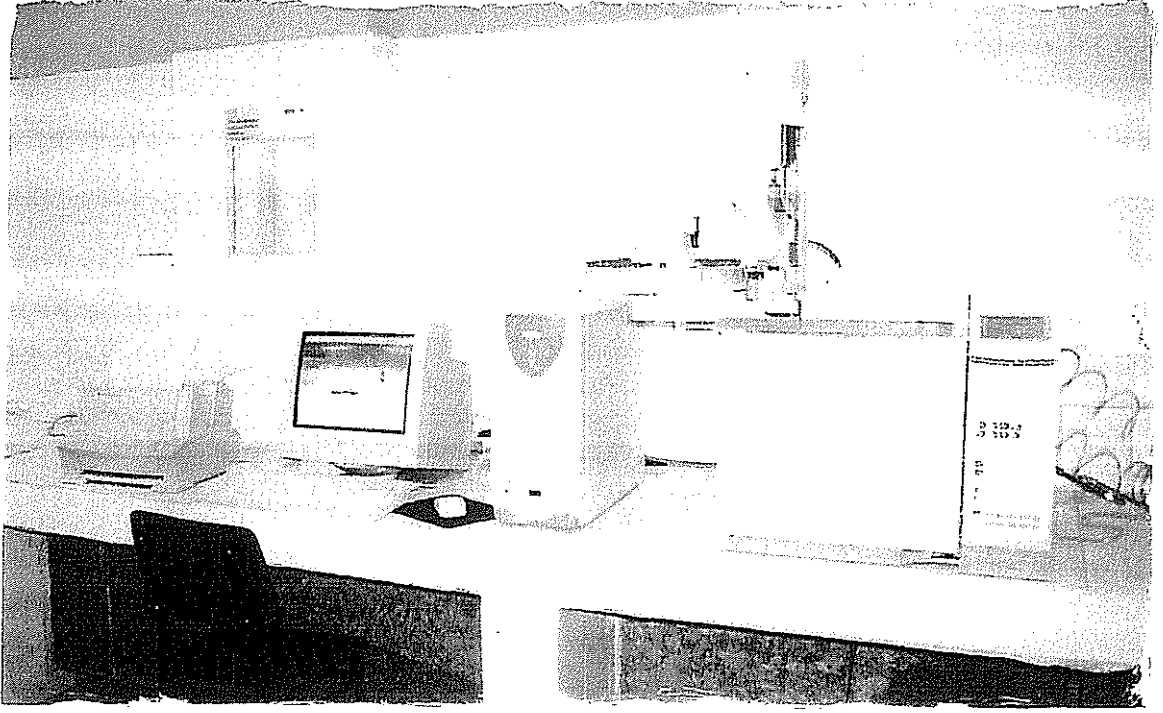
Hazırlanan numuneler gaz kromatografisi tüplerine konularak cihazın tablasına yerleştirilmiştir. Her numune için analiz 20 dakika sürmektedir. Cihaz başlangıçta 2 ve her 10 örnekten sonrada 1'er defa olmak üzere kendisini otomatik olarak kalibrasyon çözeltisi ile kalibre etmektedir. Sonuçlar bilgisayardan alınıp yağ asidi profillerine göre test edilen mikroorganizmaların tanısı yapılmıştır (Anonymous 1999).

3. 2. 7. 3. MIS sistemi (Microbial Identification System)

Artık petri plaklarında ve hazır kitlerle sayım ve doğrulama yöntemlerinin yerini, modern RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA Analysis) ve MIS (Microbial Identification System with fatty acid methyl ester by gas chromatography) gibi teknikler almış bulunmaktadır. MIS tekniğinde, her bir bakteri, küf ve mayanın yağ asitleri metil ester modelleri (pattern) çıkartılarak önceden bilgisayara yüklenmiş (kütüphaneleri) bulunmaktadır.

Analiz amacıyla, bilinmeyen bir mikroorganizmaya ait yağ asidi profili çıkarıldığında bu profil, bilgisayarda bulunan kütüphanedeki önceden çıkarılmış profillerle kıyaslanarak bakteri veya küfe ait bilgiler çok hızlı ve güvenilir bir şekilde değerlendirilip teşhis edilebilmektedir.

MIS cihazı şekil 3.3'de görülmekte olup, bölümlerin fonksiyonları aşağıda özetlenmiştir.



Şekil 3. 3. Mikrobiyal identifikasyon sistem (MIS) ünitesi

3. 2. 7. 3. 1. Gaz Kromatografisi

Bu kısım HP-6890 kromatografisinden oluşmaktadır. Kromatografi kolon uzunluğu 25 m, kolon iç çapı 0.2 mm olan %5'lik phenylmethyl (fenilmetil) silikon kolon (HP 19091B-102), injeksiyon sıcaklığı 170°C, flame-iyonizasyon dedektör sıcaklığı 250°C, son sıcaklığı 20 dakikada 310°C.

3. 2. 7. 3. 2. Kromatografi Sistemini Besleyen Gaz Tankları

Hidrojen, azot ve kuru hava sağlayan tüplerdir. Kuru havanın basıncı=2.758 bar, hidrojenin basıncı=2.068 bar ve azotun basıncı=1.379 bardır. Azot gazının debisi 30 m/dk.

3. 2. 7. 3. 3. Bilgisayar Sistemi ve Programları (Sherlock system software, library generation software)

Bakteri için hazırlanmış paket kütüphanedir. Bu kütüphanede firma tarafından taranarak elde edilmiş mikroorganizmalara ait kromatogramlar bulunmaktadır.

3. 2. 7. 3. 4. Lazer Yazıcı.

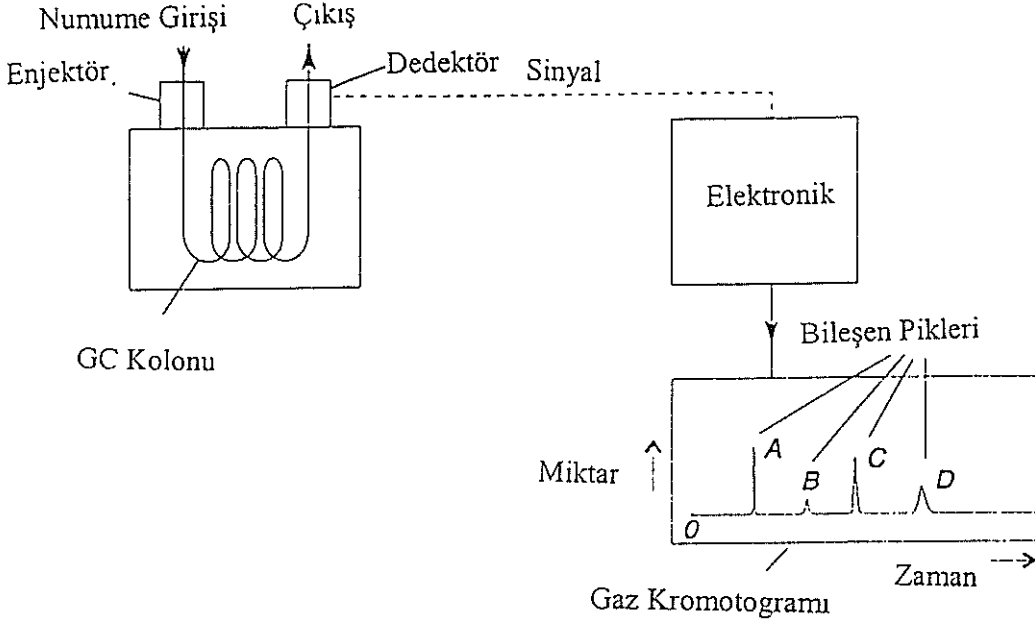
3.2.8. Aroma analizi (Gas Chromatograph/Mass Spectrum (GC/MS))

Vakfikebir ekmeğinin aromatik özelliklerinin incelenmesi için Gas Chromatograph/Mass Spectrum (GC/MS)'una bağlı Turbomatrix, Automatic Headspace Sampler yöntemi kullanılmıştır (Hansen *et al.* 1989). Kromatografi; bir karışımda bulunan kimyasal maddelerin sabit bir ortamda belirli çözücülerle yüzey adsorpsiyonu, dağılma (partizyon), iyon değiştirme ve eleme= dışarlama=exlusyon özelliklerine göre ayrılması işlemidir. Gaz kromatografisi gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaşabilen bileşiklerin ayrılmasında kullanılır.

Aroma bileşenlerinin belirlenmesinde aşağıdaki kromotograffik metot uygulanmış olup, çalışma prensibi aşağıda izah edilmiştir. Yukarıda da açıklandığı gibi; Bir gaz kromatografi kolununa A,B,C,D gibi birden fazla maddeden oluşan karışım enjekte edildiğinde, kolonlardaki alıkonma sürelerinin farklı olmasından dolayı kolonu farklı sürelerde terk ederler. Dedektör tarafından algılanan her bir madde için yazıcıya

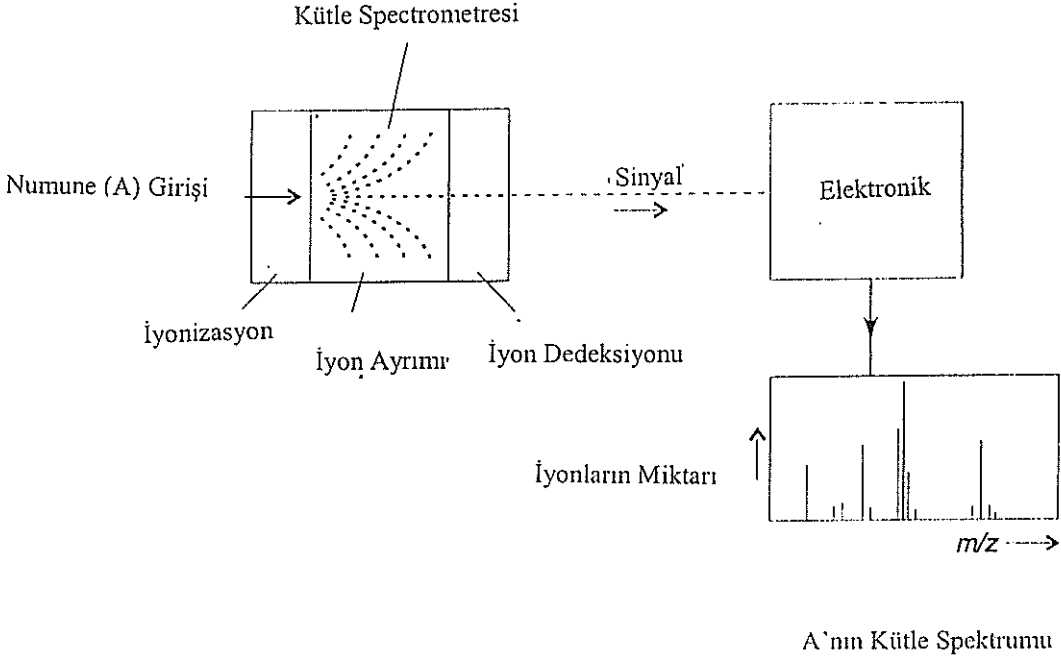
farklı sinyaller gönderilir ve maddelerin kalitatif ve kantitatif özellikleri belirlenirler. Bu sistem şekil 3.4’de şematik olarak gösterilmiştir.

Karışım (A,B,C,D) Ayrıştırılmış Bileşenler



Şekil 3.4. Gaz Kromatografisinin sistematik gösterimi

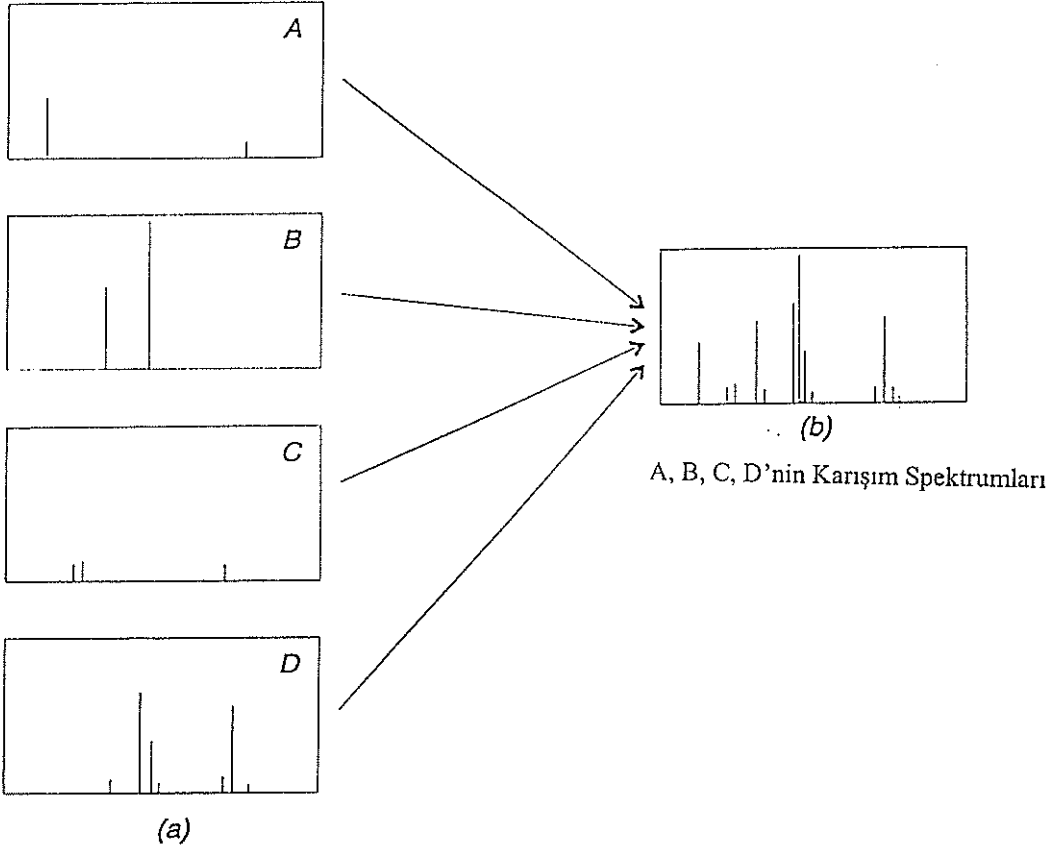
Kütle spektroskopisi, organik moleküllerin parçalanması sonucu üretilen gaz fazındaki iyonların kütle/yük (m/e) oranlarının belirlenmesi esasına dayanan bir analiz tekniğidir. Diğer bir tanımda, özel bir düzenek yardımıyla organik bileşiklerden pozitif yüklü parçacıkların oluşturulması ve bunların m/e oranına göre ayrılarak teşhis edilmeleri için kullanılan yöntemlere Kütle Spektroskopisi adı verilir. Kütle spektroskopisi tam molekül iyonları yanında parçalanmış küçük kısımlarının da kütlelerini verir. Kütle spektroskopisinde en önemli işlem basamaklarından birisi iyonlaştırmadır ve birçok farklı yöntemle iyonlaştırma yapılabilmektedir (şekil 3.5).



Şekil 3.5. Kütle Spectrometresinin şematik gösterimi

Tek bir madde kütle spektrometresine konulduğu zaman iyonize olur ve iyonlar m/e değerlerine göre ayrılırlar. Sonuçta her bir m/e oranındaki iyonların sayısı A örneğinin kütle spektrumunu vermesi için m/e 'ye karşı çizilmiştir. Birden fazla maddeden oluşan karışım (A, B, C, D) verildiği zaman da karışık pikler oluşmaktadır (şekil 3.6).

Ortaya çıkan iyonlar çoğu kez kararlı olmayıp, daha da ileri seviyede parçalanarak kütlesi çok daha küçük yeni iyonlar da oluşturabilirler. İşte bu ve benzeri nedenlerle ortamda sürekli bir negatif basınç (vakum) vardır ve bunun oranı yaklaşık 10^{-5} - 10^{-8} torr'dur.



Şekil 3.6. A,B,C,D gibi dört madde için çok basit bir spektra görülmektedir. a) Maddeler ayrı ayrı b) karışım halinde eşit olmayan oranlarda

Karışımları bileşenlerine ayırmak için gaz kromatografisi en etkin en verimli tek yöntemdir. Fakat kütle spekturumu tek örneklerin identifiye edilmesinde iyi olmasına rağmen çoklu örneklerin identifikasyonunda o kadar etkili değildir. Dolayısıyla bu iki metodun tek bir sistem içerisinde birleştirilmesi karmaşık karışımların nicelendirilmesi, tanımlanması, ayrılmasında kullanılması ile çok daha mükemmel sonuçlar elde edilmiştir. Gaz kromatografisi kolonu boyunca karışımın bileşenlerini taşıyan hareketli faz bir gazdır ve genellikle He'dur. Bu gaz yaklaşık 0.5-3 ml/dak. hızda akar ve MS'nin iyon kaynağı içine kapiller kolonun ucundan dışarı akar. GC/MS sistemlerindeki iyon kaynakları normal olarak 2×10^{-5} Torr basıncı civarında 1ml/dak. He akışına sahiptir (1 torr = 1 mmHg = 133.3 pa).

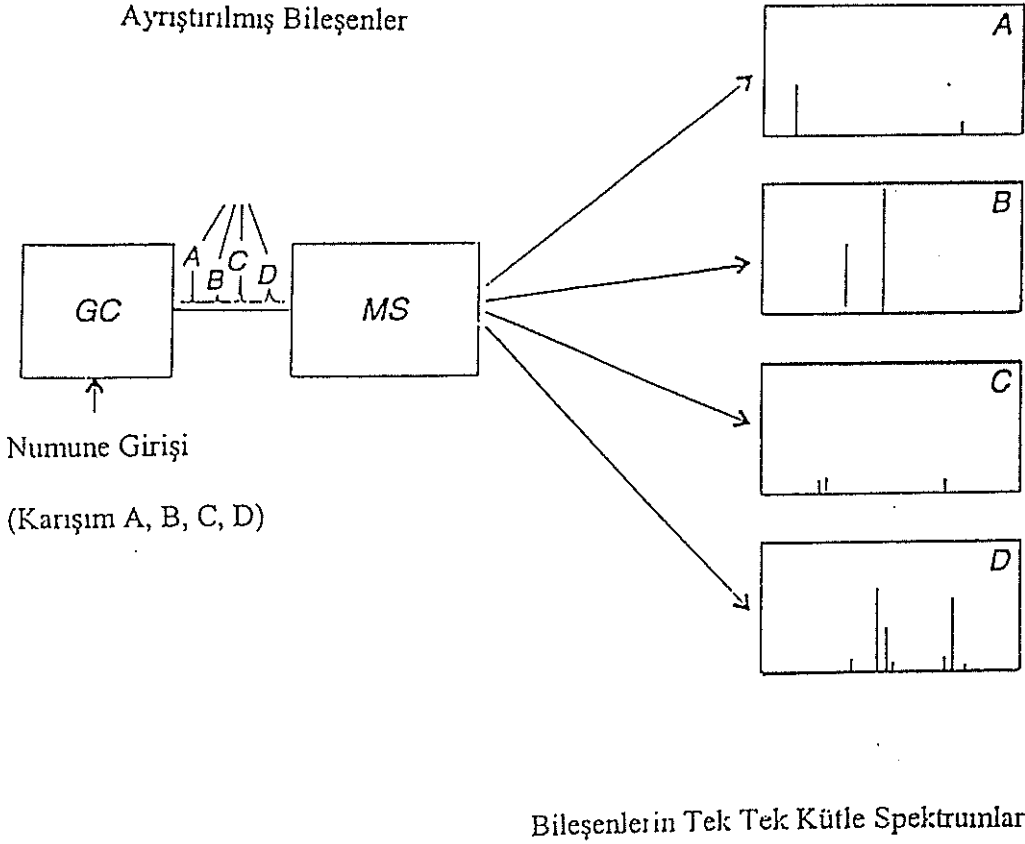
1 Torr He akışı elektron iyonizasyonu için kullanılırken, 3×10^{-4} Torr basınç kimyasal iyonizasyon için gereklidir. İyon kaynağı içerisindeki ve kromatografik kolonların ucu arasındaki bu büyük basınç değişimi gazı her dakikada birkaç litreye eşit akış genişlemesine sebep olur. Dolayısıyla yüksek pompalama, fazla gazın uzaklaştırılması için gereklidir ve kaynak içerisindeki en elverişli iyonizasyon için vakumun elde edilmesini sağlar.

3.2.8.1. Kütle spekturumun kaydedilmesi:

Her bir karışımın bileşeni ortaya çıkarsa ve iyon kaynağında belirirse, normal olarak ya ayırıcı elektron demeti ya da ayırıcı gaz tarafından iyonize olmuştur ve ortaya çıkan iyonlar kütle spektrumunu vermesi için kütle spektrometresi tarafından analiz edilir (şekil 3.7).

