

Potansiyel Ekşi Hamur Starter Kültürü *Weissella cibaria* N9'un Dondurularak Kurutulması için Koruyucu Ajanların Optimizasyonu*

Latife Betül Gül¹  , Osman Gül² , Enes Dertli³ , Ahmet Hilmi Çon⁴ 

¹Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Giresun

²Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kastamonu

³Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul

⁴Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Samsun

Geliş Tarihi (Received): 30.10.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 12.07.2021

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): latife.betul@giresun.edu.tr (L.B. Gül)

☎ 0 454 310 17 40 📠 0 454 310 17 49

*Bu makale 1-2 Kasım 2018 tarihleri arasında Roma, İtalya'da düzenlenen "10th Probiotics, Prebiotics & New Foods, Nutraceuticals and Botanicals for Nutrition & Human and Microbiota Health" adlı konferansta poster bildiri olarak sunulmuş ve özeti konferans bildirisi özet kitabında basılmış "Storage Stability of Probiotic *Weissella Cibaria* N9 in Freeze-Dried Form" başlıklı bildirinin tam metin halidir.

ÖZ

Bu çalışmada ekşi hamurdan izole edilmiş ve starter kültür olarak kullanılabilmesi belirlenmiş *Weissella cibaria* N9 suşunun liyofilizasyonu için optimum kriyoprotektan formülasyonunun belirlenmesi, liyofilize kültürün karakterizasyonu ve depolama stabilitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Liyofilizasyon sonrası yüksek canlılık sağlamak için kullanılacak yağsız süt tozu (YST), laktoz ve sükröz'dan oluşan optimum formülasyon Box Behnken tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. Optimum kriyoprotektan formülasyonu yüksek canlılık (>%99) için %5.65 YST, %20 laktoz ve %9.38 sükröz şeklinde tanımlanmıştır. Optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak elde edilen liyofilize kültürün nem içeriği, a_w , camsı geçiş, partikül yüzey özellikleri ve kristal yapı bakımından kabul edilebilir fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. 3.37×10^{-3} 1/gün inaktivasyon katsayısı ile en yüksek canlılık (9.11 log kob/g) 4°C'de depolama sonunda elde edilmiştir. Sıcaklığa bağlı hızlandırılmış raf ömrü testi sonucu en hızlı canlılık kaybı 70°C'de gözlenmiş olup kriyoprotektan kullanımı termal ölüm oranını azaltmıştır. Kriyoprotektan kullanılarak üretilen kültürün oda sıcaklığında 18 ay saklanabileceği belirlenmiştir. Sonuç olarak, optimum kriyoprotektan formülasyonu *W. cibaria* N9'un liyofilizasyonu ve depolama sırasında hücre canlılığını korumada etkili olduğu, toz materyaller için gerekli özellikleri taşıdığı ve uzun dönem muhafaza için canlılığın yeterli hassasiyette tahmin edilmesinde sıcaklığa bağlı hızlandırılmış raf ömrü testinin faydalı bir teknik olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kriyoprotektan, Liyofilizasyon, *Weissella cibaria*, Depolama stabilitesi, Yanıt yüzey metodu, Optimizasyon

Optimization of Protective Agents for Freeze-Drying of *Weissella cibaria* N9 as a Potential Starter Culture

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the optimum cryoprotectant formulation for the lyophilization of *Weissella cibaria* N9 strain isolated from sourdough as a potential starter culture, the characterization of lyophilized culture and its storage stability. The optimum formulation of skim milk, lactose and sucrose as protective agents was determined by the Box-Behnken experimental design based on viability after lyophilization. The optimal cryoprotectant formulation

was identified as 5.65% skim milk, 20% lactose and 20% sucrose for maximum cell survival (>99%). Lyophilized culture obtained by the optimum cryoprotectant formulation had acceptable physicochemical properties in terms of moisture and a_w , glass transition, particle surface properties and crystal structure. The highest viability was observed at 4°C (9.11 log cfu/g) with an inactivation rate of $3.37 \times 10^{-3} \text{ day}^{-1}$. The fastest cell reduction was observed at 70°C as the result of an accelerated shelf life storage test, and protective agent effectively decreased thermal death. The culture produced by using cryoprotectant could be stored at room temperature for 18 months. Consequently, this protective agent formulation was an effective in protecting *W. cibaria* N9 viability during lyophilization and storage while lyophilized culture had ideal properties for powder materials, and accelerated shelf life storage test was a useful technique with certain predictability.

Keywords: Cryoprotectants, Lyophilization, *Weissella cibaria*, Storage stability, Response surface method, Optimization

GİRİŞ

Son zamanlarda fırıncılık ürünlerinde tahılların fermantasyonunda ekme mayası kullanımına kıyasla hamurlarda çeşitli avantajlar oluşturması nedeniyle ekşi hamur kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır [1]. Ekşi hamur ile ekme hamurunun hazırlanması, hamurların teknolojik özelliklerini iyileştirmekte, ekmeğin besinsel ve duyu özelliklerini geliştirmekte, bakteriyel ve küf bozulmalarını önleme ve bayatlama süresini geciktirme yoluyla raf ömrünü artırmaktadır [2]. Spontan ekşi hamur üretiminde görev alan laktik asit bakterileri ve mayalar hamur ortamına un, hamur ingrediyeentleri ve çevresel kaynaklardan geldiğinden dolayı tipik bir ekşi hamurun mikrobiyal ekosistemi oldukça komplekstir. Bu ekosistem aynı zamanda fermantasyon süresi ve sıcaklığı, ekşi hamur tazeleme aşamalarının sayısı, tazelemeler arasındaki fermantasyon süresi gibi faktörlerden de etkilenmektedir [3-5]. Bundan dolayı ekşi hamur üretiminde standardizasyon oldukça zordur ve bu durum ürün kalitesinde stabilite ve tekrarlanabilirlik gerektiren gıda endüstrileri için önemli bir dezavantajdır. Bu problemin üstesinden gelebilmek için tanımlanmış tek veya karışık starter kültürlerin kullanımı ile ilgili oldukça fazla çalışma bulunmaktadır [6-8]. Bununla birlikte ekşi hamur üretimi için starter kültür seçiminin yanında seçilen starter kültürlerin uzun süre depolama süresince canlılığının ve aktivitesinin yüksek olması da önemli bir diğer konudur [9]. Mikroorganizmaların canlılığının yüksek olmasını garanti etmek ve depolama boyunca kültürlerin yüksek stabiliteyi sağlamak için farklı koruma yöntemleri kullanılmaktadır [10].

Günümüzde mikrobiyal kültürleri korumada en fazla tercih edilen yöntem dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yöntemidir. Liyofilizasyon işleminde düşük kurutma sıcaklıkları kullanılmasıyla dolayı daha yüksek canlılık oranı sağlanmakta ve mikroorganizmaların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri de daha iyi korunmaktadır [11]. Bununla birlikte biyolojik materyaller dondurarak kurutma sırasında geri dönüşümsüz olarak bazı zararlar görebilmektedir. Dondurma işlemi sırasında, buz kristallerinin oluşumu ve hücre içi tuz konsantrasyonundaki artış, suyun hücreden dışarı sızmasına ve hücre dışı buz kristallerinin oluşmasına/büyümesine neden olmaktadır. Bu durum ozmotik şok olarak adlandırılmakta ve hücre canlılığı kaybının temel nedenini oluşturmaktadır [10, 12]. Hücrelerin donma zararlanması, tür ve suş çeşidi gibi

genetik altyapısına, hücrelerin büyüklüğü, şekli, gelişme fazı, lipid içeriği ve kompozisyonu gibi morfolojik ve fizyolojik özelliklerine, kurutma hızı ve süresi ile kriyoprotektan varlığı gibi kurutma prosesi koşullarına bağlıdır [10, 11, 13]. Dondurma, dondurarak kurutma ve depolama süresince hücre canlılığının ve stabilitesinin korunması için kullanılan en etkili yöntemlerden biri dondurma işlemi öncesi hücre ortamına koruyucu madde (kriyoprotektan) ilave etmektir [14]. Bu maddeler hidrojen bağlarının oluşumu, camsı geçiş sıcaklığının artması ve oksidasyon reaksiyonlarının önlenmesi gibi bir dizi koruyucu mekanizmalar ile hücre canlılığının yüksek olmasını sağlamaktadırlar [15].

