

## **LACTOBACILLUS SANFRANCISCENSIS'İN GELİŞMESİNDE ETKİLİ BİYOPROSES PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ VE OPTİMİZASYONU**

**Filiz Döner, Yekta Göksungur\***

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir, Türkiye

Geliş / Received: 14.07.2017; Kabul / Accepted: 13.10.2017; Online baskı / Published online: 15.11.2017

Döner, F., Göksungur, Y. (2017). *Lactobacillus sanfranciscensis*'in gelişmesinde etkili biyoproses parametrelerinin belirlenmesi ve optimizasyonu. *GIDA* (2017) 42 (6): 666-675 doi: 10.15237/gida.GD17063

### **Öz**

Son yıllarda, eski bir ekmeğin üretim metodu olan ekşi hamur ekmeğine yönelik talep artmıştır. *Lactobacillus sanfranciscensis*, heterofermantatif laktik asit bakterisidir ve maltozu kullanarak yüksek miktarlarda laktik asit ve asetik asit üreterek hamurun ekşimesine sebep olmaktadır. Bu çalışmada, farklı parametrelerinin *L. sanfranciscensis*'in gelişmesi üzerine etkisi incelenmiştir. En uygun azot kaynağı olarak maya ekstraktı, en uygun karbon kaynağı ise, maltoz olarak belirlenmiştir. En yüksek optik yoğunluk değerine fermantasyonun 48. saatinde ulaşılmıştır. pH, maltoz, maya ekstraktı ve Tryptic Soy Broth konsantrasyonlarının bakteri gelişimine etkisi incelenmiş ve bu parametrelerin optimum değerleri sırasıyla pH 6.5, %2 (w/v), %1.7 (w/v), %0.6 (w/v) olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullar altında maksimum optik yoğunluk değeri  $1.120 \pm 0.007$  (biyokütle konsantrasyonu:  $1.818 \pm 0.002$  g/L) olarak bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Lactobacillus sanfranciscensis*, starter kültür, optimizasyon, optik yoğunluk, azot kaynağı.

## **DETERMINATION AND OPTIMIZATION OF THE BIOPROCESS PARAMETERS EFFECTING GROWTH OF *LACTOBACILLUS SANFRANCISCENSIS***

### **Abstract**

In recent years, there is an increasing demand for sourdough bread, which is one of the oldest methods of bread production. *Lactobacillus sanfranciscensis* is a heterofermentative lactic acid bacteria which produce large amounts of lactic acid and acetic acid from maltose and thus it is responsible for souring activity in sourdough. In this study, the effect of different cultivation parameters on the growth of *L. sanfranciscensis* has been evaluated. Maximum optical density was obtained at the 48<sup>th</sup> hour of the fermentation. Yeast extract was determined as the most appropriate nitrogen source and maltose was determined as the most appropriate carbon source. The optimum levels of pH, maltose, yeast extract and Tryptic Soy Broth were found as pH 6.5, 2% (w/v), 1.7% (w/v), 0.6% (w/v), respectively. Under optimized conditions, the optical density of  $1.120 \pm 0.007$  was obtained which corresponds to a biomass dry weight of  $1.818 \pm 0.002$  g/L.

**Keywords:** *Lactobacillus sanfranciscensis*, starter culture, optimization, optical density, nitrogen source

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ yekta.goksungur@ege.edu.tr

☎ (+90) 232 311 3027 /3027

☎ (+90) 232 342 7592

## GİRİŞ

Ekmek, dünyada en çok tüketilen gıda maddelerindendir. İçerdiği karbonhidrat, protein, diyet lifi ve çeşitli vitaminler ile önemli bir besin kaynağı olmasının yanı sıra; diğer gıdalara göre ucuz ve doyurucu olması sebebiyle tercih edilmektedir. Son yıllarda, tüketici talebinin koruyucu madde içeriği düşük, doğal ürünler yönünde olduğu belirlenmiştir. Ekmek çeşitlerinden bir tanesi olan ekşi hamur ekmeği, günümüzde fazla talep edilen ekmek ürünlerinden birisidir (Göçmen, 2001; Hendek-Ertop ve Hayta, 2016).