Kapiller GC'de ayrıştırılmış karışım bileşenleri kısa süreli zaman aralıklarında ortaya çıkar ve sıklıkla yalnızca birkaç saniyede sonlanır. Böylece bir iyon kaynağı içindeki bileşenin miktarı kütle spektrumundaki gibi sabit olmayan bir şekilde elde edilir. Fakat sıfırdan başlayarak çabucak maksimuma yükselir ve ardından hızlıca düşer.

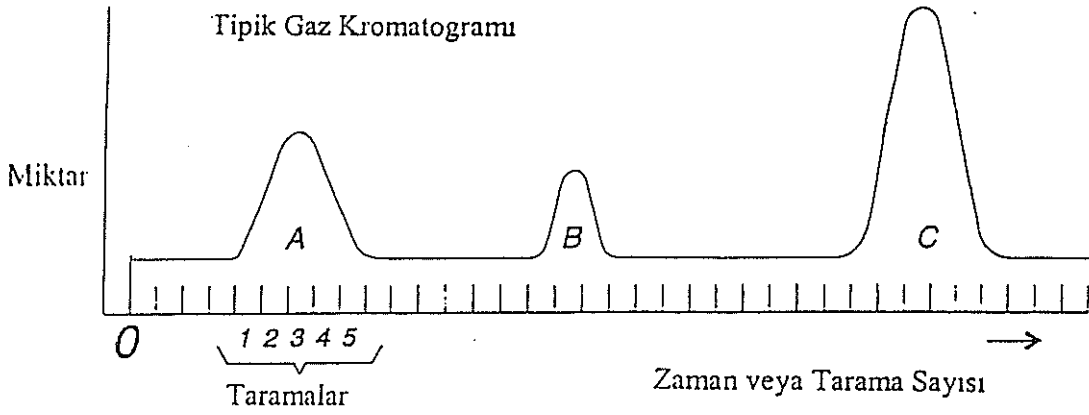
Karışım kromatogram kolonuna enjekte edildiğinde, daha önceden belirlenmiş kütle aralığı üzerinden (50-500 kütle birimi) ve daha önceden ayarlanmış zaman aralığında (örnek olarak her yarım saniyede bir) tekrarlı taramalar yapılır. Bunun sonucunda tarama kromatogramın sağına doğru ilerler ve basit bir GC/MS ölçümünde 100 kadar kütle spektrası kayıt edilebilir. Şekil 3.8 farklı zamanlarda ortaya çıkan A, B, C, gibi üç bileşeni gösteren tipik bir gaz kromatogramı gösterilmiştir. Kütle spektrası için sürekli tarama sıfır orijin alınarak başlar ve düzenli olarak tekrar ettirilir (zamanı gösteren küçük bölümler). Dolayısı ile A piki iyon kaynağından geçip kendi bölümünde 5 kez taranır. Çünkü tarama düzenlidir ve zaman ekseni tarama numarası ekseni ile değiştirilebilir.



Şekil 3.7. GC/MS kombinasyonunda başarılı bir şekilde ayrıştırılan A,B,C,D örneklerinin kütle spektrometresi tarafından ayrı spektralarının gösterimi

3.2.8.2. Spesifik bileşenlerin tanımlanması:

Yukarıda tanımlanan yöntemle hafızaya alınmış bilgiler sadece bileşik serilerini değil spesifik bileşenleri de tanımlamak için kullanılır. Örneğin Klor (Cl) atomu içeren bir bileşiğin kütle spektrumu bellidir. Çünkü doğal klor (Cl^{35} , Cl^{37}) 3'e 1 oranındaki iki izotoptan meydana gelir. 3:1 oranındaki iki kütle birimi birbirinden ayrılmış iki moleküler iyonla sahip olacaktır.



Şekil 3.8. Farklı zamanlarda ortaya çıkan A, B, C, gibi üç bileşeni gösteren tipik bir gaz kromatogramı

3.2.8.3. Headspace analizinin prensipleri

Headspace analizi ağız sıkıca kapalı bir kap (vial) içerisindeki katı veya sıvı bir örneğin buharlaştırılmasına dayanan bir yöntemdir. Numune pratik Headspace analizi için ağız sıkıca kapatılmış olan viallere konur ve termostatik bir fırın içine yerleştirilir ve daha önceden belirlenen bir sıcaklığa kadar ısıtılır. Vial içine konulan katı numune buharlaşma fazına geldiğinde, katı fazı ve buhar fazı arasında dengeye ulaşıldığı zaman örnek vial içi uçucu bileşenler içerir. Belli bir miktardaki buhar alınır ve analiz edilmesi için gaz kromatografisindeki kolona taşınır. Bu teknik ile sadece uçucu bileşikler kolona ulaşır. Uçucu olmayan bileşikler örnek vialin içinde kalır. Bu tekniği kullanarak örneklerden enjeksiyona uygun olmayan bileşenler analiz edilebilir. Örnek olarak polimerler ve yüksek derecede akışkan sıvılar vb. Bu yöntemle içeceklerde ve bozulmuş gıdalardaki uçucu bileşenler, kan alkol seviyeleri, su ve çevresel analizler yapılabilir. Headspace şartları çizelge 3.2’de, GC şartları da çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Headspace şartları: (Turbomatrix 40 Headspace Sampler, Perkin Elmer)

Oven (fırın) sıcaklığı	120°C
Needle (iğne) sıcaklığı	130°C
Transfer hattı sıcaklığı	130°C
Termostat zamanı	30 (dak.)
Enjeksiyon	300µl

Çizelge 3.3. GC şartları: Auto system XL, Perkin Elmer

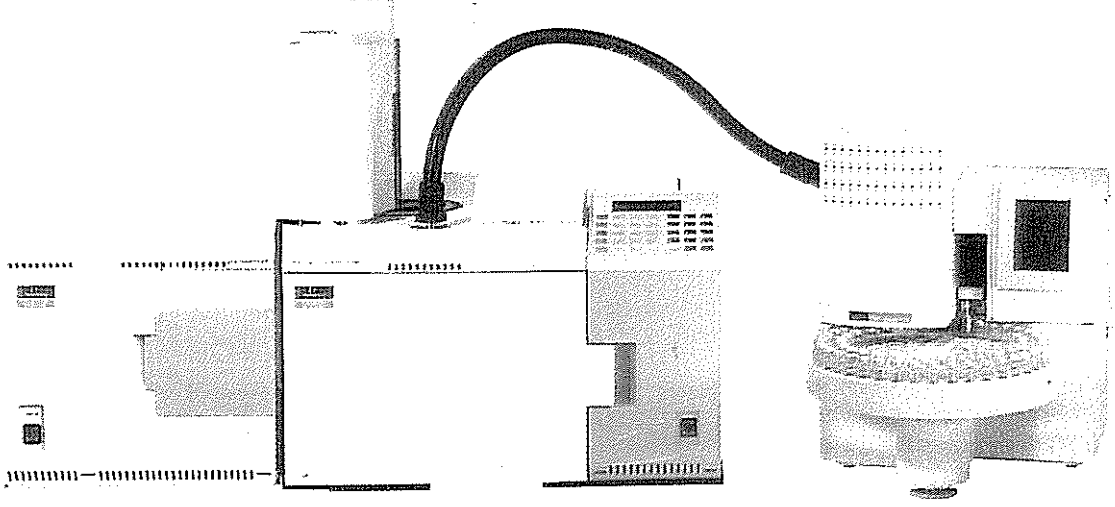
Kolon	PEWAX 60mx0.25x0.25
Oven (fırın) sıcaklığı	60°C 4dak. Başlangıç 5°C/dak. 200°C program
Taşıyıcı gaz	He 1ml/dak.

Karışımlar, duvarları ince bir sıvı ile kaplanmış uzun kapiller kolonların içerisinden gaz halinde geçerek Headspace'e ulaştırılıp bileşenlerine ayrıştırılır. Basit bir GC aletinde ortaya çıkan bileşenler ya ateş içinde yanar yada diğer bazı dedektörlerden geçerek atmosfere bırakılır. Tespit edilen bileşenler bir grafikte pikler olarak kaydedilir. Ortaya çıkan bileşenlerin ne olduğu kromatografide çıkan piklerin alan ve yüksekliklerinin ölçülmesiyle bulunur. Kromatografide bu pikler, tespit edilen bileşenlerin miktarına ve bileşenin kolondan geçmesi için geçen süreye karşılık gelir. Maksimum pike ulaşmak için geçen zaman gelme zamanıdır (Retention time).

3.2.8.4. Headspace Analizi

Bu çalışmada sıvı azot içerisinde saklanan numunelerden 1g'lık parçalar alınarak bir porselen kap içerisinde homojenize edilerek çizelge 3.2 ve 3.3'de belirtilen headspace şartları sağlandıktan sonra cihazının şişelerine sırası ile yerleştirilerek analize başlandı. Ayrıştırılan volatil maddelere ait kütle spektrumları yaklaşık olarak her bir numune için

18 dakika süre ile analiz edilerek sonuçlar elde edildi. 6 adet numune için 108 dakika süre sonunda GC/MS analizi sonuçlanmıştır.



Şekil 3.9. Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) ünitesi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Mikrobiyolojik Bulgular

Vakfikebir Ekmeği ekşi hamurunun mikrobiyolojik sayım sonuçları çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ekşi hamurların mikrobiyolojik sayım sonuçları (logkob/g)

Örnek No *	Örneğin alındığı fırının yeri	Laktik asit bakterileri		TAMB	Koliform	Enterobacteriaceae	Maya
		MRS	M17				
1	Vakfikebir	7.1	6.2	6.0	4.8	4.6	8.1
2	Vakfikebir	7.4	7.6	5.5	3.7	5.8	7.4
3	Vakfikebir	7.2	6.9	6.4	4.1	5.5	7.3
4	Vakfikebir	7.4	6.5	7.5	2.0	4.7	7.6
5	Beşikdüzü	7.4	6.3	7.5	2.0	5.8	7.7
6	Esiroğlu	7.1	7.5	6.7	3.3	5.8	7.8
7	Esiroğlu	7.6	6.8	6.6	4.2	5.8	7.7
8	Esiroğlu	7.5	6.5	6.0	2.9	5.6	7.3
9*	Erzurum	<2.0	<2.0	7.1	3.7	5.7	9.0

* Direkt sistemin uygulandığı francala hamuru

Laktik asit bakteri sayıları bakımından bütün Vakfikebir ekmeklerine ait hamur örnekleri birbirine yakın sonuçlar verirken (6.2-7.6 logkob/g), Francala ekmeğine ait hamurda saptanabilir sınırın altında (<2.0 logkob/g) olduğu tespit edilmiştir. Corsetti *et al.* (2001) tarafından yapılan araştırmada, buğday ekşi hamurunda 7.5-9.3 logkob/g aralığında laktik asit bakteri sayısı tespit edilmiştir. 2. no’lu Vakfikebir ekmeğine ait hamurda 5.5 logkob/g olarak tespit edilen TAMB sayısı, 4. ve 5 no’lu Vakfikebir

ekmeğinde 7.5 logkob/g seviyesinde çıkmıştır. En düşük koliform grubu bakteri sayısı 2logkob/g 4. ve 5 no'lu Vakfikebir ekmeklerine ait hamurlarda, en yüksek ise 1 no'lu Vakfikebir ekmeğine ait hamurda (4.8 logkob/g) tespit edilmiştir. Formülasyona daha fazla maya ilave edildiği için (Kotancılar *et al.* 1998) Francala ekmeğine ait hamurda (9.0 logkob/g), Vakfikebir ekmeğine ait hamurlardan daha fazla maya tespit edilmiştir. Mayaların çoğu *S. cerevisiae*'ye ait olup log 7.3-9 kob/g arasında bulunmuştur. Diğer maya izolatları ise *C. sorbophila*, *C. krusei*, *Hansenula anomala*, *Zygosaccharomyces mrakii*'dir.

Üretim sırasında hijyenik şartlara uyulmamasının bir sonucu olarak çeşitli mikroorganizmalar gıdaları bulaşmaktadırlar. Bunun sonucunda örneklerde *Enterobacteriaceae*, koliform bakteriler, *Enterococcus* ve *Bacillus* (özellikle *Bacillaceae cereus*) tespit edilmektedir. Buna rağmen miktarları sağlık için tehlike kabul edilen sınırların altındadır. Ekşi hamurların rölatif olarak yüksek asetik asit içeriği, ekmeğin mikrobiyal bozulmasına karşı koruyucu etki oluşturduğu belirtilmektedir (Rocha and Malcata 1999). Vakfikebir Ekmeğinin laktik asit bakterileri ve maya içeriği dünyanın değişik bölgelerinde üretilen ekşi hamurların içeriklerine benzer miktarlardadır.

4.1.1. Laktik Asit Bakteri İzolatları

Ekşi hamur örneklerinden identifiye edilen laktik asit bakterileri çizelge 4.2'de verilmiştir. MIS sisteminin uygulanması sonucunda 158 laktik asit bakteri izolatından *Lactobacillus* cinsine ait türler *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (%5.69) 9 adet, *Lactobacillus fermentum* (%5.69) 9 adet, *Lactobacillus bif fermentans* (%5.06) 8 adet, *Lactobacillus vaccinatorius* (%3.79) 6 adet, *Lactobacillus parabuchneri* (%3.16) 5 adet, *Lactobacillus paracasei subsp. tolerans* (%3.16) 5 adet, *Lactobacillus cellobiosus* (%3.16) 5 adet, *Lactobacillus malefermentans* (%2.53) 4 adet, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (%2.53) 4 adet, *Lactobacillus sanfrancisco* (%1.89) 3 adet, *Lactobacillus buchneri* (%1.89) 3 adet, *Lactobacillus helveticus* (%1.26) 2 adet, *Lactobacillus curvatus* (%1.26) 2 adet, *Lactobacillus alimentarius* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus brevis* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus oris* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. lactis (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus sakei* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus suebicus* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus coryniformis subsp. torquens* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus farciminis* (%0.63) 1 adet türleri bulunmuştur.

Ekşi hamur örneklerinde izole edilen 158 suştan *Streptococcus* cinsine ait türler ise, *Streptococcus sangius* (%17.72) 28 adet, *Pediococcus* türlerinin dağılımı; *P. damnosus* (%3.79) 6 adet, *P. acidilactici* (%0.63) 1 adet, *P. halophilus* (*Tetragenococcus halophila*) (%0.63) 1 adet, *Entrococcus* türlerine ait dağılım; *E. faecalis* (%17.72) 28 adet, *E. faecium* (%1.26) 2 adet, *E. hirae* (%0.63) 1 adet, *Lactococcus* türlerine ait dağılım; *Lactococcus lactis subsp. lactis* (%3.16) 5 adet, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (%3.79) 6 adet, *Leuconostoc* türlerine ait dağılım; *Leuconostoc pseudomesenteroides* (%0.63) 1 adet, *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* (%0.63) 1 adet, *Weissella* türlerine ait dağılım; *Weissella candleri* (%0.63) 1 adet, *Weissella confusa* (%0.63) 1 adet, ayrıca *Oenococcus oeni* (%0.63) 1 adet ve *Cellulomonas turbata* (%0.63) 1 adet olarak çizelge 4.2’de tanımlanmıştır.

Çizelge 4.2. Ekşi hamur örneklerinden identifiye edilen Laktik asit bakterileri

Örnek No	Besiyeri	İzolat No	İzolat
1	MRS	GM 101	<i>Lactobacillus suebicus</i>
	MRS	GM 102	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
	MRS	GM 103	<i>Lactobacillus brevis</i>
	MRS	GM 104	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
	MRS	GM 105	<i>Pediococcus damnosus</i>
	MRS	GM 106	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
	MRS	GM 107	<i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i>
	MRS	GM 108	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	MRS	GM 109	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>
	M17	GM 110	<i>Enterococcus faecium</i>
	M17	GM 111	<i>Lactococcus lactis subsp. cremorris</i>
	M17	GM 112	<i>Lactococcus lactis subsp. cremorris</i>
	M17	GM 113	<i>Enterococcus hirae</i>
	M17	GM 114	<i>Lactococcus lactis subsp. cremorris</i>
	M17	GM 115	<i>Enterococcus faecalis</i>
2	M17	GM201	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM202	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM203	<i>Lactococcus lactis subsp. cremorris</i>
	M17	GM204	<i>Lactococcus lactis subsp. cremorris</i>
	M17	GM205	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM206	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM207	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM208	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM209	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM210	<i>Streptococcus sangius</i>
	MRS	GM211	<i>Lactobacillus bif fermentans</i>
	MRS	GM212	<i>Lactobacillus bif fermentans</i>
	MRS	GM213	<i>Lactobacillus bif fermentans</i>
	MRS	GM214	<i>Lactobacillus male fermentans</i>
	MRS	GM215	<i>Lactobacillus bif fermentans</i>
	MRS	GM216	<i>Pediococcus damnosus</i>
	MRS	GM217	<i>Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis</i>
	MRS	GM218	<i>Lactobacillus bif fermentans</i>
	MRS	GM219	<i>Lactobacillus bif fermentans</i>

Çizelge 4.2. (devam)

Örnek No	Besiyeri	İzolat No	İzolat
3	MRS	GM 301	<i>Weissella confusa</i>
	MRS	GM 302	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	MRS	GM 303	<i>Lactobacillus Helveticus</i>
	MRS	GM 304	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
	MRS	GM 305	<i>Lactobacillus farciminis</i>
	MRS	GM 306	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	MRS	GM 307	<i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i>
	MRS	GM 308	<i>Lactobacillus sakei</i>
	MRS	GM 309	<i>Lactobacillus bifermentans</i>
	MRS	GM 310	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
	MRS	GM 311	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	MRS	GM 312	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
	M17	GM 313	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 314	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 315	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 316	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 317	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 318	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
	M17	GM 319	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
	M17	GM 320	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum</i>
	M17	GM 321	<i>Enterococcus faecalis</i>
4	M17	GM 401	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 402	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 403	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 404	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 405	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 406	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 407	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 408	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 409	<i>Streptococcus sangius</i>
	MRS	GM 410	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
	MRS	GM 411	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	MRS	GM 412	<i>Tetragenacoccus halophila</i>
	MRS	GM 413	<i>Lactobacillus buchneri</i>
	MRS	GM 414	<i>Lactobacillus buchneri</i>
	MRS	GM 415	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
	MRS	GM 416	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	MRS	GM 417	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
	MRS	GM 418	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>
	MRS	GM 419	<i>Weissella kandleri</i>

Çizelge 4.2. (devam)

Örnek No	Besiyeri	İzolat No	İzolat
5	MRS	GM 501	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
	MRS	GM 502	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>
	MRS	GM 503	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	MRS	GM 504	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>
	MRS	GM 505	<i>Lactobacillus vaccinatorius</i>
	MRS	GM 506	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>
	MRS	GM 507	<i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i>
	MRS	GM 508	<i>Lactobacillus sanfrancisco</i>
	M17	GM 509	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	M17	GM 510	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
	M17	GM 511	<i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i>
	M17	GM 512	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
	M17	GM 513	<i>Oenococcus oeni</i>
	M17	GM 514	<i>Cellulomonas turbata</i>
	M17	GM 515	<i>Streptococcus sanguis</i>
	M17	GM 516	<i>Lactobacillus sanfrancisco</i>
	M17	GM 517	<i>Lactobacillus sanfrancisco</i>
	M17	GM 518	<i>Streptococcus sanguis</i>
6	MRS	GM 601	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MRS	GM 602	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MRS	GM 603	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MRS	GM 604	<i>Enterococcus faecium</i>
	MRS	GM 605	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MRS	GM 606	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MRS	GM 607	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MRS	GM 608	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MRS	GM 609	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MRS	GM 610	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MRS	GM 611	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
	MRS	GM 612	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 613	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	M17	GM 614	<i>Lactobacillus malefermentans</i>
	M17	GM 615	<i>Pediococcus damnosus</i>
	M17	GM 616	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
	M17	GM 617	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
	M17	GM 618	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
	M17	GM 619	<i>Lactobacillus coryniformis subsp. torquens</i>
	M17	GM 620	<i>Lactobacillus buchneri</i>
	M17	GM 621	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
	M17	GM 622	<i>Lactobacillus oris</i>
	M17	GM 623	<i>Lactobacillus alimentarius</i>

Çizelge 4.2. (devam)

Örnek No	Besiyeri	İzolat No	İzolat
7	MRS	GM 701	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	MRS	GM 702	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	MRS	GM 703	<i>Pediococcus damnosus</i>
	MRS	GM 704	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	MRS	GM 705	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	MRS	GM 706	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	MRS	GM 707	<i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i>
	MRS	GM 708	<i>Lactobacillus vaccinatorcus</i>
	MRS	GM 709	<i>Pediococcus damnosus</i>
	MRS	GM 710	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	MRS	GM 711	<i>Pediococcus damnosus</i>
	MRS	GM 712	<i>Lactobacillus bifementans</i>
	M17	GM 713	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 714	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 715	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 716	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 717	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 718	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 719	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
	M17	GM 720	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
	M17	GM 721	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 722	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 723	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 724	<i>Enterococcus faecalis</i>
8	MRS	GM 801	<i>Lactobacillus malefermentans</i>
	MRS	GM 802	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	MRS	GM 803	<i>Lactobacillus vaccinatorcus</i>
	MRS	GM 804	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	MRS	GM 805	<i>Lactobacillus vaccinatorcus</i>
	MRS	GM 806	<i>Lactobacillus malefermentans</i>
	MRS	GM 807	<i>Lactobacillus vaccinatorcus</i>
	MRS	GM 808	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	MRS	GM 809	<i>Lactobacillus vaccinatorcus</i>
	M17	GM 810	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 811	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 812	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 813	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 814	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 815	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 816	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 817	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M17	GM 818	<i>Streptococcus sangius</i>
	M17	GM 819	<i>Enterococcus faecalis</i>

Spicher and Schröder (1978) tarafından yapılan çalışmada da, değişik bölgelerden elde edilen üç çeşit saf ekşi maya kültürlerinin bakteri içeriği incelenmiştir. Beijerinck genusuna ait 245 izolat elde edilmiş, bunlar morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterlerine göre sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflandırma sonucunda *Thermobacterium* (*Lactobacillus acidophilus*), *Streptobacterium* (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus alimentarius*) ve *Betabacterium* (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus brevis* var. *lindneri*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fructivorans*) gruplarına ayrılmıştır.