Sükroz, laktoz, galaktoz, glukoz, sorbitol, sodyum glutamat, arkorbik asit ve yağsız süt tozu dondurarak kurutma işleminde hücre canlılığının korunması amacıyla en fazla kullanılan kriyoprotektanlardır [11, 13, 16-18]. Bu çalışmada elde edilmesi kolay, nispeten ucuz, tüketimi güvenli ve gıda sanayinde yaygın şekilde kullanılan yağsız süt tozu, sükroz ve laktoz [19] koruyucu madde olarak tercih edilmiştir. Bu koruyucu maddelerin dondurarak kurutmanın farklı aşamalarında farklı koruyucu etkileri bulunmakta ve tek başlarına kullanıldıklarında ortaya çıkan etkiye kıyasla beraber kullanıldıklarından daha yüksek bir etki gözlenmektedir [20]. Dolayısıyla hangi koruyucu maddelerin hangi oranlarda kullanılacağına belirlenmesi önem taşımaktadır. Literatürde farklı laktik asit bakterilerinin kriyoprotektan kullanılarak liyofilizasyonuna yönelik oldukça fazla çalışma bulunmaktadır [10, 15, 21, 22]. Ancak daha önce Dertli ve ark. [1] tarafından geleneksel ekşi hamurdan izole edilerek tanımlanan ve ekşi hamur üretiminde starter kültür olarak kullanıma potansiyeli bulunan *Weissella cibaria* N9 ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada *W. cibaria* N9'un liyofilizasyonunda kullanılacak optimum yağsız süt tozu, laktoz ve sükroz konsantrasyonlarının ve optimum konsantrasyonlar kullanılarak üretilen toz *W. cibaria* N9'nun karakterizasyonu ile depolama stabilitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Çalışmada kullanılan *W. cibaria* N9 izolatu, Dertli ve ark. [1] tarafından geleneksel ekşi hamurdan izole edilerek teknolojik/endüstriyel özelliklerine göre ekşi hamur

starteri olarak önerilmiş olup Bayburt Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir. Kriyoprotektan olarak kullanılan yağsız süt tozu (YST) Pınar Süt A.Ş. (İzmir, Türkiye), laktoz Sigma–Aldrich (Steinheim, Almanya) ve sükröz Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir

Metot

W. cibaria N9'un Aktive Edilmesi ve Çoğaltılması

W. cibaria N9 steril de Man Ragosa Sharp (MRS) broth (Merck, Darmstadt, Almanya) besiyerinde 30°C'de 12 saat inkübasyona bırakılarak aktive edilmiştir. Daha sonra 2 mL aktive edilmiş genç kültür 8 mL MRS broth besiyerine aktarılmış ve aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası 100 mL MRS broth besiyerine %5'lik olacak şekilde inokülasyon gerçekleştirilmiş ve çalkalamalı inkübatörde (Lab Companion SIF-500R, Billerica, Güney Kore) 30°C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda bakteri hücrelerini toplamak için 7.500 x g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj (Hettich, ROTINA 380R, Almanya) işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen pellet 10 mL fosfat tamponu kullanılarak yıkanmış, ardından tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen pellet hücre sayısı ~10 log kob/mL olacak şekilde kriyoprotektan çözeltisi ile süspanse edilmiştir [19, 23].

Kriyoprotektan Ortamının Hazırlanması ve Liyofilizasyon

Liyofilizasyon ve depolama süresince *W. cibaria* N9'in canlılık ve stabilitesinin korunması amacıyla bu çalışmada kriyoprotektan olarak YST, laktoz ve sükröz kullanılmıştır. Box Behnken dizaynı ile belirlenen konsantrasyonlarda kriyoprotektan çözeltileri hazırlanmış ve sterilizasyon için 110°C'de 10 dakika otoklavlanmıştır. Ardından oda sıcaklığına kadar soğutulan kriyoprotektan çözeltileri daha önce hazırlanan starter kültür ile hücre sayısı ~10 log kob/mL olacak şekilde karıştırılmış ve -86°C'de 5 saat süre ile dondurulmuştur. Donmuş kriyoprotektanlı starter kültürler dondurarak kurutucuda (Christ, Alpha 1-4 LDPlus, Almanya) -55°C'de 0.061 mbar basınç altında yaklaşık 18 saat süresince süblimasyon ve 0.04 mbar basınç altında 2 saat süre ile desorpsiyon koşullarında kurutulmuştur. Benzer şekilde kriyoprotektan içermeyen saf kültür de kontrol grubu olarak kurutulmuştur.

Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Dondurma ve dondurarak kurutma sonrası hücre canlılığı Carvalho ve ark. [24] tarafından rapor edilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Steril serum fizyolojik tuzlu su ile orijinal hacmine seyreltilmiş toz kültürden 1 mL alınarak belirlenen dilüsyonlara kadar seyreltilmiştir. Uygun dilüsyonlardan MRS agara (Merck, Darmstadt, Almanya) ekim yapılmış ve 30°C'de 48 saat %5 CO₂ ortamında inkübasyona (Memmert Inc 153, Almanya) bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası gelişen koloniler sayılmış ve hücrelerin canlılığı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Canlılık (\%)} = 100 * N/N_0 \quad (1)$$

Burada; N₀ işlem öncesi hücre canlılığını (log kob/g) ve N ise dondurma veya dondurarak kurutma işlemi sonrası hücre canlılığını (log kob/g) ifade etmektedir.

Liyofilize Tozların Karakterizasyonu

Liyofilizasyon ile elde edilen toz kültürlerin karakterizasyonu amacıyla nem içeriği, su aktivitesi, camsı geçiş sıcaklığı, X ışını kırınımı ve moleküler görüntüleme analizleri gerçekleştirilmiştir. Tozların su aktivitesi Aqua Lab 4TE (FF Instrumentations, Yeni Zelanda) su aktivitesi tayin cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Liyofilize tozlar ölçüm kaplarına aktarılıp ölçüm kapları cihaza yerleştirilmiş ve 20°C'de ölçüm gerçekleştirilmiştir. Örneklerin nem içerikleri, darası alınmış kurutma kabında sabit ağırlığa ulaşılan kadar 105°C'de kurutma yöntemi ile belirlenmiş ve ağırlıkta meydana gelen değişim üzerinden hesaplanmıştır.

Toz örneklerin camsı geçiş sıcaklıkları diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC; Perkin Elmer DSC 30, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, 10 mg örnek alüminyum kaplı DSC kaplarına tartılmış ve boş bir alüminyum DSC kabı referans olacak şekilde azot gazı atmosferinde 10°C/dakika ısıtma hızı ile -30°C ile 200°C arası taranmıştır. Karakteristik camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ASTM Standard Metot E 1356-91'e göre camsı geçiş ile ısı akışının orta noktadaki sıcaklığı olarak alınmıştır [16].

Liyofilize tozların kristal içeriği X ışını kırınımı (XRD) ölçümleri ile Rigaku SmartLab X-ray difraktometre (40 kV, 30 mA) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Tarama işlemi Cu Kβ radyasyonu kullanılarak (40 kV, 30 mA) 5 - 70° (2θ) açıları 2°/dakika hızında gerçekleştirilmiştir.

Liyofilize toz partiküllerinin yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM, Jeol JSM-7001F, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçüm öncesi tozlar vakum püskürtme kaplayıcı kullanılarak (Quorum SC7620, İngiltere) 20 nm kalınlığında altın ile kaplanmıştır. Görüntüleme yüksek vakum altında 5 ile 15 kV arasında (en iyi görüntü elde etmek için) ve farklı büyütme oranlarında (100, 250, 500 ve 1000X büyütme) gerçekleştirilmiştir.

Depolama Stabilitesi

Kriyoprotektan kullanılarak liyofilize edilmiş *W. cibaria* N9'nin canlılık değişimi 4 ve 25°C'de 6 ay boyunca gözlenmiştir. Hücre canlılığı depolamanın 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 ve 180. günlerinde analiz gerçekleştirilerek belirlenmiştir. Hücre canlılığı için 0.1 g toz 9.9 mL serum fizyolojik tuzlu su içerisinde süspanse edilmiş ve ardından dilüsyonlar hazırlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan MRS agara ekim yapılarak 30°C'de 48 saat %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası gelişen koloniler sayılmıştır. Depolama süresince liyofilize *W. cibaria* N9'nin 4 ve 25°C'deki inaktivasyon oran sabiti birinci dereceden reaksiyon kinetiği eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$k = \ln\left(\frac{N_0}{N}\right)/t \quad (2)$$

Burada; N , depolama süresince hücre canlılığını (log kob/g); N_0 , depolama başlangıcı hücre canlılığını (log kob/g); t , depolama süresini (gün) ve k , inaktivasyon oran sabitini ifade etmektedir.

Ayrıca liyofilize *W. cibaria* N9'nin depolama süresince belirlenen canlılık değişiminin tahmin edilebilmesi ve liyofilize kültürün raf ömrünün tespit edilebilmesi için hızlandırılmış raf ömrü testi uygulanmıştır. Bu amaçla kriyoprotektan ilavesiz kültür 50°C'de 4 saat, 60°C'de 1.5 saat, 70°C'de 0.32 saat ve kriyoprotektan ilaveli liyofilize kültür 50°C'de 48 saat, 60°C'de 8 saat, 70°C'de 0.64 saat inkübasyona bırakılmıştır. Belirtilen süreler sonunda MRS agara ekim yapılarak hücre canlılığı tespit edilmiştir. Depolama öncesi ve 3 farklı sıcaklıkta inkübasyon sonrası tespit edilen canlı hücre sayılarından k değerleri eşitlik (2)'den yararlanılarak hesaplanmıştır [25, 26]. Kriyoprotektan kullanılarak liyofilize edilen *W. cibaria* N9'nin 4 ve 25°C sıcaklıklardaki k değerleri ise Arrhenius eşitliğine (Eşitlik 3) göre hesaplanmıştır [26].

$$\log k = \log k_0 - (E_a/2.303R)x(1/T) \quad (3)$$

Burada; k_0 , frekans faktörü olarak adlandırılan deneysel sabiti; T , mutlak sıcaklığı (°C); R , gaz sabitini (8.32 J/mol.K); ve E_a , aktivasyon enerjisini ifade etmektedir.