Ekşi hamur ekmeği, geleneksel olarak üretimi yıllardır devam eden fermente bir gıda ürünüdür. Özellikle zengin aromatik özellikleri ve daha uzun raf ömrü sebebiyle tercih edilmektedir. Ekmeğin kalitesini etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Ekşi hamurun mikroflorası bunlardan bir tanesidir. Ekşi hamur; un (buğday, pirinç, çavdar gibi) ile sudan meydana gelen hamurda, laktik asit bakterileri (LAB) ve mayaların metabolik aktivitesi sonucu oluşan bir ürün olarak tanımlanmaktadır (Vuyst ve Neysens, 2005; Ercolini vd., 2013). Ekşi hamur ekmeği üretiminde, fermantasyon işlemi boyunca meydana gelen bileşenler, ekmeğin besin değerini arttırmaktadır. Ayrıca, iyi bir fermantasyon işlemi yüksek hacimli, aromatik açıdan zengin, homojen ve tercih edilebilirliği yüksek ekmek iç yapısı meydana gelmesine ve raf ömrünün uzatılmasına katkı sağladığından önem arz etmektedir (Gobbetti vd., 2016).

Ekşi hamurun fermantasyonu için çeşitli yöntemler tercih edilmektedir. Geleneksel yöntemde, hamurun kendi doğal mikroflorasıyla spontan fermantasyon gerçekleştirilmektedir. Ancak bu yöntemde, fermantasyon işleminin kontrolsüz gerçekleşmesi sebebiyle, standart ürün eldesinde problem yaşanmakta, ürünün dokusal ve yapısal özelliklerinde istenmeyen kusurlar meydana gelebilmektedir. Karşılaşılan bu problemler sebebiyle, araştırmacılar laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanımını incelemişlerdir. Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanımı istenilen kalite ve miktarda ürün elde edilmesine, fermantasyon işleminin kontrollü gerçekleşmesine, ekmeğin iç yapısının

iyileşmesine ve zengin aromatik yapının gelişmesine katkı sağlamaktadır (Paramithiotis vd., 2005; Decock ve Cappelle, 2005; Leroy ve De Vuyst, 2004).

Ekşi hamur fermantasyonunda pek çok mikroorganizma beraber görev almaktadır ve hakim mikroflorada mayalar ve laktik asit bakterileri (LAB) baskın olarak bulunmaktadır. Hamurun yapısında 50'den fazla laktik asit bakterisi suşu ve 20'den fazla maya suşu bulunmaktadır. LAB'lerinden en çok *Lactobacillus*, mayalardan ise en çok *Saccharomyces* ve *Candida* suşları bulunmaktadır (Rehman, 2006; De Vuyst vd., 2014). Laktik asit bakterilerinden homofermantatif olanlar şekeri fermente ederek laktik asit oluştururken; heterofermantatif LAB'leri laktik asit, CO<sub>2</sub>, etil alkol, asetik asit, aromatik ve uçucu bileşikler de üretmektedir (Göçmen, 2001; Hammes vd., 2005).

*L. sanfranciscensis*, *Lactobacillus sanfransisco* olarak da bilinen ve genellikle çavdar veya buğday unu kullanılarak üretilen ekşi hamurlardan izole edilen gram pozitif, spor oluşturmayan, çubuk şeklinde ve mikroaerofilik bir laktik asit bakterisidir (Weiss ve Schillinger, 1984). Bu bakteri ekşi hamur yapısında bulunan en önemli LAB'lardan biridir. (Gobbetti ve Corsetti, 1997). 2-4 µm boyunda ve 0.6-0.8 µm çapındadır; optimum gelişme sıcaklığı 30°C olmakla beraber 13°C-40°C ortam sıcaklığında da gelişebilmektedir (Neubauer vd., 1994; Kline ve Sugihara, 1971).

Bu çalışma kapsamında *L. sanfranciscensis*'in gelişimi için etkili olan biyoproses koşullarının (karbon kaynağı, Tryptic Soy Broth miktarı, azot kaynağı ve pH) optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve belirlenen optimum koşullarda *L. sanfranciscensis*'in üreme kinetiği incelenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin, *L. sanfranciscensis*'in starter kültür olarak kullanılacağı diğer çalışmalara yol göstermesi hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Mikroorganizma ve Besiyerlerinin

#### Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan *L. sanfranciscensis* DSM 20451 suşu Pak Gıda San. Tic. Ltd. Şti. (PAKMAYA)'nden Doç. Dr. Mustafa TÜRKER

tarafından temin edilmiştir. *L. sanfranciscensis* aşağıda tarif edilen stok kültür ortamında +4°C'de saklanmıştır. Kültürler kullanılmadan önce taze besin ortamına ekim yapılarak 30°C'de 1 gün geliştirilmiştir. Stok kültürü ve aşı kültürü ortamı Kline ve Sugihara (1971)'dan modifiye edilen ortam olup bileşiminde (%w/v); %2 maltoz (Merck, Almanya), %1.3 maya ekstraktı (Applichem, Almanya), %0.6 Tryptic Soy Broth (Merck, Almanya), %0.03 (v/v) Tween 80 (Merck, Almanya), bulunmaktadır. Ortam pH'sı 1 M HCl kullanılarak pH 5.6'ya ayarlanmıştır.

#### Aşı Kültürünün Hazırlanması

Her üretim öncesinde 30°C'de 1 gün süreyle geliştirilen stok kültürlerden, 50 mL aşı kültürü ortamına %5 (v/v) oranında ekim yapılmıştır. Aşı kültürü 30°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda aşı kültüründen fermantasyon ortamına %5 (v/v) oranında ekim yapılmıştır. Denemelerde anaerobik ortam yaratmak ve oksijeni uzaklaştırmak için 50 mililitrelik erlenler kullanılmış olup, fermantasyon ortamları 50 mL'lik erlenler içerisinde 50 mL ortam olacak şekilde hazırlanmıştır. Fermantasyon ortamının içeriği (w/v): %2 maltoz, %1.3 maya ekstraktı, %0.6 Tryptic Soy Broth'dan oluşmaktadır (pH:5.6) (Kline ve Sugihara (1971)).

#### Biyoproses Parametrelerinin Belirlenmesi

Değişik biyoproses parametrelerinin optik yoğunluk olarak hücre gelişimine etkisinin incelenmesi için deneyler yapılmıştır. Bu amaçla farklı karbon kaynaklarının, farklı azot kaynaklarının, maya ekstraktı ve Tryptic Soy Broth konsantrasyonunun, başlangıç ortam pH'sının bakterinin gelişimine etkisi incelenmiştir.

Maya ekstraktı konsantrasyonunun üremeye etkisini incelemek için %0.1, 0.7, 1.3, 1.7, 2.3, 2.7, 2.9, 3.1 (w/v) konsantrasyonlarında maya ekstraktı içeren üreme ortamı hazırlanmış ve 48 saat fermantasyon sonunda optik yoğunluk belirlenmiştir.

Farklı Azot kaynağının etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda maya ekstraktı (Applichem, Almanya), pepton (BD, Fransa), tripton (Applichem, Almanya), mısır ıslatma suyu (Sigma Aldrich, Amerika) ve malt

çimi (Türk Tuborg Bira ve Malt Sanayi Tic. A.Ş., İzmir) kullanılmıştır. Denenen azot kaynakları, önceden optimum olduğu belirlenen % 1.7 maya ekstraktı ile eşit azot temelinde kullanılmıştır. Bu amaçla azot oranları belirlenen maddelerin % 1.7 maya ekstraktı ile aynı oranda ortama azot verecek miktarları fermantasyon ortamına ilave edilmiştir. Çizelge 1'de denenen azot kaynakları, içerdikleri azot oranları (Göksungur, 1998) ve fermantasyon ortamına ilave edilen miktarları verilmiştir. Azot kaynakları fermantasyon ortamının rengini değiştirdiği için optik yoğunluk değeri ölçülememiştir. Bu sebeple 48 saatlik fermantasyon sonunda fermantasyon ortamından örnek alınarak canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

Azot Kaynağı <i>Nitrogen Source</i>	Azot (%) <i>Nitrogen (%)</i>	Ortama İlave Edilen Miktar (%) <i>The amount added into the medium formulation (%w/v)</i>
Pepton <i>Peptone</i>	14.00	1.19
Maya ekstraktı <i>Yeast extract</i>	9.80	1.70
Tripton <i>Tryptone</i>	12.70	1.31
Malt çimi <i>Malt sprout</i>	5.29	3.14
Mısır ıslatma suyu <i>Corn steep liquor</i>	6.44	2.58

Çizelge 1. Fermantasyon ortamında kullanılan azot kaynakları (Göksungur,1998).

Table 1. The nitrogen sources used in the fermentation medium (Göksungur,1998).