Yine ekşi maya hamuru mikroflorası üzerine yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus brevis* ssp. *lindneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida crusei*, *Saccharomyces exiguus*, *Hansenula anomala* suşlarını izole edilmiştir (Gobbetti et al. 1994a).

Corsetti et al. (2001) tarafından yapılan çalışmada, İtalya buğday ekşi maya hamuru mikroflorası incelenmiş, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* suşları izole edilmiştir.

Vakfikebir Ekmeğinde yaptığımız microflora incelemesinde *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus bifermentans*, *Lactobacillus vaccinatorius*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus paracasei tolerans*, *Lactobacillus lactis* spp. *lactis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Pediococcus damnosus*, predominant suşlar olarak bulunmuştur. Hamurun bu yapısıyla ekmeğimizin İtalya buğday ekşi maya hamurundan üretilen ekmeğe mikrobiyolojik olarak kısmen

benzerdir. Vakfıkebir Ekmeğinde tespit ettiğimiz *Streptococcus sangius*, *Enterococcus faecalis* dünyanın değişik yörelerinde kullanılan ekşi maya hamuru ile üretilen ekmeklerde baskın olarak bulunmadığı gözlenmiştir.

4.1.2. Maya İzolatları

İsveç'te üretilen panettone ve buğday ekmekleri üretiminde kullanılan buğday ekşi maya hamurlarında *S. cerevisiae*, *S. servazzi*, *C. milleri* bulunmuş, Hollanda'da ticari olarak satılan buğday ekşi maya hamur starterinde *S. exiguus* (Spicher 1987) bulunmuştur. Sudan'da sorgumdan üretilen Kisra diye adlandırılan kabarmamış ekmek yapımında kullanılan hamurda *C. krusei* (Hamad *et al.* 1992),İtalya'nın Umbria bölgesine özgü buğday ekşi hamurunda *S. cerevisiae*, *C. krusei*, *S. exiguus*, *H. anomala* bulunmuştur (Gobbetti *et al.* 1994a).

Araştırmamız sonucunda oldukça fazla *S.cerevisiae* tespit edilmiş olup *C. sorbophila*, *H. anomala*, *C. krusei*, *Zygosaccharomyces mrakii* tespit edilmiştir.

İzole edilen mayaların türlerine ait bilgiler çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzolasyon sonucu teşhis edilen maya türleri

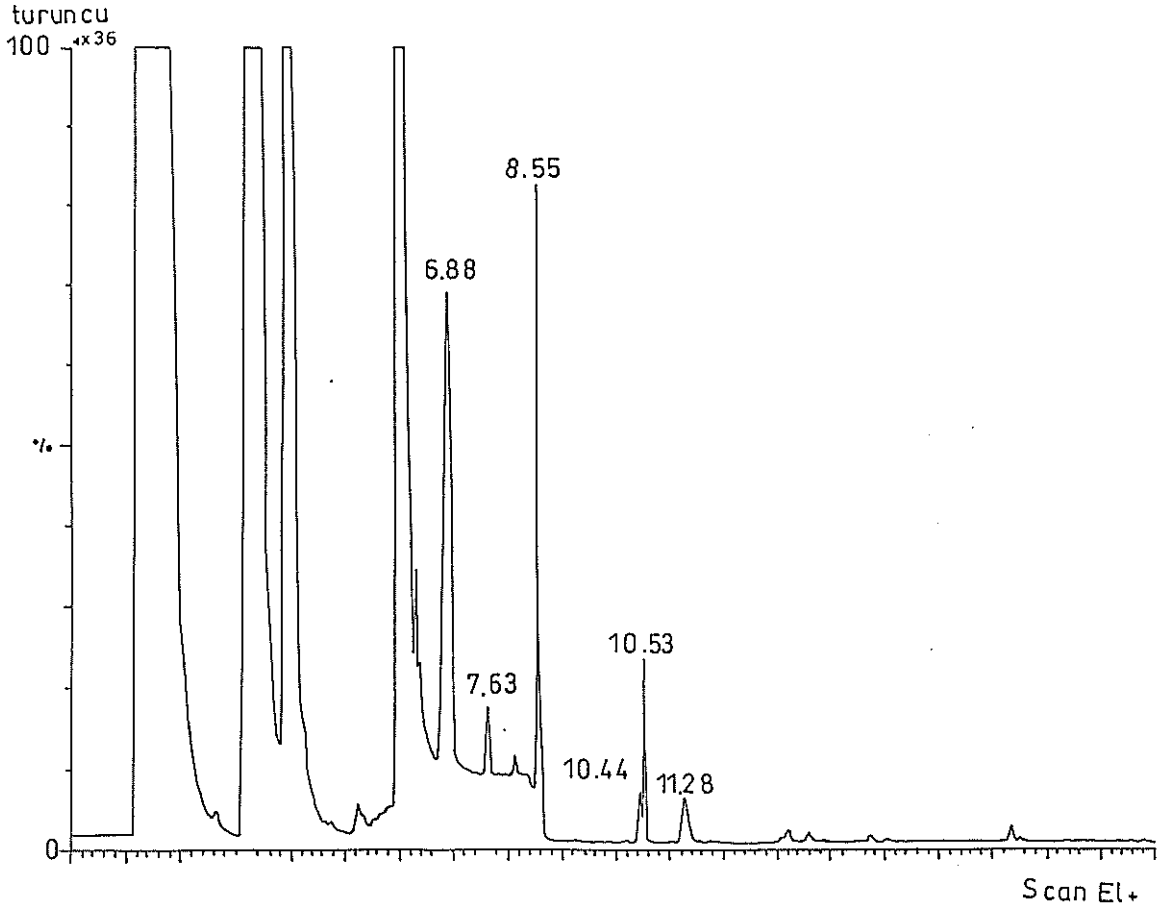
Suş No	Maya Türü	Suş No	Maya Türü
GM 101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 201	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 102	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 202	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 103	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 203	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 104	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 204	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 105	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 205	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 106	<i>Candida sorbophila</i>	GM 206	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 107	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 207	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 108	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 208	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 109	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 209	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 110	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 210	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 301	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 401	<i>Zygosaccharomyces mrakii</i>
GM 302	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 402	<i>Hansenula anomala</i>
GM 303	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 403	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 304	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 404	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 305	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 405	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 306	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 406	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 307	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 407	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 308	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 408	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 309	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 409	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 310	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 410	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Çizelge 4.3. (devam)

Suş No	Maya Türü	Suş No	Maya Türü
GM 501	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 601	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 502	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 602	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 503	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 603	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 504	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 604	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 505	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 605	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 506	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 606	<i>Candida sorbophila</i>
GM 507	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 607	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 508	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 608	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 509	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 609	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 510	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 610	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 701	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 801	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 702	<i>Candida krusei</i>	GM 802	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 703	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 803	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 704	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 804	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 705	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 805	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 706	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 806	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 707	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 807	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 708	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 808	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 709	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 809	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GM 710	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GM 810	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

4.2. Aroma Bulguları

Francala ekmek hamuruna ait ana fermentasyon sonucu oluşan aroma maddelerini gösteren gaz kromatogramı şekil 4.1’de gösterilmiştir. Oluşan bu aroma maddelerinin formülü, molekül ağırlığı, alıkonma süreleri ve % miktarları da çizelge 4. 4’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Francala ekmeğine ait hamurun ana fermentasyon sonrası gaz kromatogramı

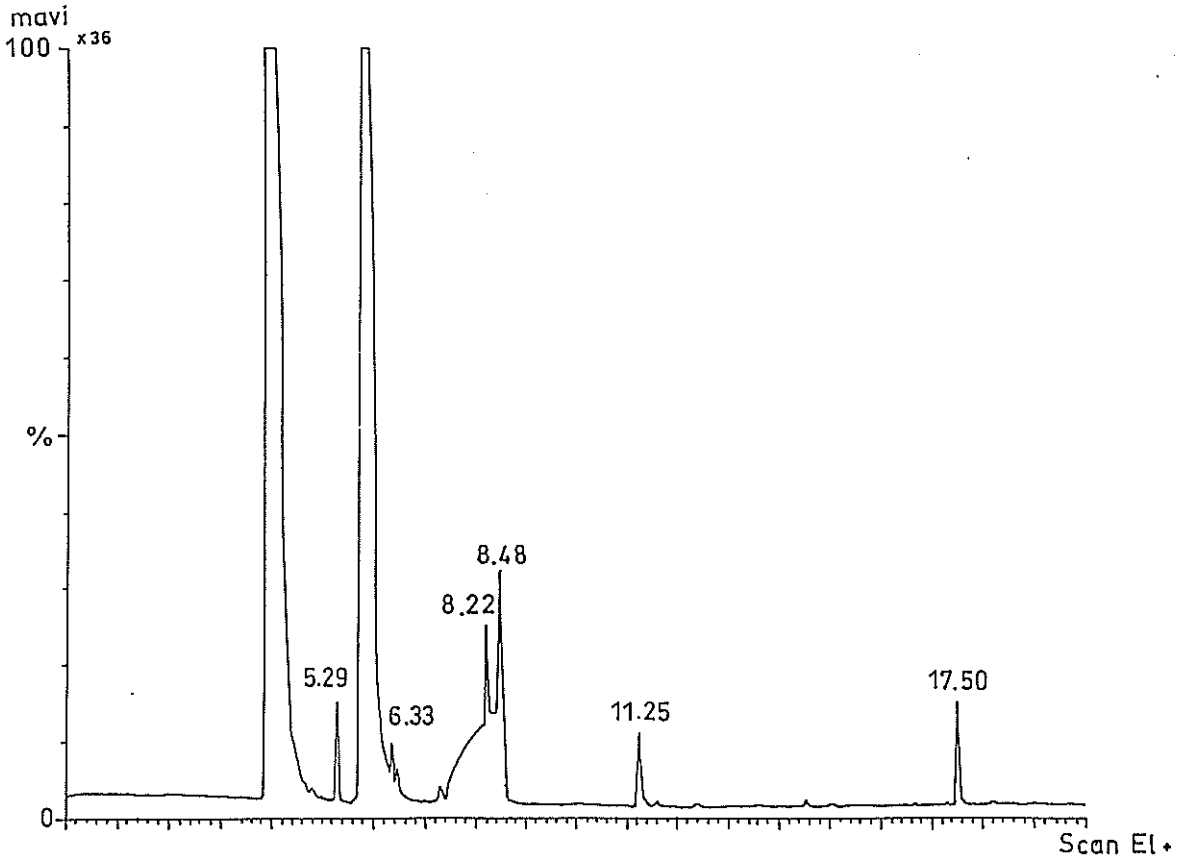
Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi Francala ekmeğinin ana fermentasyon çıkışlı hamur örneklerinde yapılan GC/MS sonuçlarına göre 4 madde hariç (2-furan karboksi aldehit, octanal, heptanal, etil asetat) bütün bileşenlere rastlanmıştır. En yüksek oranda %52.32 etilamin, %33.52 aset aldehit, %13.24 ile etanol olduğu gözlenmiştir. Ayrıca örnek içerisinde 6 eser maddeye (2-propanamin, diasetil, hexanal, 2-*n*-pentilfuran, *n*-hexanol, *n*-nonanal) rastlanmıştır.

Çizelge 4.4. Ana fermentasyon sonrası oluşan aroma maddeleri (Francala)

Pik No	Bileşik Adı	Formül No	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Alıkonulma Süresi (dakika)	Miktarı (%)
1	Etilamin	C ₂ H ₇ N	45	1.23	52.32
2	2-Propan amin	C ₃ H ₉ N	59	1.63	Eser
3	Etil asetat	C ₄ H ₈ O ₂	88	2.73	-
4	Asetaldehit	C ₂ H ₄ O	44	3.34	33.52
5	Diasetil	C ₄ H ₆ O ₂	86	5.28	Eser
6	Etanol	C ₂ H ₆ O	46	5.78	13.24
7	2- veya 3- Metil butanal*	C ₅ H ₁₀ O	86	6.88	0.59
8	Propanol	C ₃ H ₁₀ O	62	7.63	0.03
9	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	8.22	Eser
10	İzobutil alkol	C ₆ H ₁₂ O	75	8.55	0.14
11	3-metil-1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	88	10.27	0.09
12	Heptenal*	C ₇ H ₁₄ O	114	10.62	-
13	<i>n</i> -Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	88	11.22	-
14	2- <i>n</i> - Pentilfuran	C ₉ H ₁₂ O	138	11.56	Eser
15	3-Hidroksi- 2-butanon	C ₄ H ₈ O	88	13.27	0.01
16	Octanal	C ₈ H ₁₆ O	128	14.509	-
17	<i>n</i> -Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	14.71	Eser
18	<i>n</i> -Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	15.078	Eser
19	Asetik asit	C ₂ H ₄ O ₂	60	17.47	0.01
20	2-Furan karboksialdehit	C ₅ H ₄ O ₂	96	18.14	-

* Gerçek izomer teşhis edilemedi

Francala ekmek hamuruna ait son fermentasyon sonucu oluşan aroma maddelerini gösteren gaz kromatogramı şekil 4.2’de, oluşan bu aroma maddelerinin formülü, molekül ağırlığı, alıkonma süreleri ve % miktarları da çizelge 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Son fermentasyon sonrası gaz kromatogramı (Francala)

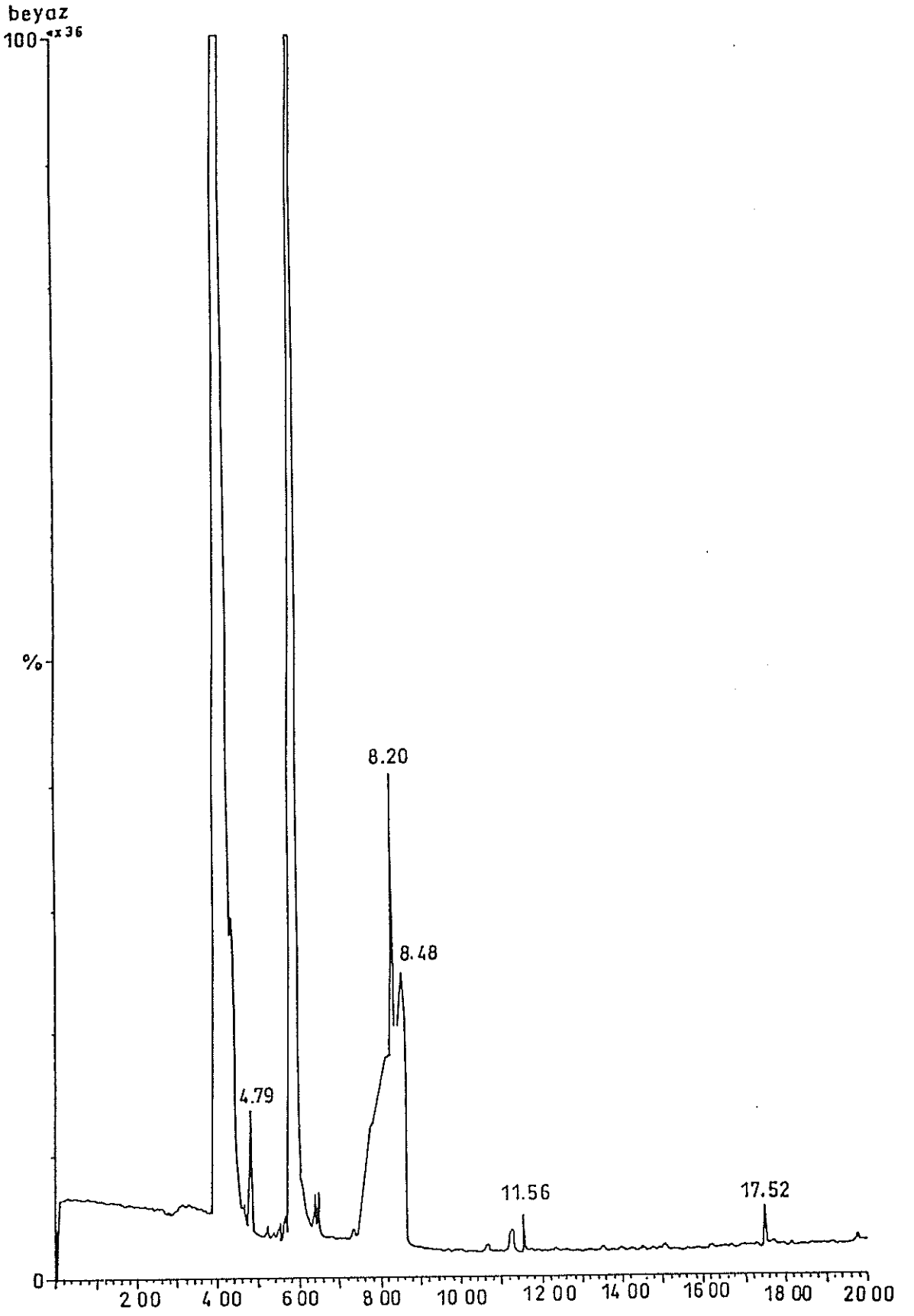
Francala ekmeğinin fırına atılmadan önceki son fermentasyon sonrası hamur örneklerinde yapılan GC/MS sonuçlarına göre en yüksek bileşenin %98.74 ile etanol olduğu bulunmuştur. Bileşenler arasında 10 maddeye (etilamin, izopropilamin, etil asetat, asetaldehit, 3-metil-2-butanol, heptanal, 3-hidroksi-2-butanon, hexanol) rastlanmamış, örnekte üç bileşenin de (octanal, *n*-nonanal, 2-furan karboksialdehit) eser miktarda olduğu görülmüştür (çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Son fermentasyon sonrası oluşan aroma maddeleri (Francala)

Pik No	Bileşik Adı	Formül No	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Alıkonulma Süresi (dakika)	Miktarı (%)
1	Etilamin	C ₂ H ₇ N	45	1.23	-
2	2-Propan amin	C ₃ H ₉ N	59	1.63	-
3	Etil asetat	C ₄ H ₈ O ₂	88	2.73	-
4	Asetaldehit	C ₂ H ₄ O	44	3.34	0.20
5	Diasetil	C ₄ H ₆ O ₂	86	5.28	-
6	Etanol	C ₂ H ₆ O	46	5.78	98.74
7	2- veya 3- Metil butanal*	C ₅ H ₁₀ O	86	6.88	-
8	Propanol	C ₃ H ₁₀ O	62	7.63	-
9	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	8.22	0.16
10	İzobutil alkol	C ₆ H ₁₂ O	75	8.48	0.44
11	3-Metil-1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	88	10.27	-
12	Heptenal*	C ₇ H ₁₄ O	114	10.62	-
13	<i>n</i> -Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	88	11.22	0.24
14	2- <i>n</i> - Pentilfuran	C ₉ H ₁₂ O	138	11.56	-
15	3-Hidroksi- 2-butanon	C ₄ H ₈ O	88	13.21	0.01
16	Octanal	C ₈ H ₁₆ O	128	14.51	Eser
17	<i>n</i> -Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	14.72	-
18	<i>n</i> -Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	15.08	Eser
19	Asetik asit	C ₂ H ₄ O ₂	60	17.52	0.22
20	2-Furan karboksialdhit	C ₅ H ₄ O ₂	96	18.12	Eser

* Gerçek izomer teşhis edilemedi

Francala ekmeklerin fırında pişirildikten sonra kabuk ve iç kısmından alınan homojen örneklere ait aroma maddelerini gösteren gaz kromatogramı şekil 4.3'de, oluşan bu aroma maddelerinin formülü, molekül ağırlığı, alıkonma süreleri ve % miktarları da çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.3. Fırında pişirilen Francala ekmeğın gaz kromatogramı

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi, francala ekmeğinde yapılan GC/MS analizi sonucunda etanole %98.17 oranında ana volatil bileşen olarak bulunmuş, diğer volatil bileşiklere değişik oranlarda ve eser miktarlarda rastlanmıştır.