Deneysel Tasarım

W. cibaria N9'nin liyofilizasyonunda optimum kriyoprotektan formülasyonunun belirlenmesi için YST (X_1), laktoz (X_2) ve sükroz (X_3) bağımsız değişkenler olarak seçilmiş olup minimum ve maksimum konsantrasyonları sırasıyla %0-20, %0-20 ve %0-10 aralıklarında seçilmiş ve merkezde 5 tekerrür olacak şekilde 3 seviyeli ve 3 faktörlü Box Behnken dizaynı kullanılarak kriyoprotektan konsantrasyonlarını içeren deneme planı elde edilmiştir. Dizayn, Design Expert® (Stat-Ease, Minneapolis, ABD) (deneme versiyonu) programı ile belirlenmiştir. Dondurma (Y_1) ve dondurarak kurutma (Y_2) sonrası hücre canlılığı olmak üzere iki bağımlı değişken (yanıt) bulunmaktadır. Deneysel çalışma sonrası, bağımsız değişkenler ve elde edilen yanıtlar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için ikinci dereceden polinom model denklemi kullanılmıştır.

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (4)$$

Burada; Y , yanıt değişkenini, X_i ve X_j , bağımsız değişkenlerin seviyesini, β_0 , ikinci dereceden reaksiyon sabitini, β_i , β_{ii} and β_{ij} , bilinmeyen regresyon parametrelerini ifade etmektedir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Kriyoprotektanların Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Liyofilizasyon işleminde kriyoprotektan olarak kullanılan YST, laktoz ve sükrozun *W. cibaria* N9'un canlılığı üzerindeki etkilerinin deneysel sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Dondurma ve dondurarak kurutma işlemleri sırasında kriyoprotektan kullanımı hücre canlılığının korunması açısından önemli düzeyde pozitif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Kriyoprotektan kullanılmadan dondurarak kurutulan kültürde yaklaşık 2 log kob canlılık kaybı meydana gelirken dondurarak kurutma işleminde kriyoprotektan kullanımı sonucunda en fazla 0.46 log kob canlılık kaybı (%5 sükroz kullanıldığında) tespit edilmiştir. Dondurma sırasında hücre canlılığı üzerine sadece laktoz etkili bulunurken, dondurarak kurutma sırasında canlılık üzerine laktoz ile sükroz kullanımı önemli etki göstermiştir ($P < 0.05$).

Dondurma işlemi için merkez noktasındaki sükroz (%5) ile YST ve laktoz konsantrasyonlarının fonksiyonu olarak canlılık değişimini veren yanıt yüzey grafiği ve eşyükselti eğrisi Şekil 1-A'de görülmektedir. Laktoz konsantrasyonunun artması dondurma sırasında hücrenin daha iyi korunmasını sağlarken, YST konsantrasyonu %10'un üzerine çıktığında canlılığın kısmen azalmasına neden olmuştur. Buna karşılık, YST kullanımı dondurma işleminde hücre canlılığı üzerine

istatistiksel olarak etkili bulunmamıştır ($P > 0.05$). Dondurarak kurutma işlemi sırasında ise hücre canlılığı üzerine laktoz ve sükroz varlığı önemli düzeyde etkili bulunurken ($P < 0.05$), YST varlığının etkisinin sınırlı olduğu görülmektedir ($P > 0.05$). Merkez nokta olarak YST (%10) alındığında laktoz ve sükroz konsantrasyonlarının fonksiyonu olarak canlılık değişimini veren yanıt yüzey grafiği ve eşyükselti eğrisi Şekil 1B'de görülmektedir.

Her iki kriyoprotektanının konsantrasyonlarının artırılması dondurarak kurutma sırasında hücre canlılığının olumlu yönde değişmesini sağlamıştır. Buna karşılık canlılık değişimi üzerine laktozun sükroza göre daha etkili olduğu söylenebilir. Çalışmamıza benzer şekilde, Costa ve ark. [27] tarafından gerçekleştirilen çalışmada *Pantoea agglomerans* CPA-2'in dondurarak kurutulması sırasında en iyi korumayı şekerlerin sağladığı ve disakkaritlerin kullanımının hücre canlılığını %60'ın üzerinde, monosakkaritlerin ise %30-50 arasında koruduğu rapor edilmiştir. Schwab ve ark. [28] dondurma ve dondurarak kurutma işlemlerinde ortama şeker ilavesinin izotonik çözeltiye kıyasla *L. reuteri* TMW1.106 suşunun korunması üzerine daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada, sükrozun koruyucu etkisinin YST kullanımına göre çok daha iyi olduğu da rapor edilmiştir. Kurutma ortamında bulunan ve hücre duvarına penetre olma, hücre duvarı veya membranı ile etkileşime girme yeteneğine sahip olmayan polisakkaritler ve proteinler gibi bazı yüksek moleküler ağırlıklı maddelerin koruyucu etkileri; mikroorganizmaların yüzeylerinde adsorbe olup viskoz bir tabaka oluşturarak suyun hücreden çevreye kısmen uzaklaştırılmasına müsaade etmelerine

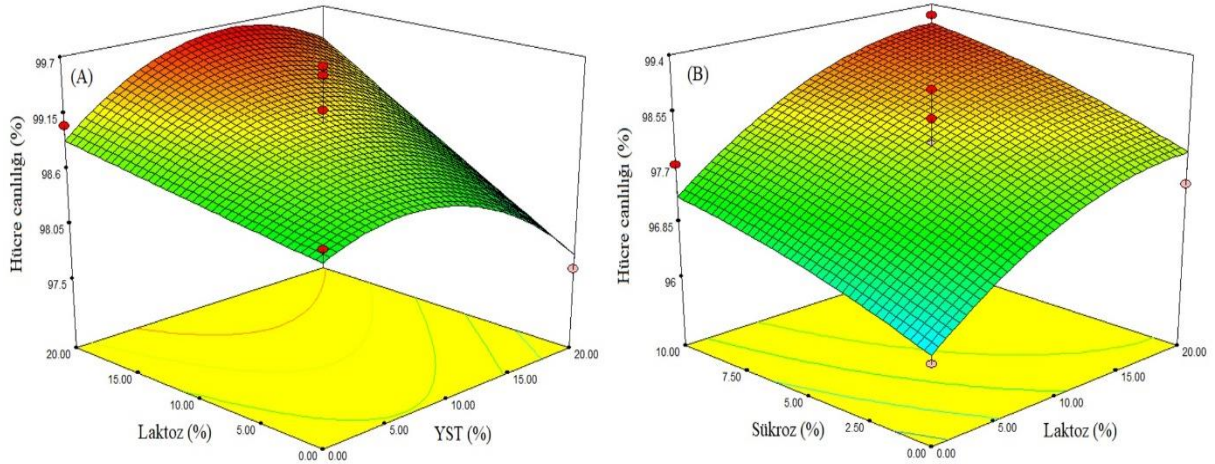
bağlanabilmektedir. Böylece hücrenin yakınındaki amorf buzun yapısı korunmakta, buz kristalinin büyümesi engellenmekte ve sonuç olarak hücre içindeki buz

kristallerinin miktarı azalarak hücre ölümü önlenmektedir [29].

Tablo 1. Box Behnken deneme planı ve elde edilen sonuçlar
Table 1. Box Behnken trial plan and results

Sıra No	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)
1	-1	0	-1	97.52	95.89
2	1	0	1	97.52	97.52
3	-1	1	0	99.04	98.38
4	0	0	0	99.61	97.90
5	0	0	0	99.52	98.46
6	0	1	1	99.52	99.22
7	1	-1	0	97.59	96.80
8	1	0	-1	99.09	98.45
9	-1	0	1	98.83	97.77
10	0	0	0	99.19	98.89
11	0	0	0	98.61	97.54
12	-1	-1	0	98.61	95.24
13	0	1	-1	98.97	97.45
14	0	-1	1	98.62	97.75
15	0	-1	-1	97.90	96.08
16	1	1	1	99.24	97.99
17	0	0	1	98.67	98.06

X₁, Yağsız süt tozu (%); X₂, Laktoz (%); X₃, Sükroz (%); Y₁, Dondurma sonrası canlılık (%); Y₂, Dondurarak kurutma sonrası canlılık (%)



Şekil 1. Farklı kriyoprotektanlar ile birlikte dondurulan (A) ve kurutulan (B) *W. cibaria* N9 kültürünün canlılık düzeyi (%) için yanıt yüzey grafiği ve eşyükselti eğrileri

Figure 1. Response surface plot and contour lines for viability (%) of W. cibaria N9 culture (A) frozen and (B) dried with different cryoprotectants

Optimizasyon ve Model Uygunluğu

Dondurma ve dondurarak kurutma sonrası *W. cibaria* N9'un hücre canlılığı üzerine kriyoprotektanların etkisi ile ilgili ANOVA sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Dondurma ve dondurarak kurutma için quadratik modelde R² değeri yüksek (>0.830) bulunmuş olup modelin uygunluğu için R² değerinin 0.80'den yüksek olması beklenmektedir [30]. Dondurma ve dondurarak kurutma sonrası hücre canlılıkları (Y₁ ve Y₂) için model F-değerleri sırası ile 3.78 ve 5.41 olarak belirlenmiş olup bu değerler modelin hücre canlılığı için önemli olduğunu göstermektedir.