Karbon kaynağının etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda maltoz (Merck, Almanya), laktöz (Merck, Almanya), fruktoz (Merck, Almanya), sakkaroz (Merck, Almanya), glukoz (Merck, Almanya) ve nişasta (Merck, Almanya) kullanılmıştır. 48 saat sonunda fermantasyon ortamlarından örnek alınarak optik yoğunluk değeri ölçülmüştür. Optimum maltoz miktarının belirlenmesi amacıyla %1, 2, 3, 4, 5, 6

(w/v) konsantrasyonlarında maltoz içeren fermantasyon ortamları hazırlanmıştır. 6., 24. ve 48 saat sonunda fermantasyon ortamlarından örnek alınarak optik yoğunluk değerleri ölçülmüştür.

Tryptic Soy Broth konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi amacıyla 4 farklı konsantrasyonda (%0.3, 0.6, 0.9, 1.2 (w/v)) fermantasyon ortamına ilave edilmiştir ve 48 saat sonunda fermantasyon ortamlarından örnek alınarak optik yoğunluk değeri ölçülmüştür.

Başlangıç ortam pH'sının etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı başlangıç ortam pH'larına sahip (pH: 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) fermantasyon ortamları hazırlanmıştır ve fermantasyon ortamlarından 6., 24.ve 48. saatlerde örnek alınarak optik yoğunluk ve pH değerleri ölçülmüştür.

#### **Biyokütle Miktarı**

Fermantasyon ortamından alınan örnekler, 7500 rpm (5340g) değerinde 4°C'de 20 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutularak hücreler fermantasyon ortamından ayrılmıştır ve saf su ile iki defa yıkanmıştır. Yıkanan hücreler 80°C'de sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur (Bekers vd., 2002).

Spesifik üreme hızının belirlenmesi için logaritmik fazda olan bakteriler kullanılmış ve biyokütle miktarının süreye göre değişimi Göksungur (2011)'de belirtilen metoda göre incelenerek spesifik üreme hızı hesaplanmıştır.

#### **Optik Yoğunluğun Belirlenmesi**

Hücrelerin optik yoğunluğunu kontrol etmek amacıyla fermantasyon sonrasında 1.5 mL örnek alınarak Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk (O.D.<sub>600nm</sub>) değeri ölçülmüştür. Optik yoğunluk ile biyokütle arasında aşağıdaki korelasyon denkleminin belirlenmesi amacıyla 600 nm'deki farklı O.D. değerlerine karşılık gelen biyokütle miktarları ölçülmüştür ve biyokütle-optik yoğunluk grafiği çizilmiştir. Korelasyon grafiği kullanılarak aşağıdaki denklem elde edilmiş (1) ve optik yoğunluk değerine karşılık gelen hücre

konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılmıştır (Jaapar vd. 2011).

$$\text{Biyokütle (g/L)} = 1.3924 * \text{optik yoğunluk} + 0.1715 \quad (1)$$

#### **Laktik Asit Bakterisi Sayımı**

Hücre sayısının belirlenmesi için fermantasyon sonunda üretim ortamlarından aseptik koşullarda örnek alınarak %0.1'lik peptonlu su kullanılarak seri dilüsyonlar elde edilmiştir. Seri dilüsyonlardan 1 mL alınarak çift tabakalı dökme plak yöntemine göre Sour Dough Bacterium (SDB) agara ekim yapılmıştır. Bu yöntemde besiyeri iki kat halinde dökülmüştür. Katılaştıran besiyerinde 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir ve sonuç koloni oluşturan birim/mL (KOB/mL) olarak verilmiştir (Ünlütürk ve Turantaş, 2002).

#### **pH**

Örneklerde pH değerleri, pH metre (WTW Series pH 720) ile belirlenmiştir. Cihazın kalibrasyonu düzenli aralıklarla standart pH tampon çözeltileri ile yapılmıştır.

Bütün denemeler 2 tekrar, analizler ise 3 paralel halinde yapılmış ve standart sapma hesaplandığında sonuçların % 95 güven aralığı içerisinde kaldığı belirlenmiştir.