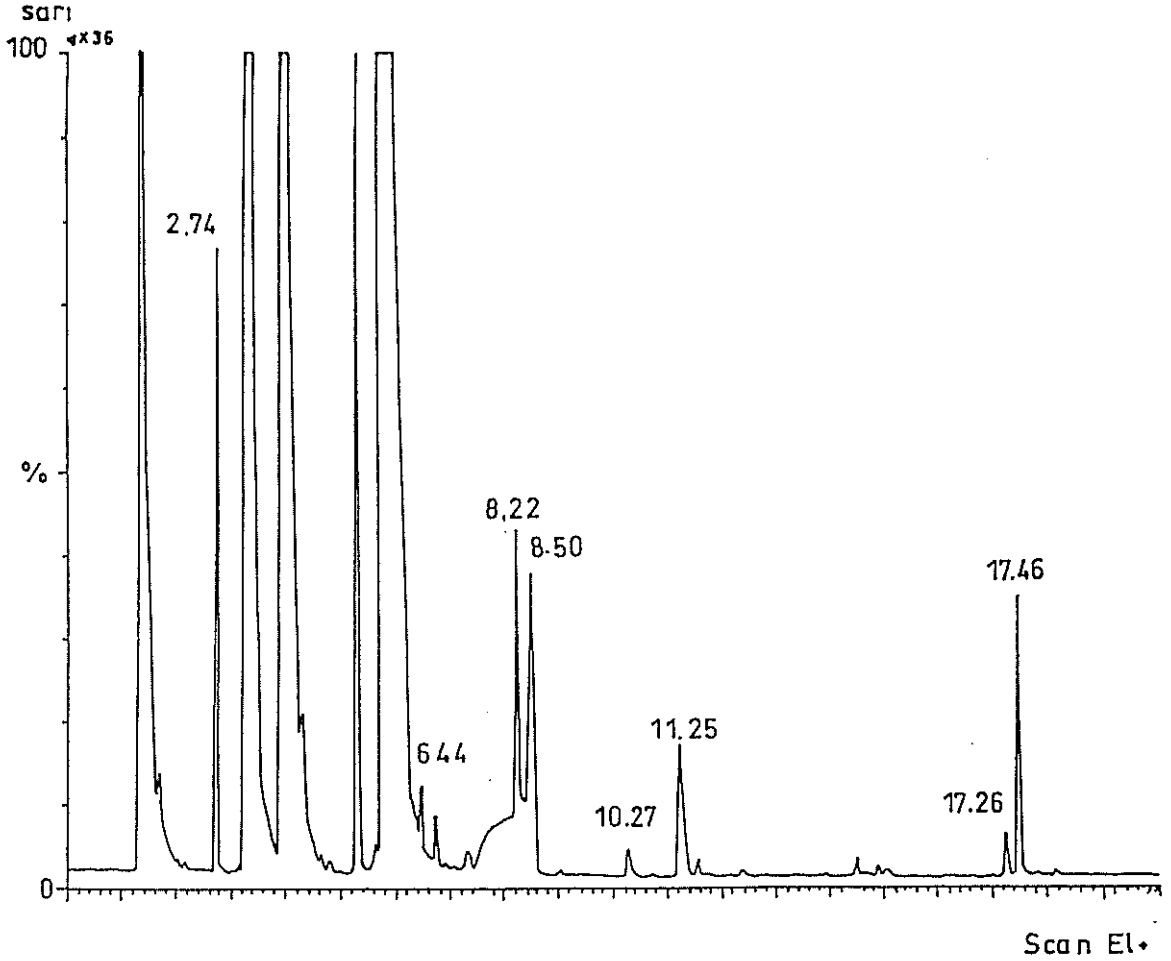
Çizelge 4.6. Fırında pişirilen Francala ekmeğın aroma maddeleri

Pik No	Bileşik Adı	Formül No	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Alıkonulma Süresi (dakika)	Miktarı (%)
1	Etülamın	C ₂ H ₇ N	45	1.23	-
2	2-Propan amin	C ₃ H ₉ N	59	1.63	-
3	Etü asetat	C ₄ H ₈ O ₂	88	2.73	-
4	Asetaldehit	C ₂ H ₄ O	44	3.34	-
5	Teşhis edilemedi	-	-	4.79	0.46
6	Diasetil	C ₄ H ₆ O ₂	86	5.28	Eser
7	Etanol	C ₂ H ₆ O	46	5.76	98.17
8	2- veya 3- Metil butanal*	C ₅ H ₁₀ O	86	6.88	-
9	Propanol	C ₃ H ₁₀ O	62	7.63	-
10	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	8.22	1.01
11	İzobutil alkol	C ₆ H ₁₂ O	75	8.48	Eser
12	3-Metil-1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	88	10.27	-
13	Heptenal*	C ₇ H ₁₄ O	114	10.62	0.01
14	<i>n</i> -Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	88	11.24	0.14
15	2- <i>n</i> - Pentilfuran	C ₉ H ₁₂ O	138	11.55	0.08
16	3-Hidroksi-2-butanon	C ₄ H ₈ O	88	13.21	-
17	Octanal	C ₈ H ₁₆ O	128	14.51	Eser
18	<i>n</i> -Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	14.72	-
19	<i>n</i> -Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	15.08	Eser
20	Asetik asit	C ₂ H ₄ O ₂	60	17.51	0.13
21	2-Furan karboksialdehit	C ₅ H ₄ O ₂	96	18.12	Eser

* Gerçek izomer teşhis edilemedi

Françala ekmeklerinin kabuk ve iç kısmından alınan homojen ekmek örneklerinde yapılan GC/MS analizinde en yüksek oranda %98,17 ile etanol'e rastlanmıştır, aynı örnekte 9 volatil maddeye (etilamin, izopropil amin, etil asetat, diasetil, metil butanol, propanol, 3-hidroksi-2-butanon, hexanol) rastlanmamıştır. Ayrıca 5 madde (diasetil, izobutil alkol, octanal, *n*-nonanal, 2-furan karboksialdehit) eser miktarlarda tespit edilmiştir (çizelge 4.6).

Vakfikebir ekmeği üretim prosesindeki 1.ekşi hamurun fermentasyon sonrası oluşan aroma maddelerini gösteren gaz kromatogramı şekil 4.4'de, oluşan bu aroma maddelerinin formülü, molekül ağırlığı, alıkonma süreleri ve % miktarları da çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Vakfikebir ekmeği üretim prosesindeki 1.ekşi hamurun fermentasyon sonrası gaz kromatogramı

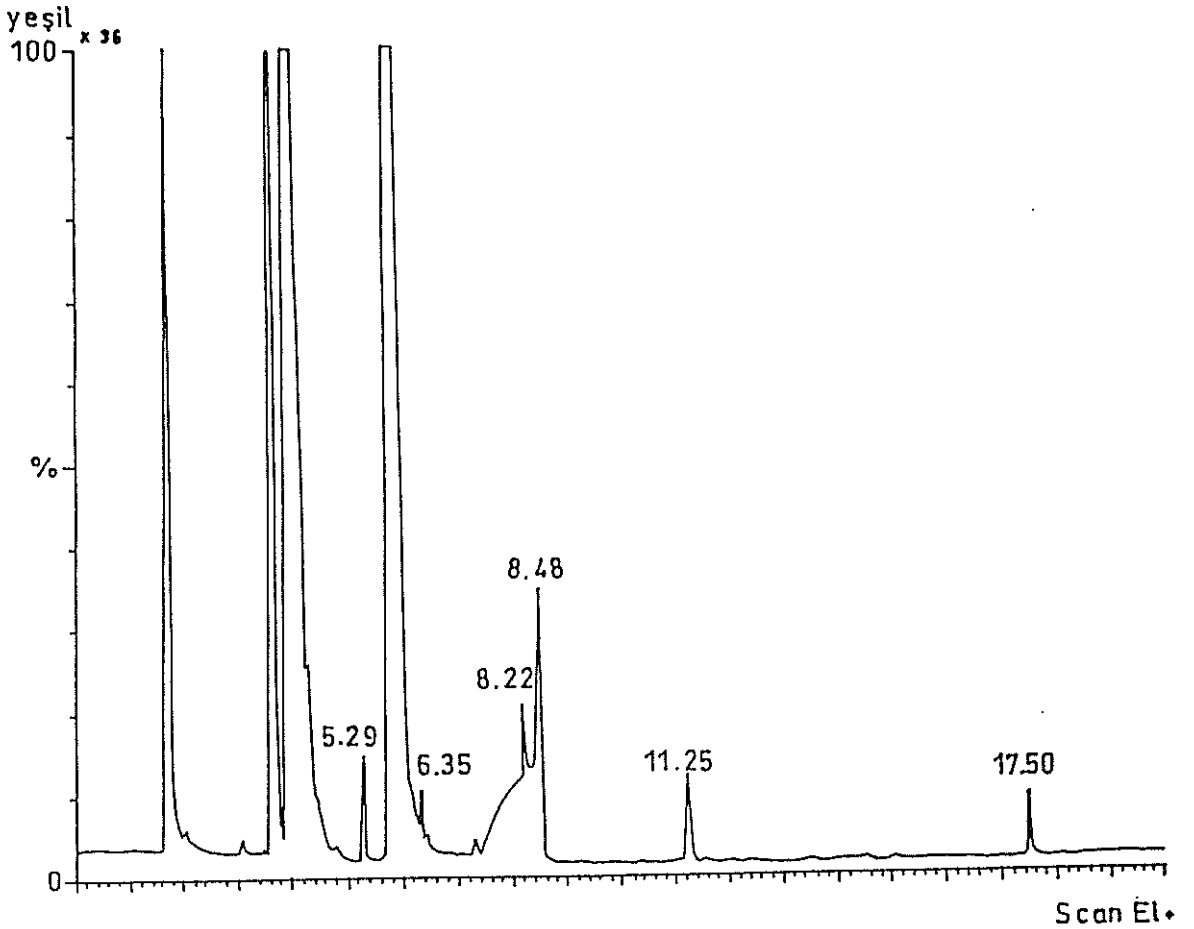
Çizelge 4.7. Vakfikebir ekmeği üretim prosesindeki 1.ekşi hamurun aroma maddeleri

Pik No	Bileşik Adı	Formül No	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Alıkonulma Süresi (dakika)	Miktarı (%)
1	Etilamin	C ₂ H ₇ N	45	1.32	15.13
2	2-Propan amin	C ₃ H ₉ N	59	1.63	Eser
3	Etil asetat	C ₄ H ₈ O ₂	88	2.73	0.38
4	Asetaldehit	C ₂ H ₄ O	44	3.30	24.64
5	Teşhis edilemedi	-	-	4.77	-
6	Diasetil	C ₄ H ₆ O ₂	86	5.28	0.91
7	Etanol	C ₂ H ₆ O	46	5.85	58.07
8	2- veya 3- Metil butanal*	C ₄ H ₁₀ O	72	6.88	Eser
9	Propanol	C ₃ H ₁₀ O	62	7.63	-
10	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	8.22	0.15
11	İzobutil alkol	C ₄ H ₁₀ O	74	8.49	0.20
12	3-metil-1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	88	10.27	0.04
13	Heptenal*	C ₇ H ₁₄ O	114	10.62	-
14	<i>n</i> -Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	88	11.24	0.18
15	2- <i>n</i> - Pentilfuran	C ₉ H ₁₂ O	138	11.55	0.01
16	Teşhis edilemedi	-	-	12.34	0.01
17	3-Hidroksi- 2-butanon	C ₄ H ₈ O	88	13.21	-
18	Octanal	C ₈ H ₁₆ O	128	14.50	0.01
19	<i>n</i> -Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	14.72	Eser
20	<i>n</i> -Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	15.08	Eser
21	Teşhis edilemedi	-	-	17.25	0.04
22	Asetik asit	C ₂ H ₄ O ₂	60	17.47	0.23
23	2-Furan karboksialdehit	C ₅ H ₄ O ₂	96	18.14	Eser

*Gerçek izomer teşhis edilemedi

Vakfikebir ekmeğinin yapımında kullanılan 1. ekşi hamur örneklerinde yapılan GC/MS analizi sonucunda bulunan volatillerden n-propanol, heptanol, 3-hidroksi-2-butanon haricinde tüm bileşenlere rastlanmıştır. En yüksek bileşenin %58.88 ile etanol, %24.64 ile asetaldehit, %15.13 ile etilamin olduğu, en düşük oranda da 2-n-pentil furan ve octanal'a rastlanmıştır. Eser miktarlarda 5 bileşiğin (2-propanamin, 2- veya 3- Metil butanal, n-hexanol, n-nonanal, 2-furan karboksi aldehit) olduğu tespit edilmiştir. Diğer analiz sonuçları ile ekşi hamur analiz sonuçları karşılaştırıldığında en fazla uçucu maddeye bu örnekte rastlanmıştır (çizelge 4.7).

Vakfikebir ekmeği üretim prosesindeki hamurun son fermentasyon sonrası oluşan aroma maddelerini gösteren gaz kromatogramı şekil 4.5'de, oluşan bu aroma maddelerinin formülü, molekül ağırlığı, alıkonma süreleri ve % miktarları da çizelge 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Vakfikebir ekmeği üretim prosesindeki hamurun son fermentasyon sonrası gaz kromatogramı

Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi, vakfikebir ekmeğın yapımında kullanılan son fermentasyona ait hamur örneklerinde yapılan GC/MS analiz sonucunda teşhis edilemeyen (RT: 2.6) bir bileşiğe rastlanmıştır.

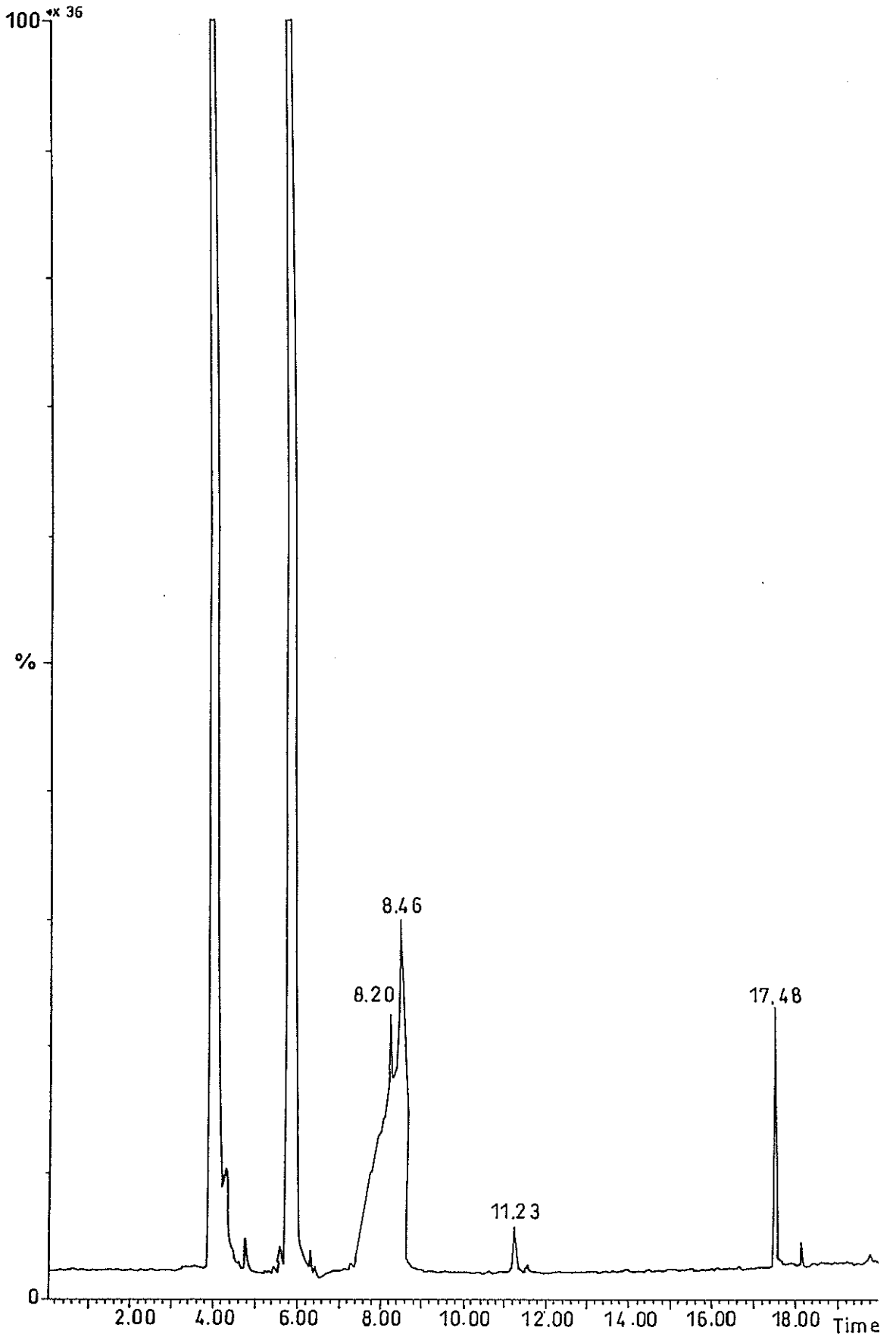
Çizelge 4.8. Vakfikebir ekmeği üretim prosesindeki hamurun son fermentasyon sonrası aroma maddeleri.

Pik No	Bileşik Adı	Formül No	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Alıkonulma Süresi (dakika)	Miktarı (%)
1	Etilamin	C ₂ H ₇ N	45	1.32	-
2	2-Propan amin	C ₃ H ₉ N	59	1.67	14.86
3	Teşhis edilemedi	-	-	2.06	Eser
4	Etil asetat	C ₄ H ₈ O ₂	88	2.73	-
5	Asetaldehit	C ₂ H ₄ O	44	3.61	4.29
6	Diasetil	C ₄ H ₆ O ₂	86	5.28	0.14
7	Etanol	C ₂ H ₆ O	46	5.80	79.88
8	2- veya 3- Metil butanal*	C ₅ H ₁₀ O	86	6.88	Eser
9	Propanol	C ₃ H ₁₀ O	62	7.63	-
10	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	8.22	Eser
11	İzobutil alkol	C ₆ H ₁₂ O	75	8.47	0.52
12	3-Metil-1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	88	10.27	-
13	Heptenal	C ₇ H ₁₄ O	114	10.62	Eser
14	<i>n</i> -Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	88	11.24	0.21
15	2- <i>n</i> -Pentilfuran	C ₉ H ₁₂ O	138	11.55	Eser
16	3-Hidroksi- 2-butanon	C ₄ H ₈ O	88	13.21	-
17	Octanal	C ₈ H ₁₆ O	128	14.50	Eser
18	<i>n</i> -Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	14.72	-
19	<i>n</i> -Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	15.08	Eser
20	Asetik asit	C ₂ H ₄ O ₂	60	17.49	0.09
21	2-Furan karboksialdehit	C ₅ H ₄ O ₂	96	18.14	-

* Gerçek izomer teşhis edilemedi

En yüksek bileşenin %79.88 etanol ve %14.86 ile izopropan amin, %4.29 ile aset aldehit olduğu bulunmuştur. Örnekte en düşük oranda bileşiğin asetik asit olduğu gözlenmiş, 7 eser bileşene (2- veya 3- Metil butanal, hexanal, heptenal, 2-n-pentilfuran, octanal, n-nonanal) rastlanmış 7 bileşen ise (etil amin, etil asetat, propanol, 3-hidroksi-2-butanon, *n*-hexanol, 2-furan karboksi aldehit) rastlanmamıştır (çizelge 4.8).