Dondurarak kurutulma sonrası *W. cibaria* N9 suşunun canlılık oranının maksimum olması için kullanılacak olan kriyoprotektan formülasyonu ikinci dereceden polinom model kullanılarak optimize edilmiştir. Optimum formülasyon Derringer'in istenirlik fonksiyonuna göre belirlenmiştir. Elde edilen yanıtlar doğrultusunda maksimum istenirlik fonksiyonuna (D=0.972) göre *W. cibaria* N9 suşu için YST %5.65, laktoz %20 ve sükroz %9.38 olarak seçilmiştir.

Tablo 2. *W. cibaria* N9'un farklı kriyoprotektanlar kullanılarak liyofilizasyonu ile elde edilen yanıtlar üzerine lineer, quadratik ve interaksiyonlarının etkisini gösteren ANOVA tablosu
 Table 2. ANOVA table showing the effect of linear, quadratic and interactions on the responses obtained by lyophilization of *W. cibaria* N9 using different cryoprotectants

Varyans kaynağı	SD	Y ₁ (%)			Y ₂ (%)		
		Kareler Toplamı	F- değeri	P-değeri	Kareler Toplamı	F- değeri	P-değeri
Model	9	6.42	3.78	0.0466*	16.02	5.41	0.0184*
X ₁	1	0.09	0.2	0.6647	1.51	4.6	0.0691
X ₂	1	2.04	10.83	0.0133*	6.40	19.45	0.0031*
X ₃	1	0.13	0.68	0.4378	2.42	7.34	0.0302*
X ₁ X ₂	1	0.37	1.97	0.2028	0.95	2.89	0.1331
X ₁ X ₃	1	2.07	10.99	0.0129*	1.97	5.98	0.0444*
X ₂ X ₃	1	0.01	0.041	0.8454	0.001	0.001	0.9399
X ₁ ²	1	1.07	5.7	0.0483	1.73	5.27	0.0554
X ₂ ²	1	0.01	0.01	0.9772	0.76	2.32	0.1719
X ₃ ²	1	0.59	3.13	0.1201	0.06	0.19	0.6771
Kalıntı	7	1.32			2.30		
M, U*	3	0.45	0.68	0.6065	1.22	1.5	0.3438
Saf Hata	4	0.88			1.09		
Toplam	16	7.74			18.32		

X₁: Yağsız Süt Tozu (%); X₂: Laktöz (%); X₃: Sükroz (%); Y₁: Dondurma sonrası canlılık (%); Y₂: Dondurarak kurutma sonrası canlılık (%).

Bağımsız değişkenler olan YST (X₁), laktöz (X₂) ve sükroz (X₃) ile yanıtlar olan dondurma (Y₁) ve

dondurma sonrası (Y₂) hücre canlılığı ile ilgili ikinci dereceden polinom eşitlikleri aşağıda verilmiştir.

$$Y_1 = 97.226 + 0.135X_1 + 0.023X_2 + 0.328X_3 + 0.003X_1X_2 - 0.014X_1X_3 - 0.001X_2X_3 - 0.005X_1^2 + 0.001X_2^2 - 0.015X_3^2 \quad (5)$$

$$Y_2 = 93.936 + 0.290X_1 + 0.221X_2 + 0.294X_3 - 0.005X_1X_2 - 0.014X_1X_3 + 0.001X_2X_3 - 0.006X_1^2 - 0.004X_2^2 - 0.005X_3^2 \quad (6)$$

İstatistiksel modelin geçerliliğini tespit etmek için optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak *W. cibaria* N9 suşu liyofilize edilmiş ve dondurma ile dondurarak kurutma sonrası hücre canlılığı belirlenmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlar ile optimizasyon çalışmasında tahmin edilen sonuçlar arasında istatistiksel farklılık bulunmamıştır (P>0.05). Dondurma ve dondurarak kurutma için deneysel ve tahmin edilen değerlerden sapma <0.001 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç kriyoprotektan formülasyonunu optimize etmek için kullanılan istatistiksel yöntemin başarılı olduğunu göstermektedir.

Liyofilize Kültürün Karakterizasyonu

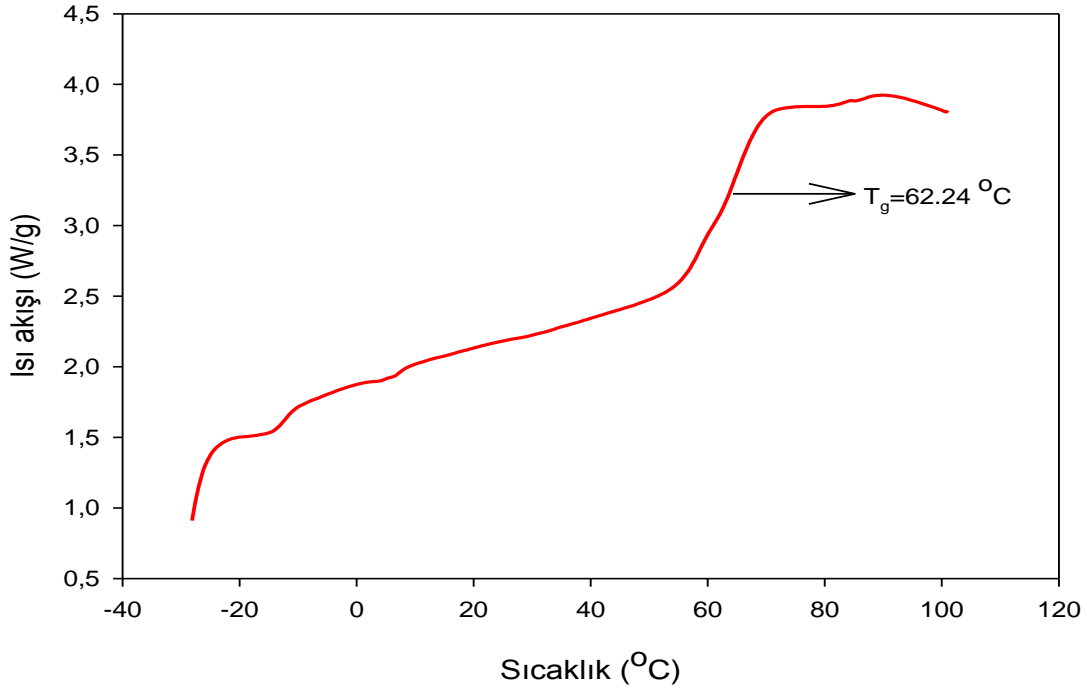
Kurutulmuş kültürler için su aktivitesi ve nem içeriği hücre aktivitesinin ve canlılığının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca toz formundaki materyallerin nem içerikleri ürün stabilitesi ile aglomerasyon, düşük yapışkanlık ve yüksek akış yeteneği gibi kalite özellikleri açısından da oldukça önemli bir parametredir. Optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak *W. cibaria* N9 suşunun liyofilizasyonu sonucunda elde edilen toz materyalin su aktivitesi 0.114±0.001 ve nem içeriği %3.02±0.08'dir. Bu sonuçlar liyofilize kültürlerin uzun süre depolanması için tavsiye edilen değerlerin (a_w<0.25 ve nem içeriği <%10) [31] altında olup depolama süresince bakteriyel canlılığının ve stabilitesinin korunması için bu seviyelerde kalması gerekmektedir [32]. Tonon ve ark. [33] tavsiye edilen bu değerlerin altında biyokimyasal reaksiyonlar için yeterli serbest suyun bulunmadığını ve bundan dolayı depolama süresince hücre canlılığı ve stabilitesinin korunacağını belirtmişlerdir. Diğer taraftan Li ve ark. [34]

kültürlerin aşırı kurutulması sonucu hücre canlılığı ve stabilitesinin olumsuz etkileneceğini bildirmişlerdir. Ananta ve ark. [35] tarafından gerçekleştirilen çalışma sonucunda depolama süresince kurutulmuş tozların stabilitesinin iyi olması için ideal nem içeriğinin %4 ile %7 arasında olması gerektiği ve laktöz kristalizasyonu gibi ürün kalitesini olumsuz etkileyen kusurların giderilmesi için de nem içeriğinin düşük olması gerektiği belirtilmiştir.

Optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak elde edilen toz materyalin sıcaklık karşısındaki davranışı diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) ile belirlenmiş olup DSC termogramı Şekil 2'de verilmiştir. *W. cibaria* N9 suşunun kriyoprotektanlar ile liyofilizasyonu sonucu elde edilen toz kültürün camı geçiş sıcaklığı 62.24°C olarak belirlenmiştir. Oda sıcaklığının oldukça üstünde belirlenen camı geçiş sıcaklığı optimum kriyoprotektan formülasyonunun hem liyofilizasyon hem de uzun depolama süresince bakteriyel kültürün canlılığı ve stabilitesi açısından iyi bir koruyucu etkiye sahip olacağını göstermektedir. Bu etki muhtemelen laktözün hücreler arası su miktarını azaltan dehidrasyon ajanı olarak davranmasından kaynaklanmaktadır. Shu ve ark. [18] şeker varlığında camı geçiş sıcaklığının yüksek olduğunu ve yüksek camı geçiş sıcaklığının dondurarak kurutma ve depolama süresince daha iyi koruma sağladığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde Chen ve ark. [36] dondurarak kurutma sırasında karbonhidratların bakteriyel hücre zarının kristal oluşumu hasarından korunması için önemli bir faktör olduğunu rapor etmişlerdir. Dondurarak kurutma sırasında kriyoprotektan kullanımı camı geçiş sıcaklığını yükseltmekte ve böylece canlı hücrelerin

çekirdekte kristal oluşumu meydana gelmeden camsı duruma geçebilmesini sağlamakta ve ayrıca sitoplazmik

membran özelliklerinin stabil kalmasında da rol oynamaktadır [37, 38].



Şekil 2. Optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak kurutulan *W. cibaria* N9 kültürünün DSC termogramı

Figure 2. DSC thermogram of W. cibaria N9 culture dried using optimum cryoprotectant formulation

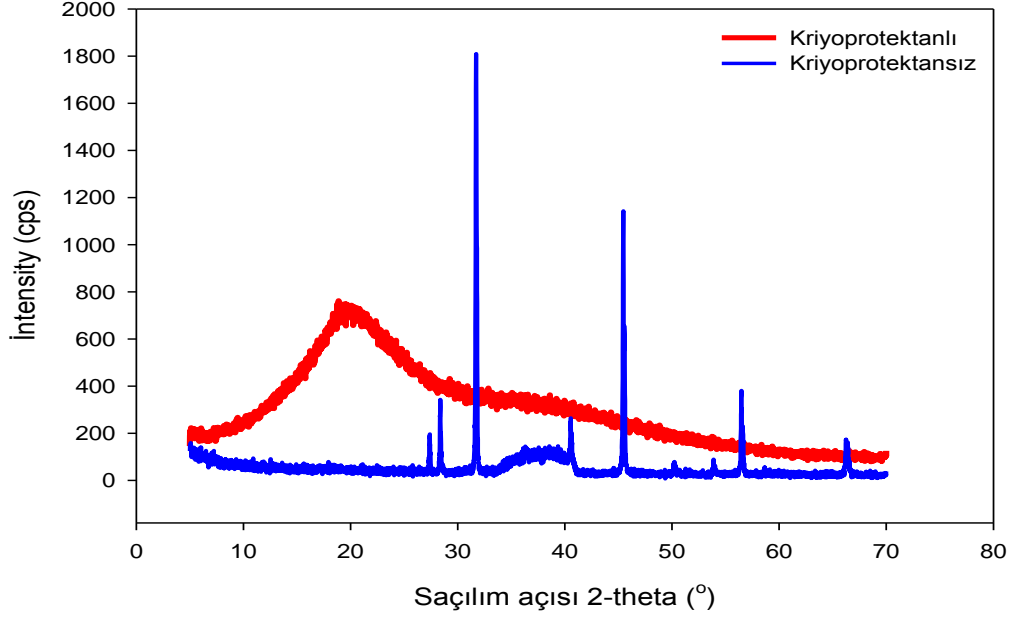
Liyofilize toz kültürün kristal-amorf yapılarını tanımlamak için X-ray difraksiyon ölçümleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen difraktam Şekil 3'te verilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere, kriyoprotektan kullanılmadan üretilen kültürde kristal yapıların varlığını gösteren 9 adet yoğun Bragg pikleri bulunmaktadır. Bu piklerin saçılma açıları $2\theta=27.37^\circ$; 28.35° ; 31.69° ; 40.52° ; 45.23° ; 50.17° ; 53.84° ; 56.45° ve 66.21° olup pikler muhtemelen matriks materyaldeki KCl kristallerinden kaynaklanmaktadır. Buna karşılık kriyoprotektan kullanılarak liyofilize edilen kültürün difraktamında herhangi bir kristal piki bulunmadığından amorf yapı gösterdiği söylenebilir. Amorf matrikslerin çözünürlüğünün yüksek olduğu kadar higroskopik olduğu da bilinmektedir [39].

Kriyoprotektan kullanılmadan ve kullanılarak liyofilize edilen kültürüne ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 4'de verilmiştir. Kriyoprotektan kullanılmadan fosfatlı tampon çözeltisinde dondurularak kurutulan saf *W. cibaria* N9 suşu tipik basil şeklinde görülmektedir (Şekil 4A). Kriyoprotektan kullanılarak liyofilize edilen ve 100X büyütme oranı ile elde edilen görüntüde ise *W. cibaria* N9 suşunu içeren partiküllerin yüzeylerinin tipik liyofilize partiküllerden oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4B). Partiküllerin yüzeylerinin pürüzsüz olduğu ve yüzeyde herhangi bir çatlak bulunmadığı ve ayrıca bakteri hücrelerinin tamamen kriyoprotektan içerisinde kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4C ve 4D). Partiküllerin yüzeyinde çatlak, kırık veya deliklerin bulunması partiküllerin daha yüksek gaz

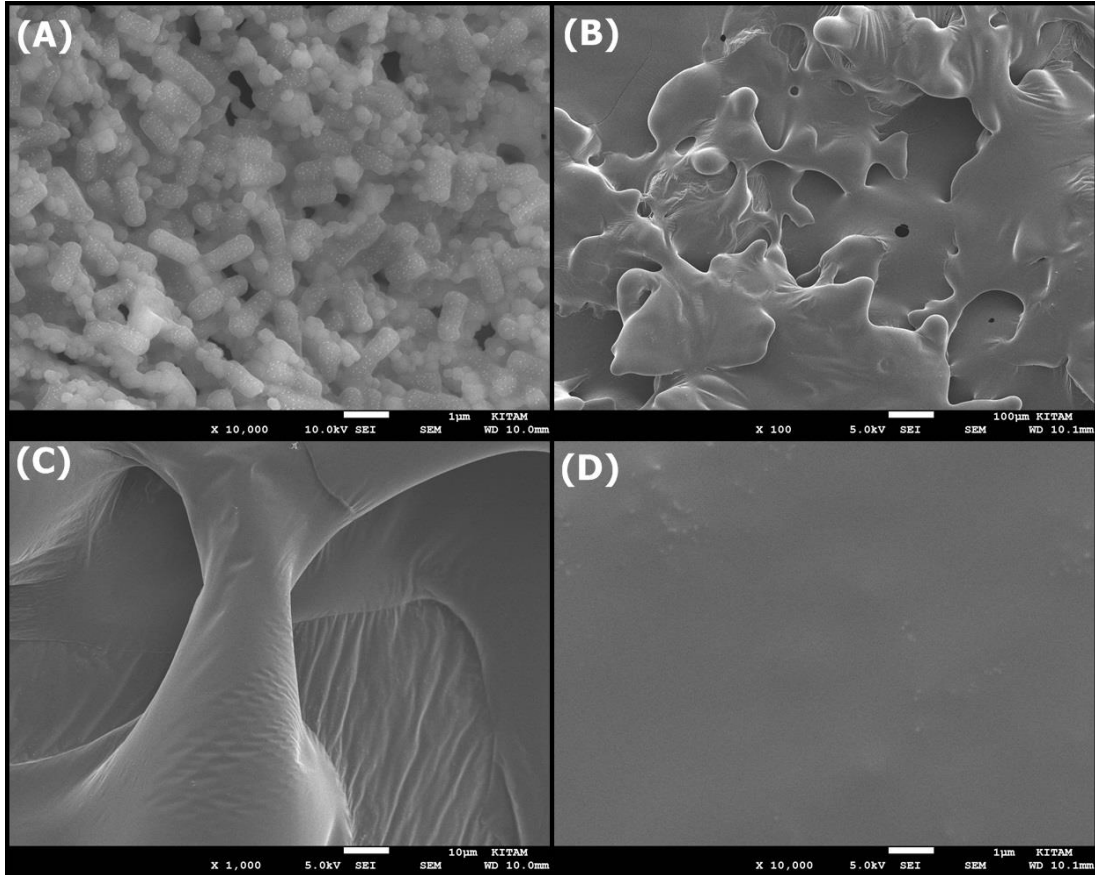
geçirgenliğine neden olmakta ve dolayısıyla depolama süresince hücrenin daha az korunmasına yol açmaktadır [40]. Ayrıca partiküllerin gözeneksiz kompakt yüzeyi, asit veya safra difüzyonunu durdurmak için iyi bir bariyer özellik göstermekte ve kriyoprotektan matriksten bakteri hücrelerinin ayrılmasını önlemekte görev almaktadır [41]. Bu nedenle uzun süreli depolamalarda hücrelerin canlılık ve stabilitesinin korunması için arzu edilen partikül yüzeylerinin tek düze ve pürüzsüz olması istenmektedir ve bu form çalışmada kullanılan kriyoprotektan uygulaması ile sağlanabilmektedir.