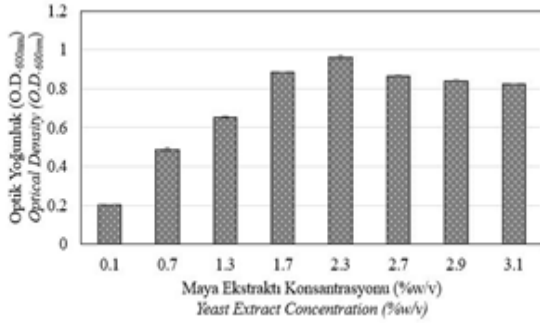
#### **SONUÇ VE TARTIŞMA**

##### **Maya Ekstraktı Konsantrasyonunun *L. sanfranciscensis*'in Gelişimi Üzerine Etkisi**

Laktik asit bakterileri gelişebilmeleri için nükleotitler, aminoasitler ve vitaminler gibi kompleks organik maddelere ihtiyaç duyarlar. Laktik asit üretiminde maya ekstraktı bakterilerin kompleks besin maddeleri ihtiyacını karşılamak için en çok kullanılan azot kaynağıdır (Göksungur, 1998).

Azot kaynağı olarak seçilen maya ekstraktının optimum konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 8 farklı maya ekstraktı konsantrasyonu (%0.1, 0.7, 1.3, 1.7, 2.3, 2.7, 2.9, 3.1 (w/v)) fermantasyon ortamına ilave edilmiştir. Çalışma sonucunda % 2.3 (w/v) maya ekstraktı içeren ortamda en yüksek O.D.<sub>600nm</sub> değerine (0.961±0,007) ulaşılmıştır (Şekil 1). Şekil 1'de de

görüldüğü gibi en yüksek optik yoğunluk değeri % 2.3 maya ekstraktı kullanıldığında elde edilmesine rağmen, % 1.7 maya ekstraktı konsantrasyonu ile de benzer bir optik yoğunluk değeri ( $0.886 \pm 0.0014$ ) elde edilmiştir. Maya ekstraktı iyi bir azot kaynağı olmasına rağmen pahalı bir maddedir ve yüksek miktarlarda kullanılması maliyeti arttırmaktadır. Bu sebeple maya ekstraktı miktarının azaltılması önerilmektedir (Aeschlimann ve Von Stockar, 1990). Bu çalışma sonucunda optimum maya ekstraktı miktarı %2.3 (w/v) olarak belirlenmesine rağmen, iki optik yoğunluk değerleri arasındaki farkın önemli olmaması (%95 güven aralığında) sebebiyle çalışmanın devamında proses maliyetini düşürmek amacıyla %1.7 (w/v) konsantrasyonunda maya ekstraktı kullanılmıştır.



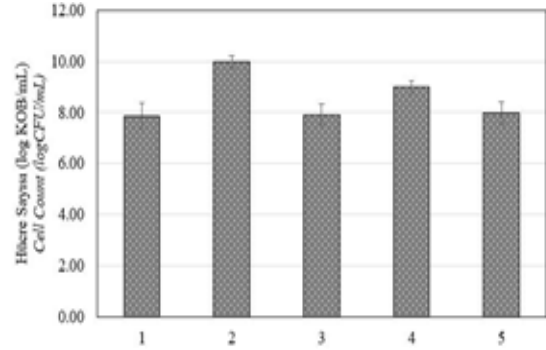
Şekil 1. Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%2 Maltoz, %0.6 Tryptic Soy Broth, pH 5.6).

Figure 1. Effect of different yeast extract concentrations on growth of *L. sanfranciscensis* (Maltose 2%, Tryptic Soy Broth 0.6 %, pH 5.6).

#### Farklı Azot Kaynaklarının *L. sanfranciscensis*'in Gelişimi Üzerine Etkisi

Çalışmada farklı azot kaynaklarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu, pepton, tripton malt çimi kullanılmıştır. Şekil 2'de farklı azot kaynaklarının kullanılması sonucunda elde edilen hücre sayısı verilmiştir. Değişik azot kaynaklarının kullanıldığı denemelerde, hazırlanan ortamların bulanıklığı farklı olduğu için optik yoğunluk ile hücre gelişimi ölçülemedi, bunun yerine çift tabakalı dökme plak yöntemi ile hücre sayısı belirlenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, en yüksek hücre sayısı ( $9.97 \log \text{KOB}/\text{mL} \pm 0.246$ ), azot

kaynağı olarak maya ekstraktı kullanıldığında elde edilmiştir. Malt çiminin azot kaynağı olarak kullanımında ise, ikinci en yüksek hücre sayısına ( $8.99 \log \text{KOB}/\text{mL} \pm 0.242$ ) ulaşılmıştır. Azot kaynağı olarak, pepton, tripton, mısır ıslatma suyu kullanılması sonucunda, hücre sayısının maya ekstraktı ve malt çimine kullanımına göre düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. Farklı azot kaynaklarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%2 Maltoz, %0.6 Tryptic Soy Broth, pH 5.6, 1: Pepton, 2: Maya ekstraktı, 3: Tripton, 4: Malt çimi, 5: Mısır ıslatma suyu).