Vakfikebir ekmeğinin kabuk ve iç kısmından alınan homojen örneklerde oluşan aroma maddelerini gösteren gaz kromatogramı şekil 4.6'da, oluşan bu aroma maddelerinin formülü, molekül ağırlığı, alıkonma süreleri ve % miktarları da çizelge 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Vakfıkebir ekmeğinin gaz kromatogramı

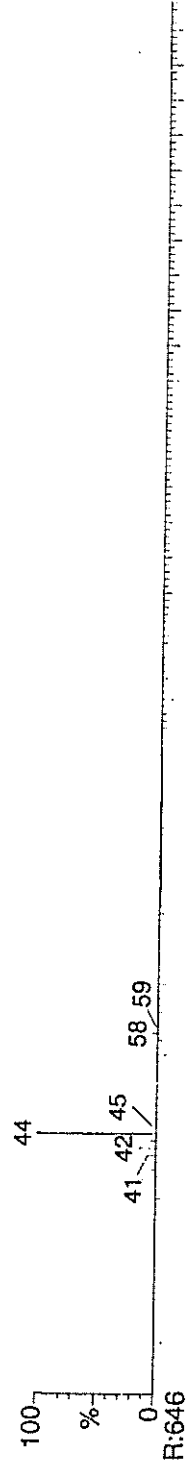
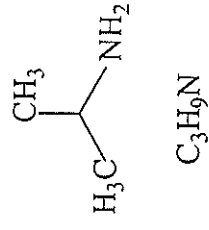
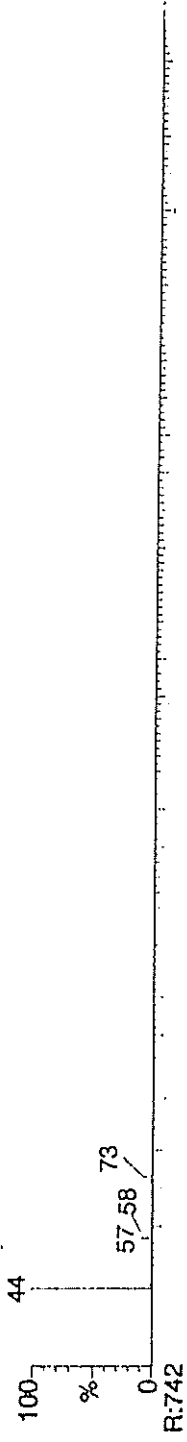
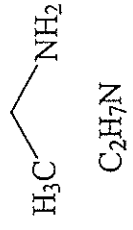
Çizelge 4.9. Vakfıkebir ekmeğinin aroma maddeleri

Pik No	Bileşik Adı	Formül No	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Alıkonulma Süresi (dakika)	Miktarı (%)
1	Etilamin	C ₂ H ₇ N	45	1.23	-
2	2-Propan amin	C ₃ H ₉ N	59	1.63	-
3	Etil asetat	C ₄ H ₈ O ₂	88	2.73	-
4	Asetaldehit	C ₂ H ₄ O	44	3.34	-
5	Teşhis edilemedi	-	-	4.77	Eser
6	Diasetil	C ₄ H ₆ O ₂	86	5.28	Eser
7	Etanol	C ₂ H ₆ O	46	5.76	98.57
8	2- veya 3- Metil butanal*	C ₅ H ₁₀ O	86	6.88	Eser
9	Propanol	C ₃ H ₁₀ O	62	7.63	Eser
10	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	8.22	Eser
11	İzobutil alkol	C ₄ H ₁₀ O	74	8.45	0.73
12	3-Metil-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	88	10.27	Eser
13	Heptenal*	C ₇ H ₁₄ O	114	10.62	Eser
14	<i>n</i> -Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	88	11.22	0.16
15	2- <i>n</i> - Pentilfuran	C ₉ H ₁₆ O	138	11.53	0.01
16	3-Hidroksi- 2-butanon	C ₄ H ₈ O	88	13.21	-
17	Octanal	C ₈ H ₁₆ O	128	14.51	0.01
18	<i>n</i> -Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	14.72	Eser
19	<i>n</i> -Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	15.08	Eser
20	Asetik asit	C ₂ H ₄ O ₂	60	17.49	0.50
21	2-Furan karboksialdehit	C ₅ H ₄ O ₂	96	18.14	0.03

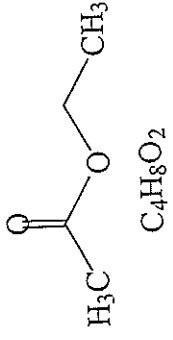
* Gerçek izomer teşhis edilemedi

Vakfikebir ekmeğinin kabuk ve iç kısmından alınan homojen örneklerde yapılan GC/MS analizinde de %98.57 oranında etanol ve %0.50 oranında da asetik asite rastlanmış diğer maddeler değişik oranlarda ve eser miktarlarda bulunmuştur. Alkoller genel olarak ekmekte yüksek miktarda tespit edilen bileşenlerdendir. İncelemelerde etanol en fazla bulunan alkol olup hemen hemen her tip hamurda bulunmaktadır (Seitz *et al.* 1998). Çalışmamız ile bu bulgu birbirini desteklemektedir. Lund *et al.* 1989, yaptıkları çalışmada homofermentatif kültürlerde etanolün ve diğer izoalkollerin yüksek seviyelerde bulunduklarını göstermişlerdir(çizelge 4.9).

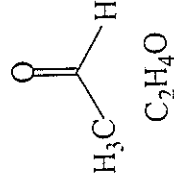
Vakfikebir ekmeğinin kabuk ve iç kısmından alınan homojen örneklerde yapılan GC/MS sonuçlarına göre bu ekmeğin oldukça fazla miktarda eser madde ihtiva ettiği gözlenmiştir. Ayrıca teşhis edilemeyen (RT: 4.77) bir maddeyede eser oranda rastlanmış, en yüksek bileşen %98.57 ile etanol olduğu tespit edilmiştir. Asetik asit'de diğer örneklerle oranla Vakfikebir ekmeğinde önemli bir yükselişte olduğu göze çarpmaktadır. Bu değer de, diğer tüm örneklerdeki en yüksek asetik asit oranıdır. Bileşenler arasında 4 madde (etilamin, izopropil amin, etil asetat, aset aldehit) teşhis sonucunda gözlemlenememiştir. Bu örnekte izobutil alkolün (%0.73) yüksekliği de dikkat çekicidir. İzoalkoller homofermentatif kültürler de yüksek seviyededirler (Lund *et al.* 1989) (çizelge 4.9).



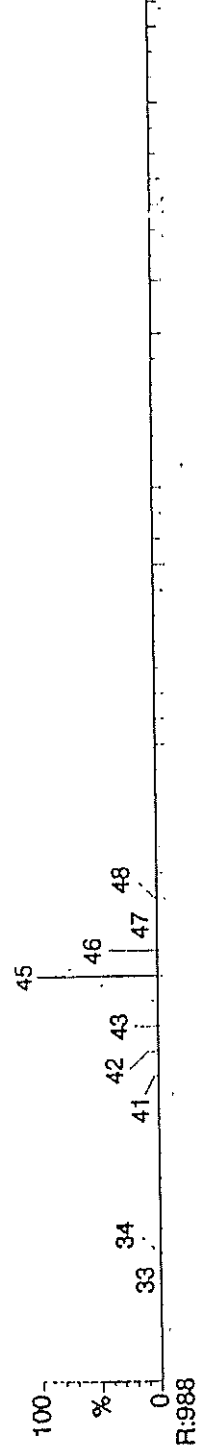
Şekil 4.7 a) Etilamin'in b) İzopropil amin'in kütle spektrumları ve kimyasal formülleri



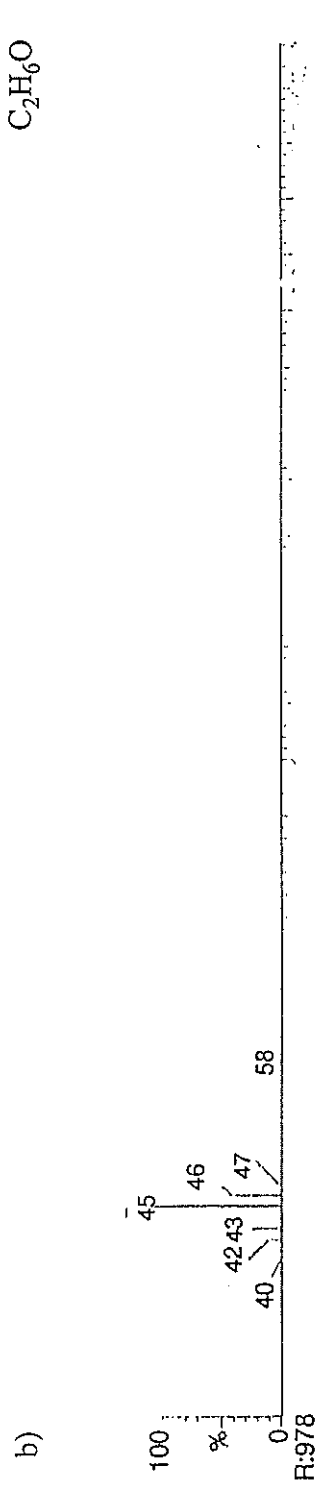
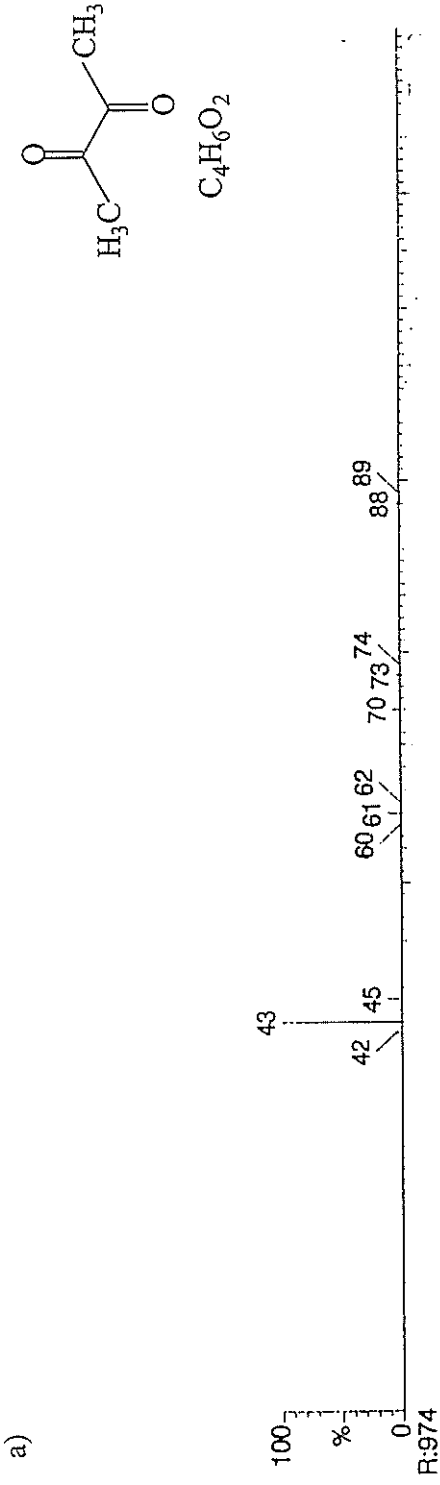
a)



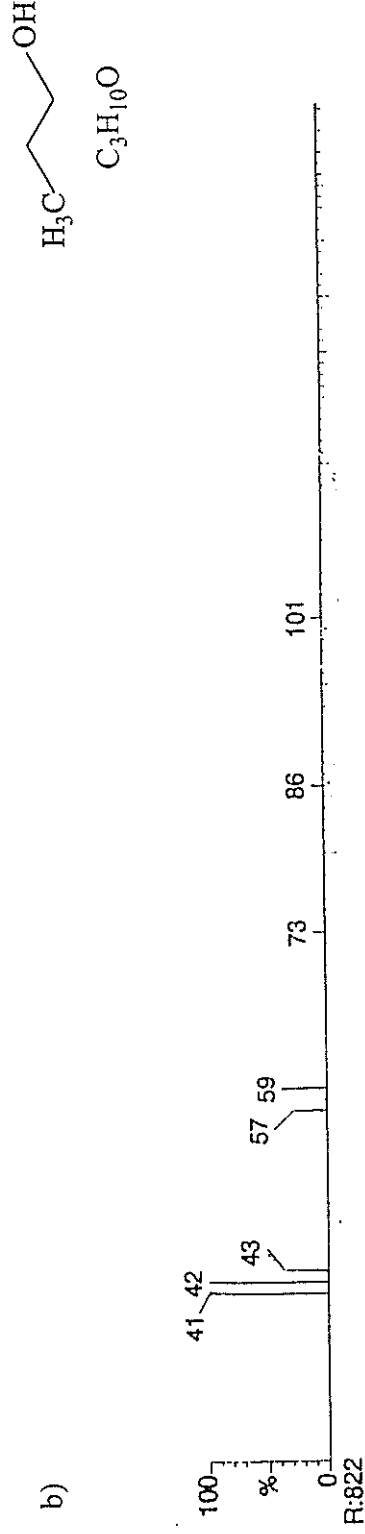
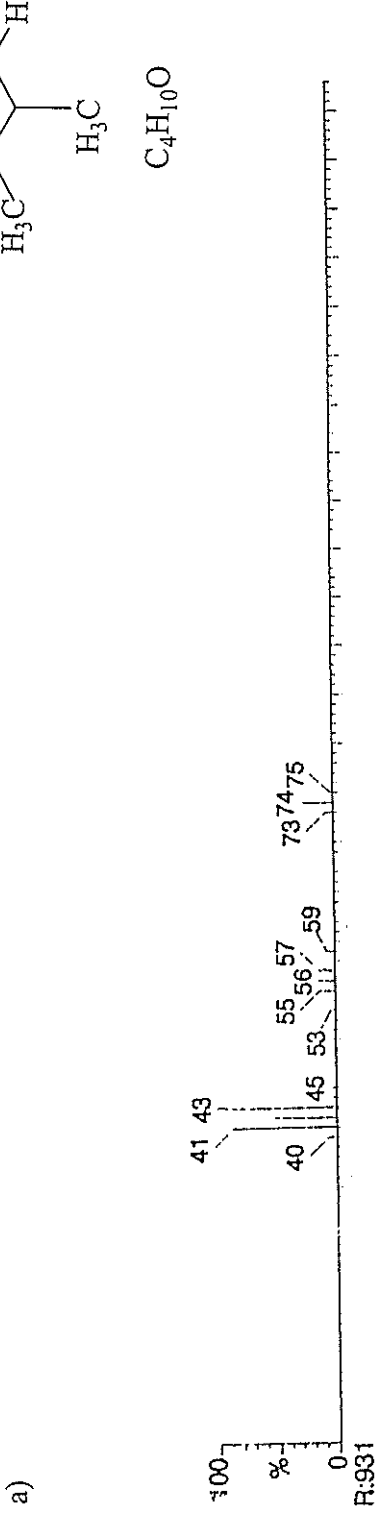
b)



Şekil 4.8 a) Etilasetat'ın b) Asetaldehit'in kütle spektrumları ve kimyasal formülleri

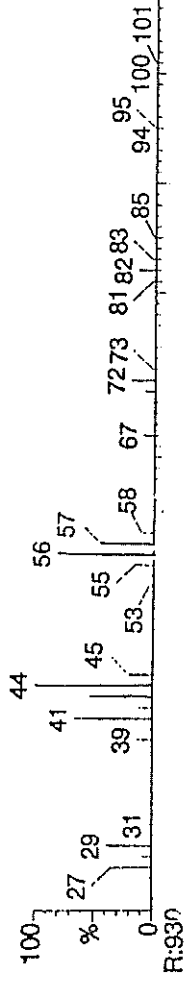
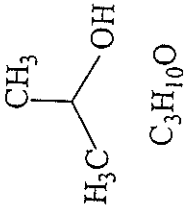


Şekil 4.9 a) Diasetil'in b) Etanol'un kütle spektrumları ve kimyasal formülleri

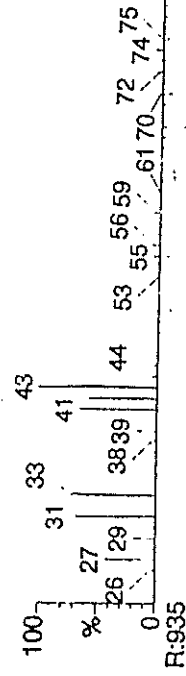
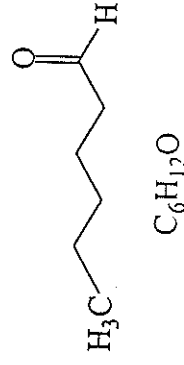


Şekil 4.10 a) (2,3)Metil butanal'ın b) Propanol'un kütle spektrumları ve kimyasal formülleri

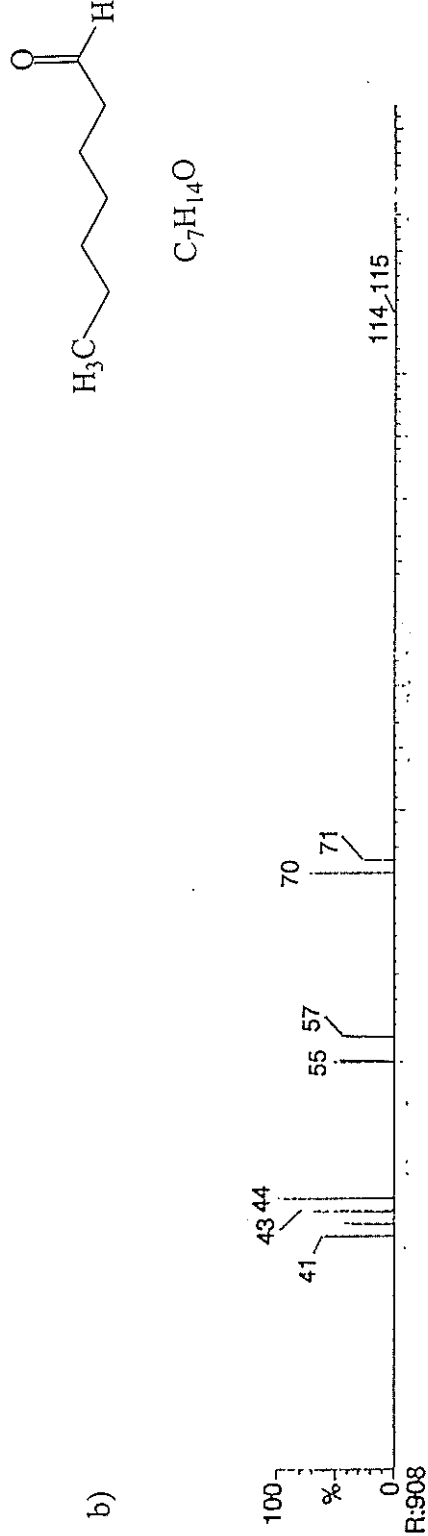
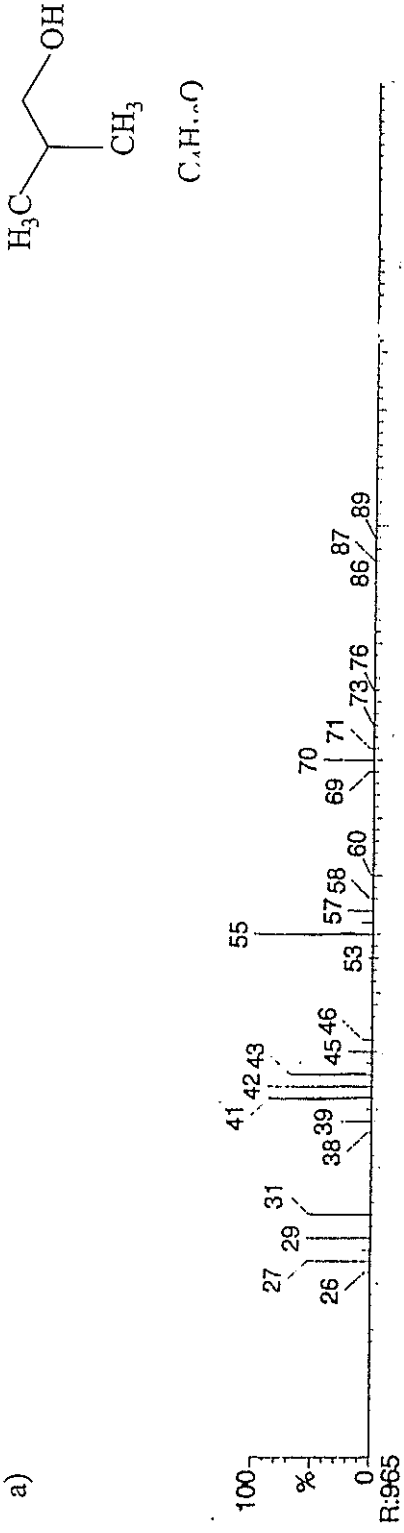
a)