Depolama Stabilitesi

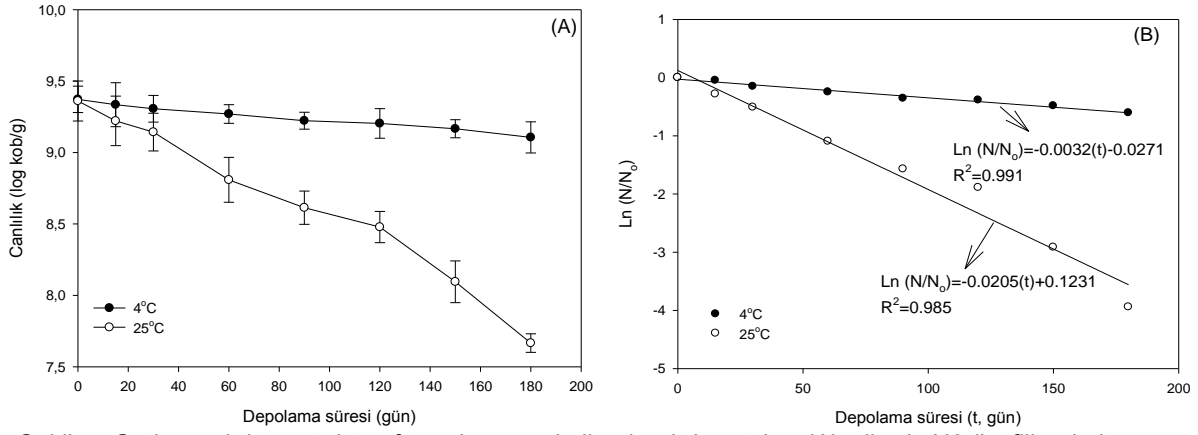
Optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak liyofilize edilen *W. cibaria* N9'un 4 ve 25°C'de 6 ay süresince canlılık kaybı belirlenmiş ve depolama süresince belirlenen canlılık kaybı sonuçları Şekil 5-A'da verilmiştir. Depolama başlangıcında canlılık sayısı 9.36 log kob/g iken 4 ve 25°C'de depolama sonunda hücre canlılığı sırası ile 9.11 ve 7.67 log kob/g olarak belirlenmiştir. Buzdolabı sıcaklığında (4°C) depolanan kültürde canlılık kaybı (0.26 log kob azalma), oda sıcaklığında (25°C) depolananlara (1.69 log kob azalma) göre daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar daha önceki çalışma sonuçları ile benzer olup [40, 42-45] "0°C'nin üzerindeki düşük sıcaklıklara kıyasla, yüksek sıcaklıklar hücre canlılığında daha fazla azalmaya neden olmaktadır" bulgusunu desteklemektedir.



Şekil 3. Kriyoprotektansız ve optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak kurutulmuş *W. cibaria* N9 kültürüne ait X-ray difraktogramları
Figure 3. X-ray diffractograms of W. cibaria N9 culture without cryoprotectant and dried using optimum cryoprotectant formulation



Şekil 4. Optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak kurutulmuş *W. cibaria* N9 kültürüne ait SEM görüntüsü: kriyoprotektan kullanılmadan kurutulmuş saf kültür (A); kriyoprotektan kullanılarak kurutulmuş kültürlerin 100X (B), 1000X (C) ve 10000X (D) büyütme oranındaki görüntüleri
Figure 4. SEM image of W. cibaria N9 culture dried using optimum cryoprotectant formulation: pure culture dried without cryoprotectant (A); Images of cultures dried using cryoprotectant at 100X (B), 1000X (C), and 10000X (D) magnifications



Şekil 5. Optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak kurutulmuş *W. cibaria* N9 lyofilize kültürünün depolama süresince canlılık değişimi (A) ve 4 ile 25°C'de inaktivasyon hız sabiti (B)

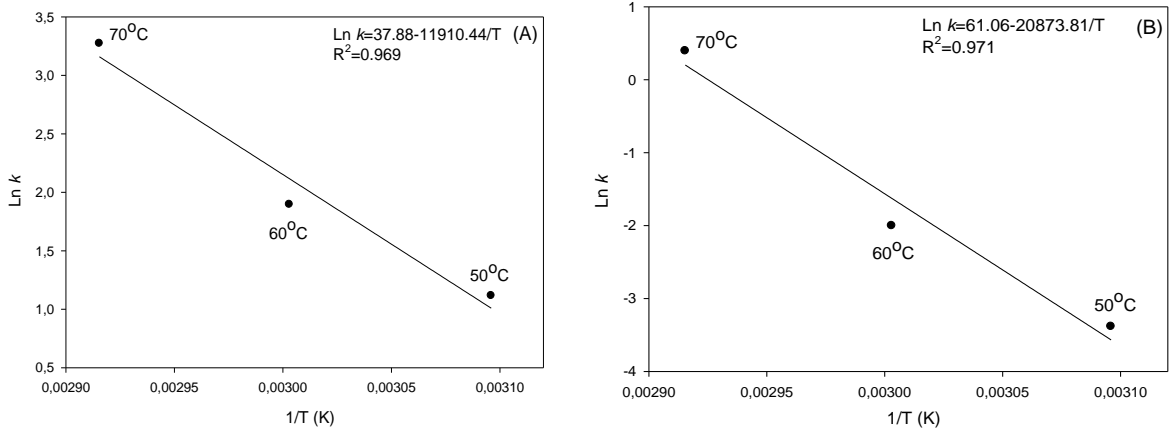
Figure 5. (A) Viability change and (B) inactivation rate constant of dried *W. cibaria* N9 lyophilized culture using optimum cryoprotectant formulation during storage at 4 to 25°C

Dondurarak kurutma sonrası mikrobiyal canlılığın uzun süre muhafaza edilmesinin büyük ölçüde depolama sıcaklığına bağlı olması [18] ve mikroorganizmaların nispeten daha düşük bir sıcaklıkta daha yüksek düzeylerde canlı kalma eğilimi göstermesi farklı olgularla açıklanmaktadır. Yüksek sıcaklıkta hücre canlılığı üzerinden zararlı etkilere yol açan kimyasal ve enzimatik reaksiyonlar ile lipit oksidasyonu gibi hücre içi metabolik aktivitelerin artması hücre canlılığının azalmasına neden olmaktadır [46]. Olası bozulma reaksiyonları arasında, hücre zarı yağ asitlerinin lipit oksidasyonu depolama sırasında hücre ölümü için esas neden olarak kabul edilmektedir. Lipit oksidasyonu hücre zararlanmalarına, uzun süreli depolama sırasında esas olarak DNA ve hücre zarına zarar veren serbest radikallerin oluşumu ile katkıda bulunmaktadır [31]. Depolama sıcaklığının yüksek olması ile çevre sıcaklığı camısı geçiş sıcaklığına yaklaşmakta ve suyun moleküler hareketliliğinin değişmesine neden olarak mikroorganizmaların korunmasında kullanılan matrisin elastik duruma yaklaşmasına ve suyun moleküler mobilitesinin artmasına neden olmaktadır [46, 47]. Buzdolabı ve oda sıcaklığında depolama sonunda mikroorganizmanın canlılık düzeyi 7 log kob/g üzerinde tespit edilmiş ve 4°C depolanan kültürün canlılık düzeyinin kültür olarak kullanılması için tavsiye edilen limit değer olan 9 log kob/g değerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir [47, 48]. Bu limit değer dikkate alındığında dondurularak kurutulmuş *W. cibaria* N9 suşunun buzdolabı koşullarında 6 ay depolama sonrasında sahip olduğu canlılık düzeyinin iyi bir ekşi hamur üretimi için yeterli olduğu söylenebilir.

Kullanılan kriyoprotektan formülasyonunun koruyucu kapasitesi inaktivasyon katsayısı (k) cinsinden de değerlendirilmiş olup inaktivasyon katsayısı birinci dereceden reaksiyon modeli ile hesaplanmıştır (Şekil 5-B). Oda sıcaklığında depolamada sonrası hesaplanan inaktivasyon katsayısı $k = 2.19 \times 10^{-2}$ 1/gün iken buzdolabı koşullarında depolanan kültürün inaktivasyon

katsayısı $k = 3.37 \times 10^{-3}$ 1/gün olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar kriyoprotektan kullanılarak kurutulmuş *W. cibaria* N9 suşunun oda sıcaklığına kıyasla buzdolabı koşullarında daha stabil olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde farklı kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak kurutulmuş *L. curvatus* N19 ve *L. brevis* ED25'in uzun süre depolanması sonucunda hücre canlılıklarının buzdolabı koşullarında daha stabil kaldığı tespit edilmiştir [40, 42]. Çalışmada dondurularak kurutulmuş *W. cibaria* N9'ün depolama stabilitesinin tahmini hızlandırılmış depolama testi kullanılarak belirlenmiştir. Kriyoprotekansız ve optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak lyofilize edilen *W. cibaria* N9 suşunun alışılmış depolama sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda (50, 60 ve 70°C) inkübasyonu ile hızlandırılmış depolama testi uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 6-A'da verilmiştir.