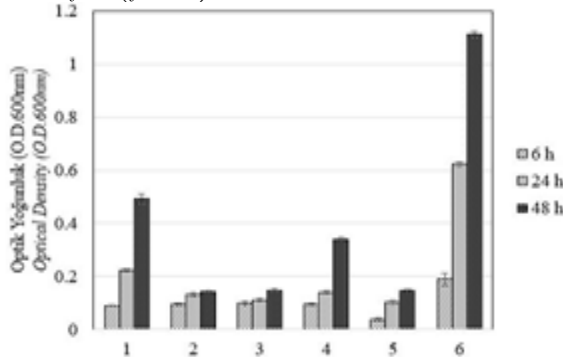
Figure 2. Effect of different nitrogen sources on growth of *L. sanfranciscensis* (Maltose 2%, Tryptic Soy Broth 0.6 %, pH 5.6, 1: Peptone, 2: Yeast extract, 3: Tryptone, 4: Malt sprout, 5: Corn steep liquor).

Maya ekstraktının yapısında peptitler ve üreme faktörleri (B grubu vitaminler ve oligonükleotidler) bulunmaktadır. Bu sebeple yapısında üreme faktörleri içermeyen pepton gibi azot kaynaklarına göre hücre gelişimini daha fazla stimüle etmektedir (Amrane ve Prigent, 1997). Literatürde *L. sanfranciscensis*'in gelişimi için hazırlanan fermantasyon ortamlarında malt çiminin azot kaynağı olarak kullanımına yönelik çalışmaya yazarların bilgisi dahilinde rastlanmamıştır. Bu sebeple bu çalışmanın, bira üretiminde yan ürün olarak açığa çıkan malt çiminin azot kaynağı olarak biyoproseslerde değerlendirilmesine yönelik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

#### Farklı Karbon Kaynaklarının *L. sanfranciscensis*'in Gelişimi Üzerine Etkisi

Fermantasyon ortamının farklı karbon kaynaklarıyla desteklenmesi amacıyla

fermantasyon ortamına glukoz, fruktoz, laktoz, sakkaroz, nişasta ve maltoz eklenmiştir. En yüksek O.D.<sub>(600nm)</sub> değeri (1.112±0.011) maltoz içeren ortamda elde edilmiştir. Maltoz haricinde glukoz ve sakkarozun da *L. sanfranciscensis* tarafından kullanılabilirliği görülmüştür ancak maltoza kıyasla daha düşük O.D.<sub>(600nm)</sub> değerleri (0.495±0.178 ve 0.441±0.005) elde edilmiştir. Fruktoz, laktoz ve nişasta içeren ortamlarda ise O.D.<sub>(600nm)</sub> değerlerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı karbon kaynaklarının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%0.6 Tryptic Soy Broth, maya ekstraktı %1.7, pH 6.5, 1: Glukoz, 2: Fruktoz, 3: Laktoz, 4: Sakkaroz, 5: Nişasta, 6: Maltoz ).

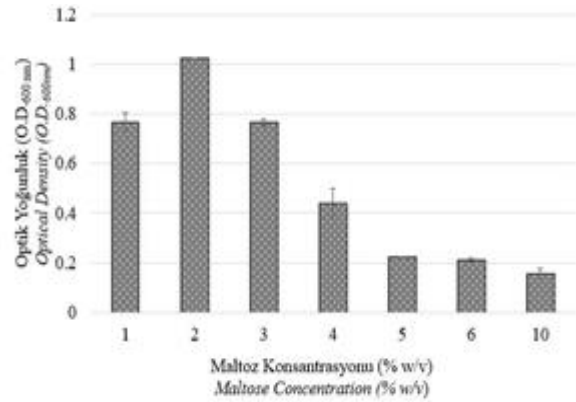
Figure 3. Effect of different carbon sources on growth of *L. sanfranciscensis* ( Tryptic Soy Broth 0.6 %, yeast extract 1.7%, pH 6.5, 1: Glucose, 2: Fructose, 3: Lactose, 4: Sucrose, 5: Starch, 6: Maltose ).