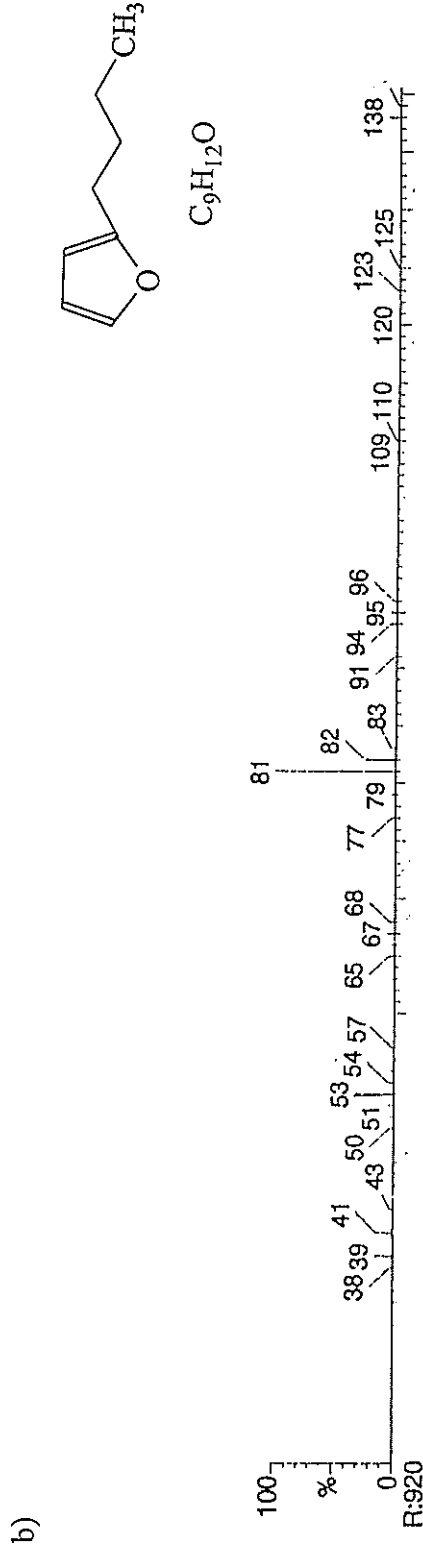
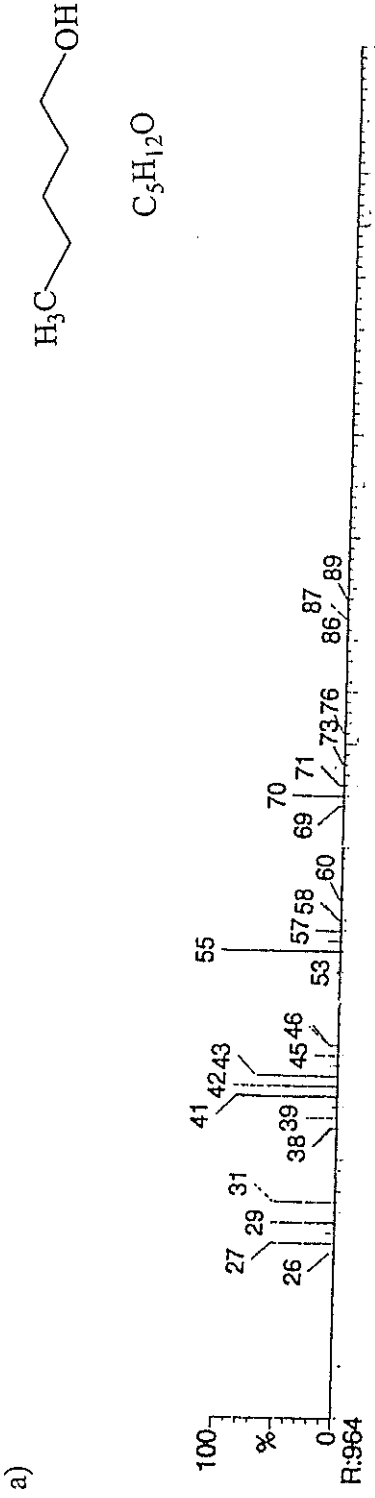
b)



Şekil 4.11 a) Hexanal'ın b) İzobutil alkol'un kütle spektrumları ve kimyasal formülleri

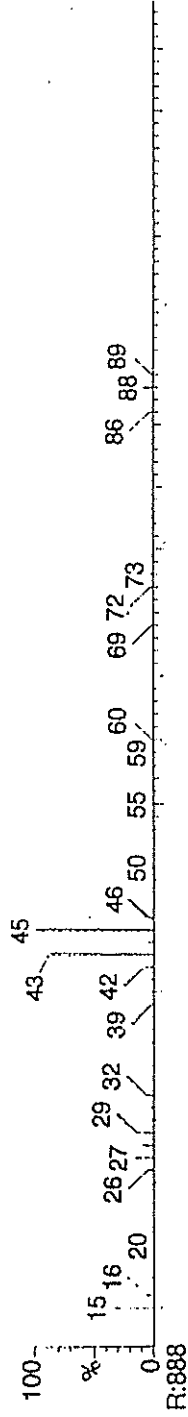
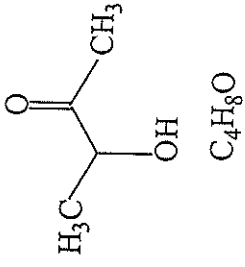


Şekil 4.12 a) 3-Metil-1-butanol'un b) Heptanal'in kütle spektrumları ve kimyasal formülleri

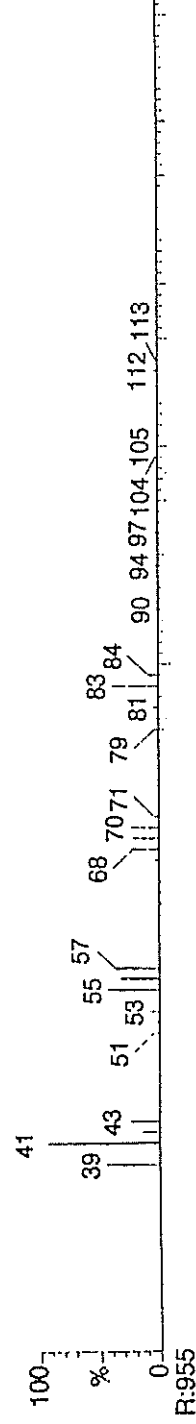
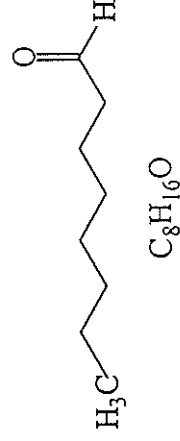


Şekil 4.13 a) n-pentanol'un b) 2-n-pentil-furan'ın kütle spektrumları ve kimyasal formülleri

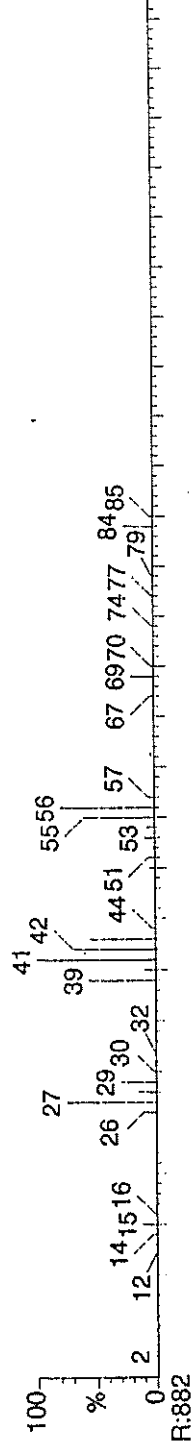
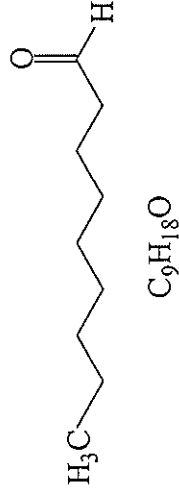
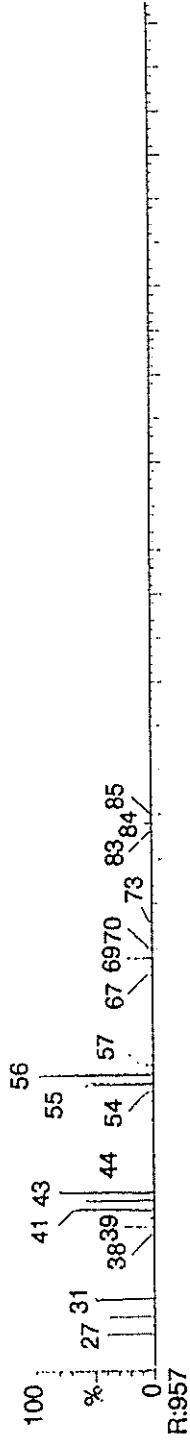
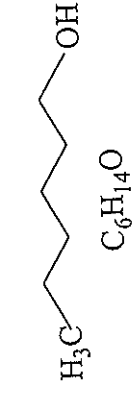
a)



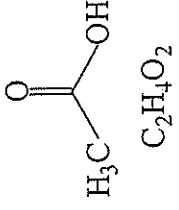
b)



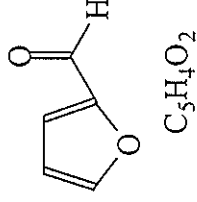
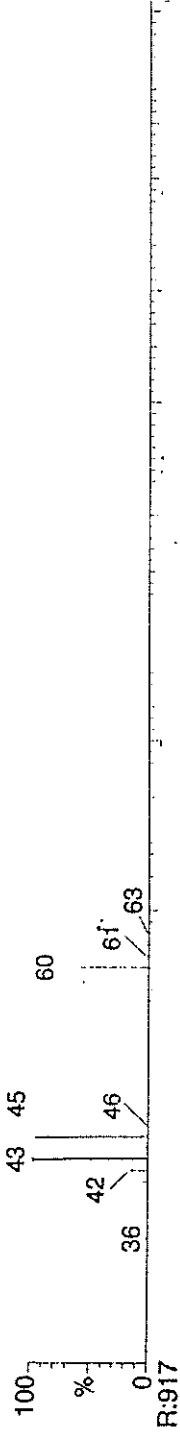
Şekil 4.14 a) 3-Hidroksi-2-butanon'un b) Octanal'in kütle spektrumları ve kimyasal formülleri



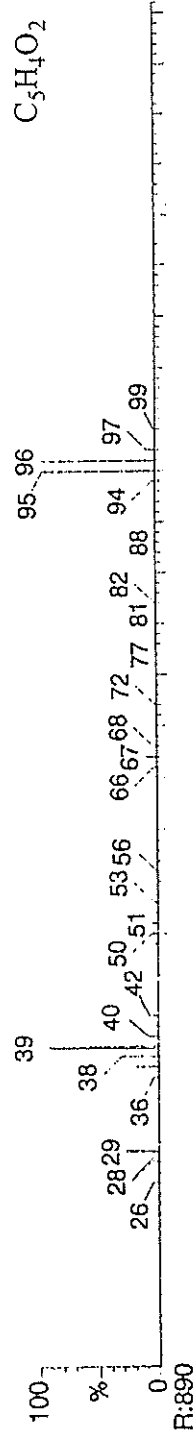
Şekil 4.15 a) n-Hexanol'un b) n-Nonanal'in kütle spektrumları ve kimyasal formülleri



a)



b)



Şekil 4.16 a) Asetik asit'in b) 2-furan karboksi aldehit'in kütle spektrumları ve kimyasal formülleri

Vakfıkebir ve Francala ekmeklerinin ve hamurlarının aroma bileşenleri GC/MS ile analiz edilmiş ve değişik bileşikler farklı oranlarda bulunmuştur. Bu bileşiklerin oranları çizelge 4.10'da verilmiştir. Yapılan analiz sonucunda Vakfıkebir ekmeğinde kullanılan ekşi hamurun bulduğumuz bileşenlerin hepsini değişik oranlarda ya da eser miktarlarda ihtiva ettiği görülmüştür. Son fermentasyona gelindiğinde bazı uçucuların oranlarında bir düşüşe rastlanmıştır. Uçucu bileşiklerin, fermentasyonun sonuna doğru azaldığı tespit edilmiş, pişen Vakfıkebir ekmeğinde de bu oranlarda bir değişme gözlenmiş ve bazı bileşikler fırına atıldıktan sonra bir kısım uçucuların kaybolduğu veya eser miktarlarda bulunduğu gözlenmiştir. Francala ekmek hamurlarının ilk fermentasyon çıkışı aroma bileşikleri ekşi hamurdan belli oranlarda az olduğu ya da bazı bileşiklerin hiç olmadığı, fırına atılmadan önceki hamurlarda bir çok bileşiğin kaybolduğu görülmüş fakat şaşırtıcı bir şekilde francala ekmeğinde oldukça fazla oranlarda uçucuların kaldığı gözlenmiştir.

Alınan örneklerdeki volatil maddeler Headspace yöntemiyle tespit edilmiş olup analiz için yazılım desteği kullanılmıştır. Bu program ile integrasyon sonuçları yüzdeleri ile birlikte 23 pik vermiştir. GS/MS sonuçları dikkate alınarak 18 tanesinin teşhisi yapılmıştır. Bileşenler incelendiğinde en yüksek değerin etanole ait olduğu görülmüştür Hansen *et al.* (1989), ekmekte volatil bileşenler üzerine yaptığı çalışmada buna uygun olarak en yüksek değerin etanole ait olduğunu bulmuştur. Francala ekmeğinin ilk fermentasyon çıkışlı hamur örneğinde yapılan GC/MS analizinde en yüksek bileşenin etilamin olduğu ve %52.32 ile en yüksek yüzdeli volatil madde olduğu belirlendi. Ayrıca bu örnekte asetaldehit (%33.52) ve etanol (%13.24) bulunmuş ve bu maddelerinde oldukça yüksek oranlarda bu üç volatil maddenin, francala ekmeğinin ilk fermentasyon çıkışlı hamurunun ana volatil maddeleri olduğunu göstermektedir. Damiani *et al.* (1996), yaptıkları çalışmada *S.cerevisiae* kullanılarak hazırlanan hamurlarda etanol üretimini çok yüksek oranda tespit etmiş olup bu sonuçlarda çalışmamızla uygunluk göstermektedir.

Çizelge 4.10. Vakfikebir ve francala ekmeklerinin ve hamurlarının aroma bileşenlerinin karşılaştırılması (%)

Pik No	Bileşik Adı	Molekül Ağırlığı	Francala			Vakfikebir		
			İlk Ferment. Sonrası	Son Ferment. Sonrası	Ekmek	1.Ekşi Hamur	Son Ferment. Sonrası	Ekmek
1	Etilamin	45	52.32	-	-	15.13	-	-
2	2 Propan amin	59	Eser	-	-	Eser	14.86	-
3	Etilasetat	88	-	-	-	0.38	Eser	Eser
4	Asetaldehit	44	33.52	-	-	24.64	4.29	-
5	Diasetil	86	Eser	0.20	Eser	0.91	0.14	Eser
6	Etanol	46	13.24	98.74	98.17	58.07	79.88	98.57
7	2- veya 3- Metil butanal*	72	0.59	-	-	Eser	Eser	Eser
8	Propanol*	62	0.03	-	-	-	-	Eser
9	Hexanal	100	Eser	0.16	1.01	0.15	Eser	Eser
10	İzobutil Alkol	75	0.14	0.44	Eser	0.20	0.52	0.73
11	3-metil-1-butanol	88	0.09	-	-	0.04	Eser	Eser
12	Heptenal	114	-	-	0.01	-	Eser	Eser
13	n-pentanol	88	0.03	0.24	0.14	0.18	0.21	0.16
14	2-n- pentilfuran	138	Eser	Eser	0.08	0.01	Eser	0.01
15	3-hidroksi- 2-butanon	88	0.01	-	-	-	-	0.01
16	Octanal	128	-	Eser	Eser	0.01	Eser	Eser
17	n-Hexanol	102	Eser	-	-	-	Eser	Eser
18	n-Nonanal	142	Eser	Eser	Eser	Eser	Eser	Eser
19	Asetik Asit	60	0.01	0.22	0.13	0.23	0.09	0.50
20	2-furan- Karboksialdehit	96	-	Eser	Eser	Eser	-	0.03

* Gerçek izomer teşhis edilemedi

Eser < %0.01

Yaptığımız çalışma, Vakfıkebir ekmeği yapımında kullanılan ekşi hamurun volatil maddeler açısından oldukça zengin olduğu, tespit ettiğimiz 21 aroma bileşeninden 4 eser miktardaki bileşen haricinde diğerlerini kayda değer oranda ihtiva ettiğini göstermiştir. Bunun aksine francala ekmeğinde GC/MS ile tespit ettiğimiz volatil bileşenlerin sadece 11 tanesini değişik oranlarda ve eser miktarlarda ihtiva ettiği geri kalanların ise belirlenemediği görülmüştür. Ekmekler pişirildikten sonra Vakfıkebir ekmeğinde ekşi hamurdaki volatil maddelerin tamamen kaybolmadığı eser miktarlarda da olsa pişen ekmekte hala mevcut olduğu yapılan incelememizde ortaya çıkarılmıştır. Vakfıkebir ekmeğinde GC/MS ile tespit ettiğimiz volatil maddelerin sahip olduğu kokuları (odor) AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) yöntemiyle daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiş olup, çizelge 4.11'de verilmiştir (Rylich and Groch 1996, Zchentbauer and Groch 1998).

Ekmeğe tat veren bileşiklerin saptanması amacıyla birçok çalışma yapılmış yaklaşık 300 çeşit volatil bileşik saptanmıştır. Bu araştırmaların çoğu ekmek kabuğu üzerinde yapılmıştır. Lezzet verici bileşenlerin ekmeğe ne gibi bir tat verdiği ve bunların kimyasal yapısı incelenmiştir. Ekmek kırıntısının lezzeti ile pozitif korrelasyon gösteren bileşikler; Asetaldehit, 2-metil propanal, 3-metil butanol, izopentanal, 2-nonanal, benzil etanol, 2 fenil etanol, dimetil sülfid, 2 furfural'dır. Tereyağı lezzeti veren bileşiklerden 2-3 butandion (diasetil) ve 3hidroksi-2 butanon (asetoin) bazı araştırmacılar tarafından ekmeğin tadı ile ilişkili bulunmuşken, bazıları ilgili olmadığını bildirmişlerdir (Rothe and Ruttloff 1983) .

Çizelge 4.11. Çalışmamızda tespit edilen kimyasal bileşiklerin koku karakteristikleri

Bileşik Adı	Koku Karakteristikleri
Etil asetat	Meyvemsi eritken (Solvent like fruity)
Diasetil	Tereyağımsı (Buttery)
3-metil-1 –butanol	Malt (Malty)
Heptanal	Bisküit gibi (Biscuit like)
<i>n</i> -Hexanol	Yeşil bitki (Green floral)
Asetaldehit	Ağır, yağlı, sabunsu (Heavy,fatty, soapy)
Etanol	Ekşimsi,keskin, eritken (Keen,solvent like)
2- veya 3- Metil butanal	Malt (Malty)
Propanol	Eritken (Solvent like)
Hexanal	Yeşil çim (Grass green)
İzobutil alkol	Ağır, keskin, yeşil (Heavy, keen, green)
<i>n</i> -pentanol	Eritken (Solvent like)
2- <i>n</i> -pentil furan	-
Nonanal	Yeşil, salatalık, sabunsu (Green, cucumber like soapy)
Asetik asit	Sirkemsi, keskin (Vinegar, keen)
2-furan karboksialdehit	-
Etil amin	-
Oktanal	-
3-Hidroksi-2-butanon	-
2-propan amin	-

Vakfıkebir ekmeğinde yaptığımız bu çalışmada diasetil'in eser miktarda olduğu, kullanılan ekşi hamur ve bundan yapılan hamurun son fermentasyon işlemi sırasında alınan örneklerde diasetil'in eser miktarda olduğu görülmüştür.

2-nonanal ekmek içinin aromasına katkıda bulunan en güçlü volatil bileşiklerden birisidir. Vakfıkebir ekmeğinde 2-nonanal'ın bir izomeri olan *n*-nonanal eser

miktarlarda tespit edilmiştir. Ekmeğin ilk fermentasyon, son fermentasyon ve pişirilme safhalarının tümünde bu bulgumuz değişmemiştir. Francala ekmeğinde yaptığımız analizlerde de tüm aşamalarda aynı bulgu elde edilmiştir. Buna göre ekmek içine tat veren ana volatil maddelerden birisi olan nonanal Vakfikebir ekmeğinin lezzetini az da olsa etkilemiş olabilir.

Literatürde ekmek aroma maddeleri arasında sıklıkla gözlemlenmeyen etilamin, Vakfikebir ekşi hamuru ve francala ilk fermentasyon çıkışlı hamur örneklerinde oldukça yüksek oranda (sırasıyla %15.13, %52.32) tespit edilmiştir. Ancak son fermentasyon aşamalarında ve pişirme sonrası ekmeklerde bulunamamıştır.

Laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan laktik asit ve asetik asit, ekmek yapımındaki teknolojik prosesler için çok önemlidir. Bu asitler amilolitik enzimler için optimum pH sağlar. Bunlar aynı zamanda partiküllerin şişmesini, özelliklede proteinlerin şişmesini sağlarlar ki, bu da ekmeğin reolojik özelliklerini oluşturur. Bu asitler hamurdaki istenmeyen mikrofloranın gelişmesini de bloke ederler. Ayrıca laktik ve asetik asit, ekmeğin aroma ve lezzetinin oluşmasında da çok önemli rol oynarlar (Kratochvil and Holas 1980).

Vakfikebir ekmeğinde yaptığımız aromatik volatillerin incelenmesi sonucunda; asetik asit miktarı ekmeğin ekşi hamurunda oldukça yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Francala ekmeğinde ise ilk fermentasyon çıkışında az miktarda asetik asit'e rastlanmıştır. Pişirilme sonrası asetik asit Vakfikebir ekmeğinde francalaya göre daha yüksek miktarlarda çıkmıştır. Asetik asit'in ekşimsi ve sirkemsi koku verici özelliği Vakfikebir ekmeğinin francalaya göre neden daha fazla ekşimsi tatda olduğunu açıklamada katkıda bulunmuştur.

İzoalkoller (2-metil-1-propanol ve 2,3 metil-1-butanol) ve bunların kendisine ait aldehytleri ve etil asetat; fermentatif mayalar (*Saccharomyces* ve *Hansenula genus*) ile fermentasyonu başlatılan ekşi hamurların karakteristik volatil bileşenleri olarak

bildirilmiştir etanol üretiminin, *S. cerevisiae* varlığında en yüksek seviyede olduğu rapor edilmiştir (Damiani 1996). Çavdar ekmeğinin homofermentatif kültürler ile fermentasyonunda izoalkollerin yüksek olduğu bildirilmiştir (Hansen *et al.* 1989).

3 metil 1-butanol'e Vakfikebir ekmeğinin her üç aşamasında da rastlanılmış pişme sonrası ekmeklerde eser miktarda bulunmuştur. Buna karşın francala ekmeğinde tespit edilememiştir. 3metil 1-butanol'ün malt tadındaki (malty) lezzet verici özelliğinin Vakfikebir ekmeğinin aromasına katkısı olduğunu düşünüyoruz. Yine izoalkollerden İzobutil alkol'ün Vakfikebir ekmeğinde francala ekmeğine oranla oldukça yüksek miktarda olduğu bulunmuştur.

Ester'lerden, etil asetat Vakfikebir ekmeği ekşi hamurunda belirgin oranda tespit edilmiş, son fermentasyon ve pişme sonrası ekmekte eser miktarda rastlanmıştır. Francala ekmeğinde ise hiçbir aşamada etil asetat tespit edilememiştir. Etil asetat meyvemsi (solvent-like, fruity) aromaya sahip bir bileşik olup Vakfikebir ekmeğinin lezzetine bu özelliği ile katkıda bulunmuş olabilir.

Etanol, hamurlardaki şekerin *S. cerevisiae* ile fermentasyonu sonucu, hidrolize uğramasıyla ortaya çıkan bir alkoldür. Hemen tüm ekmek çeşitlerinde yapılan çalışmalarda etanol en fazla tespit edilen madde olup (Seitz *et al.* 1998) Vakfikebir ekmeğinde de bu bulgu diğer geleneksel ekşi maya hamuru ile yapılan ekmeklere benzerdir.

Ekmekte total aroma maddelerinin miktarı 6-10ppm arasında değişmektedir. Aroma maddelerinin çoğu uçucudur, molekül ağırlıkları 50-250 arasında değişir (Emberger 1985). Ekmek aroması pek çoğu koku karakterinde olan bir çok bileşenin karışımından oluşmaktadır. Diğer gıdalarda olduğu gibi bu bileşiklerin hiç birisi tek başına ekmek aromasının anahtar bileşeni olarak düşünülemez (Schieberle and Grosch 1987, Schieberle and Grosch 1991).

Ekşi hamur mikroflorasının belirlenmesi ile fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmaları ürettikleri aroma bileşenlerinin karakterizasyonu sonucunda bu tip ürünlerin üretimini standardize edecek starter kültürlerinin geliştirilmesi mümkündür. Çalışmamızın amaçlarından biriside Vakfikebir ekmeğinin starter kültürlerinin geliştirilmesine ışık tutmaktır. Böylece bu ekmeğin her yerde aynı lezzet ve kalitede üretilmesi mümkün olabilecektir.

Ekşi hamurlardan identifiye edilen laktik asit bakterileri, gıdalarda bulunan laktik asit bakterilerinden *Cornobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* cinsine ait türler içermektedir (Stiles and Holzapfel 1997).

Corsetti *et al.* (2001), İtalya'nın Apulia bölgesinde yaptıkları çalışmada ekşi hamurlardan izole ettikleri *Lactobacillus*'lar, *Leuconostoc*'lar, *Lactococcus*'lar, *Weisella*'lar arasından en fazla miktarda *Lactobacillus*'lara rastlamışlardır. Mayalar ile yaptıkları aynı çalışmada laktik asit bakterileriyle en iyi etkileşimi veren *S. cerevisiae* olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda (Tip1) ekşi hamur ile üretilen Vakfikebir ekmeğinin MIS analiz sonucunda *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus bifementas* predominant suşlar olarak bulunmuştur. Geleneksel ekşi hamurla üretilen ekmeklerde görülen *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* Trabzon yöresine ait hamurdan da izole edilmiştir. Sudan'da üretilen geleneksel Kisra ekmeğinde *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus amylovorus* dominant organizmalar olarak bildirilmiştir (Hamad *et al.* 1992). Ayrıca geleneksel Portekiz ekşi hamurunda ise *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactococcus lactis spp lactis* dominant türler olarak bildirilmiştir (Rocha ve Malcata 1999). Yine bizim çalışmamızda ekşi hamur örneklerinden izole edilen 158 suştan laktik asit bakterilerinden olan *Streptococcus sangius* toplamda %17.72 ve *Enterecoccus faecalis* %17.72 ile en yüksek oranlarda tespit edilen bakteriler olmuştur. Geleneksel Portekiz ekşi hamurunda *E. caseliflavus*, *E.durans* ve *E.faecium*'un baskın Entrokoklar olduğu

Lactococcus constellatus ve *Lactobacillus equinus* ise Laktokoklara ait dominant suşlar olduğu bildirilmiştir (Rocha and Malcata 1999).

Zorunlu homofermentatif ve fakültatif veya zorunlu heterofermentatif laktobasiller ekşi hamurdaki tipik laktik asit bakterileridir. *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* en sık izole edilen laktik asit bakterileridir. *Leuconostoc spp* ve *Enterococcus spp* ise ekşi hamur proseslerinde ise ara sıra bulunur ve kullanılır (Gobbetti 1998). Çalışmamızda *Lactobacillus* %46.74 ile en yüksek oranda bulunan bakteri grubu olarak kaydedilmiştir.

Trabzon Vakfikebir Ekmeğinin mikrobiyolojik analizi, içerisindeki laktik asit bakterilerinin dünyanın değişik bölgelerinde ekşi hamurdan üretilen geleneksel ekmeklerdeki laktik asit bakteriler ile önemli ölçüde farklılıklar gösterdiğine işaret etmektedir. Tespit ettiğimiz bazı laktik asit bakteri suşları diğer ülkelerdeki geleneksel ekmeklerde de tespit edilmiştir. Örneğin *Pediococcus* türünden bir suş İşveç'in tipik çavdar ekşi hamurunda, *Leuconostoc mesenteroides* Benin'in geleneksel mısır hamurunda, *Enterococcus* türlerinden bazıları geleneksel Portekiz ekşi hamurundan izole edilmiştir (Rocha and Malcata 1999). Buna karşın Trabzon Vakfikebir ekmeğinde yüksek oranda bulduğumuz *E. faecalis*, *Streptococcus sangius* suşları diğer geleneksel hamurlarda da pek göze çarpmamaktadır.

Vakfikebir ekmeğinde yaptığımız mikrobiyolojik analizler sonucunda oldukça yüksek oranda laktik asit bakterileri izole ettik. Francala ekmeğindeki mayalar laktik asit bakterilerinin gelişimini bloke ettiğinden pH'sı Vakfikebir ekmeğine göre daha yüksektir. Laktik asit bakterileri yüksek oranda bulunduğu Vakfikebir ekmeğinin pH'sı depolama süresi arttıkça daha da düşmektedir (Kotancılar vd. 1998).

5. SONUÇLAR

1. Laktik asit bakterileri ekşi hamur mikroflorasının oldukça önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Araştırmada ekşi hamur örnekleri izolasyona hazırlanmış, uygun dilüsyonlardan MRS agar ve M17 agar besiyerine ekim yapılmış, daha sonra izolasyon gerçekleştirilmiştir. Toplam 8 (Trabzon'dan) fırından alınan örneklerin herbirinden oniki adet olmak üzere laktik asit bakteriler olduğu tahmin edilen 192 koloni izole edilmiştir. Elde edilen izolatlara gram boyama, katalaz testi, mikroskopik görünüm ve oksidaz testleri uygulanmış ve bu sonuçlara göre laktik asit bakterileri olarak belirlenen 158 laktik asit bakteri izolatu MIS ile identifikasyon için hazırlanmıştır.
2. İzolatlardan, Vakfikebir ekmeğinin mikroflorası, ağırlıklı olarak *Lactobacillus* (%46.74), daha sonra sırasıyla *Enterococcus* (%19.61), *Streptococcus* (%17.72) olduğu görülmüştür.
3. *Lactococcus* (%6.95), *Pediococcus* (%5.05), *Leuconostoc* (%1.26) ile mikrofloranın diğer suşlarını oluşturmaktadır.
4. MIS sisteminin uygulanması sonucunda 158 laktik asit bakteri izolatından *Lactobacillus* cinsine ait türler *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (%5.69) 9 adet, *Lactobacillus fermentum* (%5.69) 9 adet, *Lactobacillus bif fermentans* (%5.06) 8 adet, *Lactobacillus vaccinatorius* (%3.79) 6 adet, *Lactobacillus parabuchneri* (%3.16) 5 adet, *Lactobacillus paracasei subsp. tolerans* (%3.16) 5 adet, *Lactobacillus cellobiosus* (%3.16) 5 adet, *Lactobacillus malefermentans* (%2.53) 4 adet, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (%2.53) 4 adet, *Lactobacillus sanfrancisco* (%1.89) 3 adet, *Lactobacillus buchneri* (%1.89) 3 adet, *Lactobacillus helveticus* (%1.26) 2 adet, *Lactobacillus curvatus* (%1.26) 2 adet, *Lactobacillus alimentarius* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus brevis* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus oris* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus sakei* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus coryniformis*

subsp. coryniformis (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus suebicus* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus coryniformis subsp. torquens* (%0.63) 1 adet, *Lactobacillus farciminis* (%0.63) 1 adet türleri bulunmuştur.

5. Ekşi hamur örneklerinde izole edilen 158 suştan *Streptococcus* cinsine ait türler ise, *Streptococcus sangius* (%17.72) 28 adet, *Pediococcus* türlerinin dağılımı; *P. damnosus* (%3.79) 6 adet, *P. acidilactici* (%0.63) 1 adet, *P. halophilus* (*Tetragenococcus halophila*) (%0.63) 1 adet, *Entrococcus* türlerine ait dağılım; *E. faecalis* (%17.72) 28 adet, *E. faecium* (%1.26) 2 adet, *E. hirae* (%0.63) 1 adet, *Lactococcus* türlerine ait dağılım; *Lactococcus lactis subsp. lactis* (%3.16) 5 adet, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (%3.79) 6 adet, *Leuconostoc* türlerine ait dağılım; *Leuconostoc pseudomesenteroides* (%0.63) 1 adet, *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* (%0.63) 1 adet, *Weissella* türlerine ait dağılım; *Weissella candneri* (%0.63) 1 adet, *Weissella confusa* (%0.63) 1 adet, ayrıca *Oenococcus oeni* (%0.63) 1 adet ve *Cellulomonas turbata* (%0.63) 1 adet olarak çizelge 4.2’de tanımlanmıştır.
6. Francala ekmeğinin ilk fermentasyon çıkışlı hamur örneklerinde yapılan GC/MS sonuçlarına göre 4 madde hariç (2-furan karboksi aldehit, octanal, heptanal, etil asetat) bütün bileşenlere rastlanmıştır. En yüksek oranda (%52.32) etilamin, (%33.52) asetaldehit, (%13.24) ile etanol olduğu gözlenmiş, ayrıca örnek içerisinde 6 eser maddeye (2-propanamin, diasetil, hexanal, 2-*n*-pentilfuran, *n*-hexanol, *n*-nonanal) rastlanmıştır .
7. Francala ekmeğinin fırına atılmadan önceki son fermentasyon sonrası hamur örneklerinde yapılan GC/MS sonuçlarına göre en yüksek bileşenin (%98.74) ile etanol olduğu bulunmuştur. Bileşenler arasında 10 maddeye (etilamin, izopropilamin, etil asetat, asetaldehit, 3-metil-2-butanol, heptanal, 3-hidroksi 2-butanon, hexanol) rastlanmamış, örnekte üç bileşenin de (octanal, *n*-Nonanal, 2-furan-karboksialdehit) eser miktarda olduğu görülmüştür.

8. Francala ekmeklerinin kabuk ve iç kısmından alınan homojen ekmek örneklerinde en yüksek oranda (%98.17) ile etanol'e rastlandığı, aynı örnekte 9 volatil maddeye (Etilamin, izopropil amin, etil asetat, diasetil, metil butanol, propanol, 3-hidroksi-2-butanon, hexanol)'e rastlanamamıştır. Ayrıca 5 maddeye (diasetil, izobutil alkol, octanal, *n*-nonanal, 2-furan karboksialdehit) eser miktarlarda rastlanmıştır.
9. Vakfıkebir ekmeğinin yapımında kullanılan 1. ekşi hamur örneklerinde yapılan GC/MS analizi sonucunda bulunan volatillerden *n*-propanol, heptanol, 3-hidroksi-2-butanon haricinde tüm bileşenlere rastlanmıştır. En yüksek bileşenin (%58.07) ile etanol, (%24.64) ile asetaldehit, (%15.13) ile etilamin olduğu, en düşük oranda da 2-*n* pentil furan ve octanal'a rastlanmıştır. Eser miktarlarda 5 bileşiğin (2-propanamin, 2,3-metil butanal, *n*-hexanol, *n*-nonanal, 2-furan-karboksialdehit) olduğu tespit edilmiştir.
10. Vakfıkebir ekmeğin yapımında kullanılan son fermentasyona ait hamur örneklerinde yapılan GC/MS analiz sonucunda teşhis edilemeyen (RT: 2.6) bir bileşiğe rastlanmıştır. En yüksek bileşenin etanol (%79.88), izopropil amin (%14.86), asetaldehit (%4.29) olduğu bulunmuştur. Örnekte en düşük oranda bileşiğin asetik asit olduğu gözlenmiş, 7 eser bileşene (2,3 metil butanal, hexanal, heptenal, 2-*n*-pentilfuran, octanal, *n*-nonanal) ve 7 bileşen ise (etil amin, propanol, 3-hidroksi-2-butanon, 2-furan karboksialdehit) rastlanmamıştır .
11. Vakfıkebir ekmeğinin kabuk ve iç kısmından alınan homojen örneklerde yapılan GC/MS sonuçlarına göre bu ekmeğin oldukça fazla miktarda eser madde ihtiva ettiği gözlenmiştir. Ayrıca teşhis edilemeyen (RT: 4.77) bir maddeyede eser oranda rastlanmış, en yüksek bileşen %98.57 ile etanol olduğu tespit edilmiştir. Asetik asit'de diğer örneklere oranla Vakfıkebir ekmeğinde önemli bir yükselişte olduğu gözlenmiştir. Bu değer de, diğer tüm örneklerdeki en yüksek asetik asit oranıdır. Bileşenler arasında 4 madde (etilamin, izopropil amin, etil asetat, aset aldehit) teşhis sonucunda gözlemlenememiştir.

12. Yapılan analiz sonucunda Vakfikebir ekmeğinde kullanılan ekşi hamurun bulduğumuz bileşenlerin hepsini değişik oranlarda ya da eser miktarlarda ihtiva ettiği görülmüştür. Son fermentasyona gelindiğinde bazı uçucuların oranlarında bir düşüşe rastlanmıştır. Uçucu bileşiklerin, fermentasyonun sonuna doğru azaldığı tespit edilmiş, pişen Vakfikebir ekmeğinde de bu oranlarda bir değişme gözlenmiş ve bazı bileşikler fırına atıldıktan sonra bir kısım uçucuların kaybolduğu veya eser miktarlarda bulunduğu gözlenmiştir. Francala ekmek hamurlarının ilk fermentasyon çıkışı aroma bileşikleri ekşi hamurdan belli oranlarda az olduğu yada bazı bileşiklerin hiç olmadığı gözlenmiş, fırına atılmadan önceki hamurlarda bir çok bileşiğin kaybolduğu görülmüş, fakat şaşırtıcı bir şekilde francala ekmeğinde oldukça fazla oranlarda uçucuların kaldığı gözlenmiştir.
13. Alınan örneklerdeki volatil maddeler Headspace yöntemiyle tespit edilmiş olup analiz için yazılım desteği kullanılmıştır. Bu program ile integrasyon sonuçları yüzdeleri ile birlikte 23 pik vermiştir. GS/MS sonuçları dikkate alınarak 20 tanesinin teşhisi yapılmıştır. Bileşenler incelendiğinde en yüksek değerin etanole ait olduğu görülmüştür. Ekmekte volatil bileşenler üzerine yaptığımız çalışmada buna uygun olarak en yüksek değerin etanole ait olduğu bulunmuştur.
14. Francala ekmeğinin ilk fermentasyon çıkışlı hamur örneğinde yapılan GC/MS analizinde en yüksek bileşenin etilamin olduğu ve %52.32 ile en yüksek yüzdeli volatil madde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu örnekte asetaldehit (%33.52) ve etanol (%13.24) bulunmuştur.
15. Vakfikebir ekmeği yapımında kullanılan ekşi hamurun volatil maddeler açısından oldukça zengin olduğu, tespit ettiğimiz 20 aroma bileşeninden 4 eser miktardaki bileşen haricinde diğerlerini kayda değer oranda ihtiva ettiğini göstermiştir. Bunun aksine francala ekmeğinde GC/MS ile tespit ettiğimiz volatil bileşenlerin sadece 11 tanesini değişik oranlarda ve eser miktarlarda ihtiva ettiği, geri kalanların ise belirlenemediği görülmüştür. Ekmekler pişirildikten sonra Vakfikebir ekmeğinde ekşi hamurdaki volatil maddelerin tamamen kaybolmadığı eser miktarlarda da olsa pişen ekmekte hala mevcut olduğu yapılan incelememizde ortaya çıkarılmıştır.

16. Vakfikebir ekmeğinde yaptığımız bu çalışmada diasetil'in eser miktarda olduğu, kullanılan ekşi hamur ve bundan yapılan hamurun son fermentasyon işlemi sırasında alınan örneklerde diasetil'in eser miktarda olduğu görülmüştür.
17. 2-nonanal ekmek içinin aromasına katkıda bulunan en güçlü volatil bileşiklerden birisidir. Vakfikebir ekmeğinde 2-nonanal'ın bir izomeri olan *n*-nonanal eser miktarlarda tespit edilmiştir. Ekmeğin ilk fermentasyon, son fermentasyon ve pişirilme safhalarının tümünde bu bulgumuz değişmemiştir. Francala ekmeğinde yaptığımız analizlerde de tüm aşamalarda aynı bulgu elde edilmiştir.
18. Literatürde ekmek aroma maddeleri arasında sıklıkla gözlemlenmeyen Etilamin, Vakfikebir ekşi hamuru ve francala ilk fermentasyon çıkışlı hamur örneklerinde oldukça yüksek oranda (sırasıyla %15.13, %52.32) tespit edilmiştir. Ancak son fermentasyon aşamalarında ve pişirme sonrası ekmeklerde bulunamamıştır.
19. Vakfikebir ekmeğinde yaptığımız aromatik volatillerin incelenmesi sonucunda; asetik asit miktarı ekmeğin ekşi hamurunda oldukça yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Francala ekmeğinde ise ilk fermentasyon çıkışında az miktarda asetik asit'e rastlanmıştır. Pişirilme sonrası asetik asit Vakfikebir ekmeğinde francalaya göre daha yüksek miktarlarda çıkmıştır. Asetik asit'in ekşimsi ve sirkemsi koku verici özelliği Vakfikebir ekmeğinin francalaya göre neden daha fazla ekşimsi tatda olduğunu açıklamada katkıda bulunmuştur.
20. 3 metil-1-butanol'e Vakfikebir ekmeğinin her üç aşamasında da rastlanılmış pişme sonrası ekmeklerde eser miktarda bulunmuştur. Buna karşın francala ekmeğinde tespit edilememiştir. Yine izoalkollerden İzobutil alkol Vakfikebir ekmeğinde francala ekmeğine oranla oldukça yüksek miktarda olduğu bulunmuştur.
21. Ester'lerden, etil asetat Vakfikebir ekmeği ekşi hamurunda belirgin oranda tespit edilmiş, son fermentasyon ve pişme sonrası ekmekte eser miktarda rastlanmıştır. Francala ekmeğinde ise hiçbir aşamada etil asetat tespit edilememiştir.