Kriyoprotektan kullanmadan lyofilize edilen *W. cibaria* N9 suşunun sıcaklığa karşı stabilitesinin oldukça düşük olduğu ve hücre canlılığının 50, 60 ve 70°C'de sırasıyla 4, 3 ve 0.64 saat sonra tespit edilebilir düzeyin altına düştüğü gözlenmiştir. Uygulanan sıcaklıklar arasında en yüksek termal ölüm 70°C'de meydana gelmiştir. Benzer şekilde King ve ark. [49], Tsen ve ark. [26] ve Kim ve ark. [48] tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda da kriyoprotektan kullanılmadan dondurularak kurutulmuş laktik asit bakterisi hücrelerinin çalışılan bütün yüksek sıcaklıklarda canlılıklarını önemli düzeyde kaybettiği ve en hızlı termal ölümün 70°C'de olduğu belirtilmiştir. Optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak lyofilize edilen bakterinin çalışılan sıcaklıklarda canlılık kaybı 0.41 ile 0.71 log kob arasında bulunmuş ve lyofilizasyonda kriyoprotektan kullanımı hücrelerin termal stabilitelerini önemli düzeyde iyileştirmiştir. Bu sonuç Savedbown ve ark. [47] ve Gul ve ark. [40] tarafından elde edilen sonuçlar ile uyumlu olup, YST ve proteinler gibi kriyoprotektanların kullanımının hücrelerin termal ölüm oranını önemli düzeyde azalttığını ortaya koymuştur.



Şekil 6. Kriyoprotektansız (A) ve optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak (B) kurutulan *W. cibaria* N9 kültürünün farklı sıcaklıklarda inaktivasyon hız sabiti (k) için Arrhenius grafikleri

Figure 6. Arrhenius plots for the inactivation rate constant (k) of *W. cibaria* N9 culture dried (A) without cryoprotectant and (B) using optimum cryoprotectant formulation at different temperatures

Hızlandırılmış depolama testi sonuçları (50, 60 ve 70°C'de) ekstrapolasyon çalışmaları yapmak ve hücrelerin gerçek zamanlı davranışını tahmin etmek için kullanılmıştır. Dondurularak kurutulmuş kültürlerin termal kayıpları için k (1/sa) değerleri Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır. Kriyoprotektansız ve optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak liyofilize edilen *W. cibaria* N9'un k değerleri sırasıyla 3.05 - 26.37 ve

3.39×10^{-3} - 1.48 1/sa olarak bulunmuştur (Tablo 3). Beklendiği gibi en yüksek k değeri 70°C'de elde edilmiş ve en yüksek termal ölüm en yüksek sıcaklıkta gözlenmiştir. Bu sonuçlar literatür sonuçları [26, 40, 42, 48] ile uyumludur. Kriyoprotektan kullanımı k değerinin önemli düzeyde azalmasını ve dolayısıyla mikroorganizmaların termal direncinin etkili bir şekilde artmasını sağlamıştır.

Tablo 3. Kriyoprotektansız ve optimum kriyoprotektan formülasyonu ile kurutulan *W. cibaria* N9 kültürünün farklı sıcaklıklardaki termal ölümü ve k (1/sa) değerleri

Table 3. Thermal death and k (1/h) values of *W. cibaria* N9 culture without cryoprotectant and dried with optimum cryoprotectant formulation at different temperatures

Sıcaklık (°C)	Kriyoprotektansız kültür		Dondurularak kurutulmuş kültür	
	Zaman (sa)	(N_0-N)	Zaman (sa)	(N_0-N)
50	0	0	0	0
	1	1.967±0.098	6	0.135±0.069
	2	2.521±0.13	12	0.303±0.093
	3	3.975±0.309	18	0.407±0.072
	4	TE	24	0.495±0.064
	8	TE	48	0.706±0.073
60	0	0	0	0
	0.5	2.595±0.206	1	0.121±0.016
	1	3.808±0.141	2	0.204±0.062
	1.5	5.028±0.203	3	0.281±0.051
	2	5.781±0.341	4	0.360±0.091
	3	TE	8	0.469±0.072
70	0	0	0	0
	0.08	1.399±0.019	0.08	0.069±0.006
	0.16	2.207±0.136	0.16	0.139±0.043
	0.24	3.033±0.194	0.24	0.217±0.036
	0.32	3.665±0.13	0.32	0.294±0.046
	0.64	TE	0.64	0.412±0.064
k değerleri (1/sa) (R^2)				
50	3.052 (0.959)		3.39×10^{-3} (0.927)	
60	6.661 (0.947)		0.135 (0.925)	
70	26.375 (0.977)		1.484 (0.945)	

TE: Tespit edilemedi. N_0 , ısıtma işlem öncesi başlangıç hücre sayısı (log kob/g); N , ısıtma işlem sonrası hücre sayısı (log kob/g).

Hızlandırılmış depolama testi sonuçları, dondurularak kurutulan hücrelerin 4 ve 25°C'deki stabilitesini tahmin

etmek için de kullanılmıştır. Bozulma hızının sıcaklığa bağlılığının ortaya konmasında en yaygın ve genel

olarak geçerli bir yöntem olan Arrhenius eşitliğinden (Eşitlik 3) yararlanılmıştır. Arrhenius denklemini elde etmek için hücrelere ait k değerlerinin \ln değerlerine ($\ln k$) karşılık $1/T(K)$ değerleri kullanılarak kriyoprotektansız ve kriyoprotektanlı liyofilize hücrelere ait Arrhenius grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 6-B). Şekil 6-B'den de görüldüğü üzere, sıcaklık ve hız sabiti arasında yüksek bir korelasyon elde edilmiştir ($R^2 > 0.969$). Optimum kriyoprotektan kullanılarak liyofilize edilen *W. cibaria* N9 kültürünün buzdolabı ve oda sıcaklığındaki raf ömürleri Şekil 6-B'de verilen denklem ve literatür çalışmalarından yola çıkarak ekşi hamur üretiminde kullanılacak hücre canlılığının 9 log kob/g civarı olması gerektiği kabulünden hareketle hesaplanmıştır. Dondurarak kurutma sonrası 9.7 log kob/g civarında canlı hücre içeren liyofilize kültürün buzdolabı ve oda koşullarında raf ömrü sırası ile 3655.6 ay ve 18 ay olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, kullanılan optimum kriyoprotektan formülasyonunun dondurarak kurutma ve depolama sırasında *W. cibaria* N9'un stabilize edilmesi için yeterli olduğunu göstermiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada, ekşi hamurlardan izole edilerek tanımlanmış ve teknolojik/endüstriyel özelliklerine göre ekşi hamur starteri olarak kullanıma potansiyel bulunan *W. cibaria* N9 suşunun dondurarak kurutma aşamasında canlılık kaybının minimum olması için kullanılması gereken uygun kriyoprotektan formülasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Optimizasyon çalışması sonucunda optimum kriyoprotektan formülasyonu %5.65 YST, %20 laktoz ve %9.38 sükroz şeklinde belirlenmiştir. Kullanılan kriyoprotektanlar arasında laktozun hem dondurma hem de dondurarak kurutma aşamasında canlılık üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak üretilen kültürün canlılık oranının >99.7 olduğu ve *W. cibaria* N9 için kriyoprotektan formülasyonunun optimizasyonunda Box-Behnken tasarımının kullanılmasının uygun olduğu saptanmıştır. Optimum kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak üretilen kültürün yüksek canlı hücre sayısı yanında kabul edilebilir fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu ve depolama süresince canlılık kaybının düşük olduğu da belirlenmiştir. Ayrıca, hızlandırılmış raf ömrü testi ile kriyoprotektan kullanılarak üretilen kültürün oda koşullarında 18 ay depolama sonunda ekşi hamur üretimi için beklenen fermantasyon özelliklerini gösterebileceği de belirlenmiştir. Sonuç olarak Tip II ekşi maya hamur üretimi için starter kültür olarak önerilen *W. cibaria* N9'un %5.65 YST, %20 laktoz ve %9.38 sükroz'dan oluşan kriyoprotektan formülasyonu kullanılarak yüksek canlılıkta liyofilize edilebileceği ve teknolojik/endüstriyel özellikleri kabul edilebilir düzeye sahip olarak oda koşullarında 18 ay, buzdolabı sıcaklığında 3655.6 ay depolanabileceği ortaya konulmuştur.

YAZAR KATKILARI

Latife Betül GÜL ve Osman GÜL, analizlerin takibi, değerlendirilmesi ve yazımını sağlamıştır. Enes

DERTLİ, *W. cibaria* N9 suşunun temin ve sonuçların değerlendirilmesi, Ahmet Hilmi ÇON, araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesini sağlamıştır. Yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamışlardır.