Farklı maltoz konsantrasyonları ile yapılan çalışmada ise en yüksek O.D.<sub>(600nm)</sub> değeri (1.025±0.0014) %2 maltoz içeren fermentasyon ortamında bulunmuştur. En düşük O.D.<sub>(600nm)</sub> değeri (0.157±0.019) ise %10 maltoz içeren ortamda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). Çalışmada elde edilen sonuçlar literatür ile tutarlılık göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda (Neubauer vd.,1994; Stolz vd., 1993), maltoz ve glukoz içeren ortamlarda *L. sanfranciscensis*'in metabolizmasındaki değişimler incelenmiştir. *Lactobacillus* tarafından üretilen maltoz fosforilaz enzimi ile ortamdaki maltoz kullanılarak glukoz ve glukoz-1-fosfat üretiminin ATP harcanmadan gerçekleştirildiği ifade edilmiş, üretilen bu bileşenlerin daha sonra metabolik faaliyetlerde kullanılması amacıyla hücre dışına gönderildiği

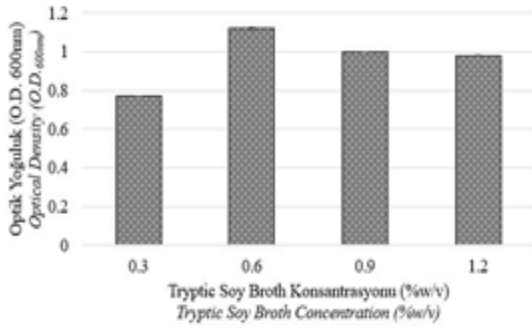
belirtilmiştir. Çalışmalar sonucunda, *L. sanfranciscensis*'in hücre dışı ortamda glukoz konsantrasyonunu artırdığı ve ürettiği glukozu, maltoz olmadığı durumlarda karbon kaynağı olarak kullandığını tespit etmişlerdir. Hücre dışı ortamda bulunan glukozun ekşi hamur gibi maltoz içeriği yüksek ortamlarda maltozu rekabetçi mikroorganizmalardan koruduğu ve bu sayede ekşi hamurun mikrobiyotasını etkilediği belirtilmiştir (Neubauer vd.,1994; Stolz vd., 1993).

### Tryptic Soy Broth Miktarının *L. sanfranciscensis*'in Gelişimi Üzerine Etkisi

Tryptic Soy Broth konsantrasyonunun belirlenmesi için 4 farklı konsantrasyonda (%0.3, 0.6, 0.9, 1.2 (w/v)). Tryptic Soy Broth fermentasyon ortamına ilave edilmiştir (Şekil 5). En yüksek O.D.<sub>(600nm)</sub> değeri (0.114±0.008) %0.6 (w/v) konsantrasyonunda elde edilmiş ve bu miktarın üzerindeki konsantrasyonlarda O.D.<sub>(600nm)</sub> değerinin düştüğü belirlenmiştir. Tryptic Soy Broth özellikle zor gelişen mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Kline ve Sugihara (1971) yaptıkları çalışmada Trypticase'in *L. sanfranciscensis*'in gelişimini stimüle ettiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada kullanılan Tryptic Soy Broth yapısında bulunan Trypticase sebebiyle *L. sanfranciscensis*'in gelişimini stimüle etmektedir.



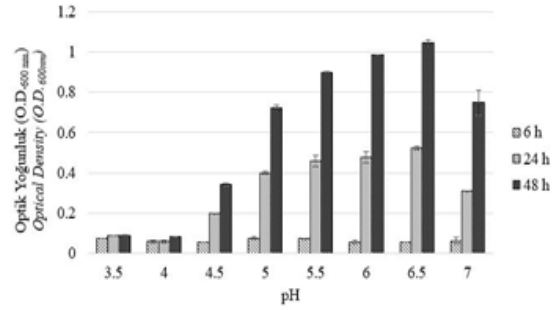
Şekil 4. Maltoz konsantrasyonunun *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%0.6 Tryptic Soy Broth, maya ekstraktı %1.7, pH 6.5).  
Figure 4. Effect of different maltose concentrations on growth of *L. sanfranciscensis* (Tryptic Soy Broth 0.6 %, yeast extract 1.7%, pH 6.5).