22. Trabzon Vakfıkebir Ekmeğinin mikrobiyolojik analizi, içerisindeki laktik asit bakterilerinin dünyanın değişik bölgelerinde ekşi hamurdan üretilen geleneksel ekmeklerdeki laktik asit bakteriler ile önemli ölçüde farklılıklar bulunduğunu göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

- Anonymous 1982. Production year book Vol:36, Food and Agricultural Organization, Roma, 1982.
- Anonymous 1997. Buğday Unu Değerlendirme Notu, Orta Anadolu İhracatçı Birlikleri, Ankara.
- Anonymous 1998. Yedinci 5 yıllık kalkınma planı (1996-2000), 1998 yılı programı destek çalışmaları, ekonomik ve sosyal sektörlerde gelişmeler. DİE Yıllığı, Ankara.
- Anonymous 1999. Mıdı Manual Newark, DE, 19713, USA.
- Aykut, M. ve Baysal A., 1978. Ekmeklerdeki demirin insanlarda kullanılması ve bunu etkileyen bazı etmenler. Beslenme ve Diyet Dergisi, 7, Sayı:1 40-48.
- Bailey, L.P. and Von Holy A., 1993. Bacillus spore contamination associated with conversial bread manufacture. Food Microbiol., 10, 287-294.
- Barber, S., Torrer M.J., Martinez-Anaya M.A. and Barber C.B., 1989. Microflora of the sourdough of wheat flour bread IX. Biochemical characteristics and baking performance of wheat dough elaborated with mixtures of pure microorganism, Lebens. Unters. Forsch 189, 6-11.
- Baumgart, J., Firnhaber J. und Spcher G., 1993. Microbiologische Untersuchung von Lebensmitteln, Behr's Verlag, Hamburg, Germany.
- Beek, S. and Priest G., F., 2002. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a Polyphasic study. Applied and environmental Microbiology, 68 (1), 297-305.
- Bilgehan, H., 1996. Klinik mikrobiolojik tanı. Barış Yayınları. Şafak Matbaacılık. İzmir, 680.
- Boraam, F., Faïd M. and Larpent J. P., 1993. Lactic acid bacteria and yeast associated with traditional Moroccan sourdough bread fermentation. Sciences des Aliments, 13 (3), 501-509.
- Brown, B.J. and Leff L.G., 1996. Comparison of fatty acid methyl ester analysis with the use of API 20E and NFT strips for identification of a quatic bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 62, 2183-2185.
- Brummer, J. M. and Lorenz K. 1991, European developments in wheat sourdough.

- Cereal Foods World, 36 (3), 310-313.
- Chang, C. and Chambers E., 1992. Flavor characterization of bread made from hard red winter wheat and hard white winter wheat. Cereal Chem., 69 (5), 556-559.
- Collar, L., Mascaros A. F., Prieto J. A. and Barber C. B., 1991. Changes in free amino acids durin fermentation of wheat dough started with pure culture of lactic acid bacteria. Cereal Chem., 68 (1), 66-71.
- Collins, C. H. and Layne P. M. 1984. Microbiological method. Buterworth and Co (Publishers) Ltd., London, 450.
- Corsetti, A., Gobbetti M., Balestrieri F., Paoletti F., Russi L. and Rossi J., 1998. Sourdough Lactic Acid Bacteria effects on bread firmness and staling. Journal of Food Science, 63, 347-351.
- Corsetti, A, Gobbetti M, Demarco B., Balestrieri F., Paoletti F., Russi L. and Rossi J., 2000. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. J. Agric. Food Chem. 48, 3044-3051.
- Corsetti, A., Lawmicocco P., Morea M., Baruzzi F., Tosti N. and Gobbetti M., 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic asid bacteria and yeast from wheat (species triticum durum and triticum aestivum) sourdoughs of southern Italy. International Journal of Food Microbiology, 64, 95-104.
- Çon, A. H., 1995. Sucuktan bakteriosin benzeri antimikrobial metabolit üreten laktik Asit izolasyonu ve identifikasyonu ve gıda zararlısı ve-veya gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı antagonistik aktivite araştırması (Doktora Tezi). Atatürk Üni. Fen Bilimleri Ens. Erzurum.
- Daeschel, M.A., McKenny M.C., McDonald L.C., 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C11. Food Microbiol., 7, 91-99.
- Damiani, P., Gobbetti M., Cossignani L., Corsetti A., Simonetti M.S. and Rossi J., 1996. The sourdough microflora characterization hetero and homofermentative lactic acid bacteria, yeast and their interactions on the basis of the volatile compounds produced. Lebensm. Wiss. und Technol., 29, 63-70.
- Dubois, D., 1984. What is fermentation? it is essential to bread quality. Baker's Digest, 10, 11-14.
- Elgün, A. ve Ertugay Z., 1999 Tahıl İşleme Teknolojisi, Atatürk Üniversitesi Zir. Fak. Yayınları No:297 (üçüncü baskı), Erzurum, 376.

- Emberger, R., 1985. An analitical approach to flovar research. *Cereal Foods World*, 30(10), 691-694
- Ennahar, S., Aoude-Werner D., Sorokine O., Van Dorsselaer A., Bringel F., Hubert J.C., Hasselman C., 1996. Production of Pediocin AcH by *Lactobacillus Plantarum* WHE 92, isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4381-4387.
- Ercan, R. ve Bildik E., 1993. Ekmegin bayatlaması ve etki yapan faktörler. *Un Mamülleri Dünyası*, 2(1), 10-14.
- Ertugay, Z., 1983. Ekmek aromasının oluşumu, kaynakları ve aroma oluşumunu etkileyen faktörler. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14 (1-2), 129-137.
- Foramitti, A. and Mar A., 1982. New aspects and findings in the continious production of rye in bread industry. *Devolopments in Food Sci. B*, 805-810.
- Gänzle, M.G., Hölzel A., Walter J., Jung G. and Hammes W. P. 2000. Characterization of reutericyclin produced by *lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10), 4325-4333.
- Garly, L., 1993. Culture dough in bread making. *Baking Industry Europe*,
- Gassem, M.A., 1999. Study of the micro-organisms associated with the fermented bread (Khamir) produced from sorghum in Gizan region *Journal of Applied Microbiology*, 86 (2), 221-225.
- Gaudy, A. F. and Gaudy E. T., 1980. *Microbiology for environmental scientists and engineers* Mc.Graw Hill Book Comp., Inc. USA.
- Gilliland, J.E., 1988. *Bacterial Starter Cultures for Foods*. Crs Press, Inc., Boca Florida
- Gobbetti, M., Corsetti A., Rossi J., LA Rosa F. and De Vincenzi S. 1994a, The sourdough microflora: Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from sourdoughs of central Italy, *Italian Journal of Food Science*, 1, 85-94.
- Gobbetti, M., Corsetti A. and Rossi J., 1994b. The sourdough Microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeast: metabolism of amino acid. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 275-279.
- Gobbetti, M., Corsetti A. and De Vincenzi J., 1995. The sourdough microflora. Characterization of heterofermentative lactic acid bacteria based on acidification kinetics and impedance test, *Italian Journal of Food Science*, 2, 103-111.

- Gobbetti, M., Smocchi E., Fox P., Stepanial L. and Corsetti A., 1996. The sourdough microflora.,celular localization characterization of proteolytic enzymes in lactic acid bacteria. *Lebensm.-Wiss.U.-Technol.*, 29, 561-569.
- Gobbetti, M., 1998. The sourdough microflora interaction of lactic acid bacteria. *Trends in Food science and Technology*, 9, 267-274.
- Gullo, M., Romano A .D., Pulvirent A. and Giudici P., 2003. *Candida humilis* Dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. *International Journal of Food Microbiology*, 80 (1), 55-59.
- Hamad, H. S., Böcker G., Vogel F .R. and Hammes P .W. , 1992. Microbiological and Chemical Analysis of Fermented Sorghum Dough for Kisra Production. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 37, 728-731
- Hammes, W. P., 1990 Bacterial state culture in food production. *Food Biotechnology* 4 (1), 383-397.
- Hammes, W., P. and Gänzle M., G., 1998. Sourdough breads and related products. In: b. J. (Ed), *Microbiology of Fermented Foods*, vol, 1. Blackie Academic and Proffesional, London, 199-216.
- Hancıoğlu, Ö. ve Karapınar M., 2002. Ekşi maya ekmeğinin mikroflorası ve aromatik karakteristikleri. *Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi*, 165-175.
- Hansen, A., Lund B. and Lewis M., J., 1989. Flovour of sourdough rye bread crumb. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.*, 22, 141-144.
- Hansen, A. and Hansen B., 1993. Flovour of sourdough rye bread industry Europe. *Lebens. Wiss. U. Technol.*, 22,141-144.
- Hansen, A. and Hansen B., 1994. Volatil compounds wheat sourdoughs produced by lactic acid bacteria and sourdough yeasts. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 198,202-209.
- Hansen, A. and Hansen B., 1996. Flovour of sourdough wheat bread crumb, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung*, 202 (3), 244-249.
- Hartman, P.A. and La Grang W.S., 1985. Coliform bacteria. In : Richardson, G.H. /Ed). *Standart Methods for the Examination of Dairy Product*, (APHA), 173-186, Washington, D.C..
- Jackel, S., 1992. What is new in bread flovour. *Cereal Foods World*, 37 (11), 835-837.
- Javanainen, P. and Linko Y., 1993. Mixed- culture preferments of lactic acid and

- propionic acid bacteria for improved wheat bread shelf life. *Journal of Cereal Science*, 18 (1), 75-88.
- Karaoğlu, M.M. ve Kotancılar H.G., 2002. Tahıl ürünlerinde aroma maddeleri. *Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi*, 3-4 Ekim Gaziantep 387-395.
- Kline, L. and Sugihara T.F., 1971. Microorganism of the sanfrancisco sourdough bread process II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for sour activity. *Applied Microbiology*, 3(1), 459-465.
- Kotancılar, H.G., Çelik İ., Karaoğlu M.M., 1998. Trabzon Vakfıkebir Ekmeği. *Un Mamülleri Dünyası*. 7(1) 4-14
- Kratochvil, J. and Holas J., 1980. A gas chromatographic metod for the determination of asetic and lactic acid in rye sour. *American Association of Cereal Chemistry*, 57 (3), 209-211.
- Küfrevioğlu, Ö.İ., Akdağ R., Şahin F., Pirim İ., Çiftçi M., Polat F., Özmen İ., ve Oral B., 1999. Uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri kursu (13-24 Eylül), *Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Atatürk Üniv., Erzurum*.
- Larsen, A. G., Vogensen F. K. and Josephsen J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs: purification and characterization of bavanini A, a bacteriocin produced by *Lactobacilli bavaricus* M1. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 113-122.
- Lavermicocca, P., Valeria F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A. and Gobbetti M. 2000 Purification and characterization of antifungal compounds from the sourdough *Lactobacilli plantorum* strain 21B, *Applied and Environmental microbiology*, 66(9), 4084-4090.
- Lönner, L., Welander T., Molin N. and Dostalek M. 1986. The microflora in a sourdough started spontaneously on typical Swedish rye meal, *Food Microbiology*, 3, 3-12.
- Lund, B., Hansen A. and Lewis M.J., 1989. The influence of dough yield on acidification and production of volatiles in sourdoughs, *Lebensm. Wiss. Und Technol.*, 22, 150-153.
- Margalith, P.Z., 1981. Flovour in the Banary Fermentation, In "Flovar Microbiology", Charles C. Thomas Publisher, USA, 156-172.
- Martinez-Anaya, M.A., Pitarch B., Bayarri P. and Benedito De Barber L.,

1990. Microflora of the sourdough of wheat flour bread interaction between yeast and lactic acid bacteria in wheat doughs and their effects on bread quality. American Association of cereal Chemists, 67 (1), 85-91.
- Martinez-Anaya, M.A., Uin L.M., Macsaa P.M. and Collar C., 1994. Regulation of acetic acid production by homo and heterofermentative lactobacilli in whole-wheat sordoughs, Z. Lebensm. Unters Forsch, 199, 186-190.
- Martinez-Anaya, M., A., 1996. Enzymes and bread flavor. J. of Agric. and Food Chem., 44 (9), 2470-2480.
- Mc Donald, L.C., McFeters R.F., Daschel M.A. and Fleming, H.D., 1987. A differential medium for the enumeration of fermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol., June, 1382-1384
- Messens, W. and De Vuyst L. 2002. Inhibitory substance produced by lactobacilli isolated from sourdoughs a review. International Journal of Food Microbiology, 72, 31-43.
- Messers, J. W., Behney H.M. and Lendecke L.O., 1985. Microbiological Count Methods for the examination of Dairy Products. (APHA), 173-186, Washington, D.C..
- Nout, M.J.R. and Cremers- Molenaer T., 1987. Microbiological properties of some wheat meal sourdough starters, Chemie Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel, 10, 162-167.
- Okada, S., I Shikawa M., Yoshida I., Uchimura T., Ohara N. and Kazavi M, 1992. Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from sourdough sponges, Biosciences Biotechnology and Biochemistry, 4, 572-575.
- Olson, N.F., 1990. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavour. FEMS Microbiol. Reviews, 87, 131-138.
- Özalp, E., 1988. Süt üzerinde kullanılan starter kültürleri. Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi, 35 (1), 55-61.
- Özkaya, H., 1984. Ekmek aroması ve buna etkili faktörler. Gıda Dergisi, 9 (1), 21-27.
- Patterson, R.L.S., Charlwood B.V., Mac Lead G. and Williams A.A., 1992. Bioformation of flavours. Royal Society Chemistry, Great Britain.
- Pederson , C. S., 1979 Microbiology of food fermentation. Second edition The Avi. Publ. Comp., Inc. Westpart Connecticut 3845.

- Rabe, E., 1981. Organische sauren in unter schiedlich geführten Broten- Erfahrungen Mitverschiedenen methodenzur erkennung ven sauerrungsarten. Getreide Mehl und Brot, 35, 146.
- Rocha, J. M. and Malcata F.X., 1999. On the microbiological profile of traditional portuguese sourdough. Journal of Food Protection, 62 (12), 1416-1429.
- Rothe, M. and Ruttloff H., 1983. Aroma retention in modern bread production Die Nahrung, 27, 505-512.
- Röcken, W. and Voysey P.A., 1995. Sourdough fermentation in bread. Int. J. Food Sci. Technol. 22, 591-597.
- Rylich, N. and Groch W., 1996. Identification and Quantification of potent odorants formed by toasting of wheat bread. Lebensm. Wiss. U. Technol., 29, 515-525
- Salovaara, H. and Katunpaa H., 1984. An Approach to the Classification of *Lactobacil* Isolated from Finish Sour Rye Dough Ferments. Acta. Aliment. Polonica, 10(3-4), 231-239.
- Salovaara, H. and Savolainen J. 1984. Yeast type isolated from Finnish sour rye dough starters. Acta Aliment Polonica, 10 (3-4), 241-245.
- Salovaara, H. and Spicher G. 1986. Use of Wheat to Improve Wheat Bread Quality. International Association for Cereal Sci. And Technol., pp 26-35, ICC Congress, Hamburg.
- Salovaara, H. and Valjakka T. 1987. The Effect of Fermentation Temperature Flour Type and Darter on the Properties of Sour Wheat Bread. Int. Journal of Food Sci. and Technol., 22, 591-597.
- Salovaara, H., 1998. Lactic acid bacteria in cereal based products, In "lactic acid bacteria Microbiology and functional aspects" second edition 115-137, Inc. New York.
- Schieberle, P. and Grosh W., 1987. Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts of aroma extract dilution analysis. Z. Lebensm. Unters Forssch., 185, 111-113.
- Schieberle, P. and Grosh W., 1991. Potent odorants of the wheat bread crumb. Z. Leb. Unters. Forsch., 192, 130-135.
- Seibel, W. and Brummer J.A., 1991. Sourdough process fermented bread in Germany. Cereal Foods World, 36 (3), 299-304.

- Seitz, L.M., Chung O.K. and Rengarajan R., 1998. Volatiles is selected commercial breads. *Cereal Chem.*, 76 (6), 847-853.
- Sert, S., 1992. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Notları. Atatürk Üni. Zir. Fak. Ders Yay. No: 138, Erzurum.
- Speck, M.L., 1976. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. America Public Health Association. Washington, D.C.
- Spicher, G. and Schröder R., 1978. The Microflora of Sourdough IV. Communication: Bacterial Composition of Sourdough Starters Genus *Lactobacillus* Beijerinck. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 167, 342-354.
- Spicher, G., Rabe E., Sommer R. and Stephan H., 1981. the microflora of sourdough. XIV. Communication: About the behaviour of homofermentative sourdough bacteria and yeast in mixed culture. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 173, 291-296.
- Spicher, G. and Nierle W., 1984. The microflora of sourdough. XVIII. Communication: The protein degrading capabilities of the lactic acid bacteria of sourdough. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 178, 389-392.
- Spicher, G., 1986. Die Sauerteiggärung. *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.*, 10, 65-67.
- Spicher, G., 1987. The Microflora Sourdough XXII. Communication: The *Lactobacilli* Species of Wheat Sourdough. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 184, 3000-3003.
- Stiles, M.E. and Holzapfel W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36, 1-29.
- Stoltz, P., Vogel F.R. and Hammes P.W., 1995. Utilization of electron acceptors by *lactobacilli* isolated from sourdough. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 201, 91-96.
- Stoakes, L., Jofn M. A., Cannigan R., Schiven B. C., Ramos M., Hardley D. and Hussain E., 1994. Gas Liquid Chromatography of cellular fatty acids for identification of *staphylococcus*. *J. Clinical Microbiology*, 1908-1910.
- Sugihara, T.F., Kline L. and McCready B., 1970. Nature of the San Francisco French bread process II Microbiological aspects, *Bakers Digest*, 44, 51-56.
- Sugihara, T.F., 1985. Microbiology of bread making in "Microbiology of Fermented Foods". Elsevier Appl. Science Publisher, 249-261.
- Şahin, İ., 1990. Mikrobiyolojiye Giriş. Eser Matbaası, 237 s, Samsun

- Tamerler, T., 1986. Ekşi Maya ile Buğday Ekmeğinin Hazırlanması ve Ekşi Maya Mikroorganizmaları. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi, 4(1), 99-110.
- Tamerler, T., 1987. Ekmek lezzeti ve etki eden faktörler. Ege Üniv. Müh. Fak. Dergisi, 5(2), 133-143.
- Thiele, C., Gänzle M., G. and Vogel R. F., 2002. Contribution of sourdough *lactobacilli*, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. Cereal Chemistry, 79 (1), 45-51
- Thomsen, A.D. and Anderson H.M., 1988. Starter cultures, Quality improvement of rye bread process and production, Jysk Technologisk, Marts, Germany 45.
- Todorov, S., Onno B., Sorohire O., Chobert J.M., Ivanova I. and Dousset X., 1999. Detection and characterization of a novel anti bacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from sourdough. International Journal of Food Microbiology, 48, 167-177.
- Topal, İ. ve Köşker Ö., 1980. Ekmeklerde Sünme Durumu ve Önleme İmkanları Üzerine Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Diploma Sonrası Yüksek Okulu İhtisas Tez Özetleri, 494-511, A.Ü. Basımevi, Ankara.
- Tunail, N. ve Köşker Ö., 1986. Süt Mikrobiyolojisi Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. Yay., No: 966, Ankara.
- Wood, B.J. and Hodge M. M. 1985 . Yeast-lactic acid bacteria Interactions and their contribution to fermented foodstuffs, Microbiology of Fermented Foods, Elsevier Applied Science Publisher London and Newyork, 1, 263-293.
- Wood E.M., 1995. Wild sourdough fermentations. Laboratory Medicine, 26, (11), 729-732
- Vachon, M. and Gelinas P., 1996. Food Science Technology, Abstract, 5 (28), 176.
- Vogel, R., F., Knorr R., Müller M. R. A., Steudel U., Ganzle M. G. and Ehrman M., 1999. Non-dairy lactic fermentaitons: The Cereal World Antonie Von Leeuwenhock, 76, 403-411.
- Vollmar, A. and Meuser F., 1992. Influence of starter cultures consisting of lactic acid bacteria and yeast on the performance of a continious sourdough fermenter. Cereal Chem, 69, 20-27.

Zchentbauer, G. and Grosch W., 1998. Crust aroma of baguettes prepared in two different ways. *Journal of Cereal Science*, 28,81-92.