TEŞEKKÜR

Latife Betül GÜL'ün doktora tezinin bir kısmı olan bu çalışmayı TOVAG 117O159 proje numarası ile maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M.T., Sağdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 116-124.
- [2] Arendt, E.K., Ryan, L.A., Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24(2), 165-174.
- [3] Corona, O., Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Nasca, A., Francesca, N., Martorana, A., Moschetti, G., Settanni, L. (2016). Industrial application of selected lactic acid bacteria isolated from local semolinas for typical sourdough bread production. *Food Microbiology*, 59, 43-56.
- [4] Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., Gobbetti, M. (2012). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1251-1264.
- [5] Pontonio, E., Nionelli, L., Curiel, J.A., Sadeghi, A., Di Cagno, R., Gobbetti, M., Rizzello, C.G. (2015). Iranian wheat flours from rural and industrial mills: Exploitation of the chemical and technology features, and selection of autochthonous sourdough starters for making breads. *Food Microbiology*, 47, 99-110.
- [6] Mantzourani, I., Plessas, S., Odatzidou, M., Alexopoulos, A., Galanis, A., Bezirtzoglou, E., Bekatorou, A. (2019). Effect of a novel *Lactobacillus paracasei* starter on sourdough bread quality. *Food Chemistry*, 271, 259-265.
- [7] Reale, A., Di Renzo, T., Zotta, T., Preziuso, M., Boscaino, F., Ianniello, R., Storti, L.V., Tremonte, P., Coppola, R. (2016). Effect of respirative cultures of *Lactobacillus casei* on model sourdough fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 622-629.
- [8] Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., Arendt, E.K. (2016). Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 86-94.
- [9] Velly, H., Fonseca, F., Passot, S., Delacroix-Buchet, A., Bouix, M. (2014). Cell growth and resistance of

- Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), 729-740.
- [10] Stefanello, R.F., Nabeshima, E.H., Iamanaka, B.T., Ludwig, A., Fries, L.L.M., Bernardi, A.O., Copetti, M.V. (2019). Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, 115, 90-94.
- [11] Keivani Nahr, F., Mokarram, R.R., Hejazi, M.A., Ghanbarzadeh, B., Sowti Khiyabani, M., Zoroufchi Benis, K. (2015). Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance the viability of freeze dried *Lactobacillus plantarum* using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 326-332.
- [12] Nakamura, T., Takagi, H., Shima, J. (2009). Effects of ice-seeding temperature and intracellular trehalose contents on survival of frozen *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Cryobiology*, 58(2), 170-4.
- [13] Higl, B., Kurtmann, L., Carlsen, C.U., Ratjen, J., Fo, P., Skibsted, L.H., Kulozik, U., Risbo, J. (2007). Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnology Progress*, 23, 794-800.
- [14] Lu, Y., Huang, L., Yang, T., Lv, F., Lu, Z. (2017). Optimization of a cryoprotective medium to increase the viability of freeze-dried *Streptococcus thermophilus* by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 92-97.
- [15] Niu, X., Deng, L., Zhou, Y., Wang, W., Yao, S., Zeng, K. (2016). Optimization of a protective medium for freeze-dried *Pichia membranifaciens* and application of this biocontrol agent on citrus fruit. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 234-243.
- [16] Passot, S., Cenard, S., Douania, I., Tréleá, I.C., Fonseca, F. (2012). Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 132(4), 1699-1705.
- [17] Peiren, J., Buyse, J., De Vos, P., Lang, E., Clermont, D., Hamon, S., Begaud, E., Bizet, C., Pascual, J., Ruvira, M.A., Macian, M.C., Arahal, D.R. (2015). Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), 3559-3571.
- [18] Shu, G., Wang, Z., Chen, L., Wan, H., Chen, H. (2018). Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 70-76.
- [19] Khoramnia, A., Abdullah, N., Liew, S.L., Sieo, C.C., Ramasamy, K., Ho, Y.W. (2011). Enhancement of viability of a probiotic *Lactobacillus* strain for poultry during freeze-drying and storage using the response surface methodology. *Animal Science Journal*, 82(1), 127-135.
- [20] Yu, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Liao, M., Li, B., Xue, L. (2017). Optimization of protectant, salinity and freezing condition for freeze-drying preservation of *Edwardsiella tarda*. *Journal of Ocean University of China*, 16(5), 831-839.
- [21] Ambros, S., Hofer, F., Kulozik, U. (2018). Protective effect of sugars on storage stability of microwave freeze-dried and freeze-dried *Lactobacillus paracasei* F19. *Journal of Applied Microbiology*, 125(4), 1128-1136.
- [22] Ren, H., Zentek, J., Vahjen, W. (2019). Optimization of production parameters for probiotic *Lactobacillus* strains as feed additive. *Molecules*, 24(18), 3286.
- [23] Meroth, C.B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M.J., Hammes, W.P. (2003). Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology*, 69(1), 475-482.
- [24] Carvalho, A.S., Joana Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P. (2002). Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters*, 24, 1587-1591.
- [25] Yao, M., Wu, J., Li, B., Xiao, H., McClements, D.J., Li, L. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus salivarius* Li01 for enhanced storage viability and targeted delivery to gut microbiota. *Food Hydrocolloids*, 72, 228-236.
- [26] Tsen, J.H., Lin, Y.P., Huang, H.Y., King, V.A. (2007). Accelerated storage testing of freeze-dried immobilized *Lactobacillus acidophilus*-fermented banana media. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31, 688-701.
- [27] Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N., Vinas, I. (2000). Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 793-800.
- [28] Schwab, C., Vogel, R., Ganzle, M.G. (2007). Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology*, 55(2), 108-114.
- [29] Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14(10), 835-847.
- [30] Joglekar, A.M., May, A.T. (1987). Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World*, 32(12), 857-868.
- [31] Albadran, H.A., Chatzifragkou, A., Khutoryanskiy, V.V., Charalampopoulos, D. (2015). Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. *Food Research International*, 74, 208-216.
- [32] Meng, X.C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Daly, C., Ross, R.P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106(4), 1406-1416.

- [33] Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43(3), 907-914.
- [34] Li, B., Tian, F., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. (2011). Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 609-616.
- [35] Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15(4), 399-409.
- [36] Chen, H., Chen, S., Li, C., Shu, G. (2015). Response surface optimization of lyoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus* during vacuum freeze-drying. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(5), 463-475.
- [37] Passot, S., Gautier, J., Jamme, F., Cenard, S., Dumas, P., Fonseca, F. (2015). Understanding the cryotolerance of lactic acid bacteria using combined synchrotron infrared and fluorescence microscopies. *Analyst*, 140(17), 5920-5928.
- [38] Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P. (2003). Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Dairy Journal*, 13(6), 463-468.
- [39] Botrel, D.A., de Barros Fernandes, R.V., Borges, S.V., Yoshida, M.I. (2014). Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. *Food Research International*, 62, 344-352.
- [40] Gul, L.B., Gul, O., Yilmaz, M.T., Dertli, E., Con, A.H. (2020). Optimization of cryoprotectant formulation to enhance the viability of *Lactobacillus brevis* ED25: Determination of storage stability and acidification kinetics in sourdough. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(4), e14400.
- [41] Nag, A., Das, S. (2013). Effect of trehalose and lactose as cryoprotectant during freeze-drying, in vitro gastro-intestinal transit and survival of microencapsulated freeze-dried *Lactobacillus casei* 431 cells. *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 162-169.
- [42] Gul, L.B., Con, A.H., Gul, O. (2020). Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation. *Cryobiology*, 96, 122-129.
- [43] Savedboworn, W., Teawsomboonkit, K., Surichay, S., Riansa-Ngawong, W., Rittisak, S., Charoen, R., Phattayakorn, K. (2019). Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 795-805.
- [44] Gul, O., Atalar, I., Gul, L.B. (2019). Effect of different encapsulating agent combinations on viability of *Lactobacillus casei* Shirota during storage, in simulated gastrointestinal conditions and dairy dessert. *Food Science and Technology International*, 25(7), 608-617.
- [45] Gul, O., Dervisoglu, M. (2020). Optimization of spray drying conditions for microencapsulation of *Lactobacillus casei* Shirota using response surface methodology. *European Food Science and Engineering*, 1(1), 1-8.
- [46] Behboudi-Jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I. (2013). Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology*, 31(11), 1274-1283.
- [47] Savedboworn, W., Kerdwan, N., Sakorn, A., Charoen, R., Tipkanon, S., Pattayakorn, K. (2017). Role of protective agents on the viability of probiotic *Lactobacillus plantarum* during freeze drying and subsequent storage. *International Food Research Journal*, 24(2), 787-794.
- [48] Kim, M., Nam, D.G., Kim, S.B., Im, P., Choe, J.S., Choi, A.J. (2018). Enhancement of viability, acid, and bile tolerance and accelerated stability in lyophilized *Weissella cibaria* JW15 with protective agents. *Food Science and Nutrition*, 6(7), 1904-1913.
- [49] King, V.A., Lin, H.J., Liu, C.F. (1998). Accelerated storage testing of freeze-dried and controlled low-temperature vacuum dehydrated *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 44, 161-165.