Şekil 5. Tryptic Soy Broth konsantrasyonunun *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%2 Maltoz, maya ekstraktı %1.7, pH 6.5).  
Figure 5. Effect of different Tryptic Soy Broth concentrations on growth of *L. sanfranciscensis* (Maltose 2%, yeast extract 1.7%, pH 6.5).

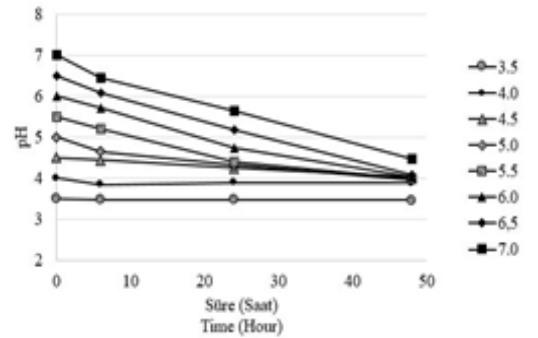
#### Başlangıç Ortam pH'sının *L. sanfranciscensis*'in Gelişimi Üzerine Etkisi

Başlangıç ortam pH'sı mikrobiyal mikrobiyal gelişimi etkileyen önemli parametrelerdendir (Messens vd., 2002). Başlangıç ortam pH'sının, *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi incelemek için farklı başlangıç ortam pH'larına sahip fermantasyon ortamları (pH: 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) hazırlanarak 0., 6., 24 ve 48. saatlerde O.D. (600nm) değerleri ölçülmüştür. Bu ölçüm sonuçlarına göre en yüksek O.D. (600nm) değeri (1.045±0.015) ortam pH'sının 6.5, en düşük O.D. (600nm) değeri (0.0825±0.002) ise başlangıç ortam pH'sının 3.5 olduğu koşullarda elde edilmiştir (Şekil 6). Bu çalışmada optimum pH değeri 6.5 olarak belirlenmesine rağmen literatürde LAB'lerinin gelişmesi için optimum pH aralığının pH 5.5-6.0 arasında olduğu belirtilmiştir (Kulp ve Lorenz, 2003; Toit ve ark., 2011). Kline ve Sugihara (1971) tarafından yapılan çalışmada da ekşi hamurdan izole edilen farklı *L. sanfranciscensis* suşları için optimum ortam pH'sının 5.6 olduğunu ifade edilmiştir. Ekşi hamurun başlangıç pH'sının 5.0-6.2 değerleri arasında olduğu bilinmektedir (Vuyst ve Neysens, 2005). Neubauer vd. (1994) çavdar unu kullanılarak üretilen ekşi hamurun başlangıç pH'sının yaklaşık olarak 5.6 olduğunu, bu sebeple çavdar ekşi hamurdan izole edilen *Lactobacillus*'ların yaklaşık pH 5.6 değerinde geliştiğini bildirmişlerdir (Neubauer, 1994).



Şekil 6: Başlangıç ortam pH'sının *L. sanfranciscensis*'in gelişimi üzerine etkisi (%2 Maltoz, %0.6 Tryptic Soy Broth, maya ekstraktı %1.7).  
Figure 6: Effect of initial medium pH on the growth of *L. sanfranciscensis* (Maltose 2%, Tryptic Soy Broth 0.6 %, yeast extract 1.7%).

Farklı başlangıç pH değerlerine sahip fermantasyon ortamlarının 48 saat boyunca pH değerlerinde meydana gelen değişim Şekil 7'de verilmektedir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, başlangıç pH'sının 3.5 olduğu ortamda 48 saat boyunca pH değerlerinde değişim gözlenmemiştir ve 48 saat sonunda pH değeri 3.5 olarak ölçülmüştür. En büyük pH değişiminin ise başlangıç ortam pH'sı 7.0 olan ortamda elde edildiği ve pH değerinin 48 saatte 7.0'dan 4.47'ye düştüğü belirlenmiştir. Ekşi hamurun pH'sının fermantasyon sonunda *L. sanfranciscensis* tarafından üretilen asetik asit ve laktik asit sebebiyle 4.3'e düştüğü belirtilmiştir (Kulp ve Lorenz, 2003).



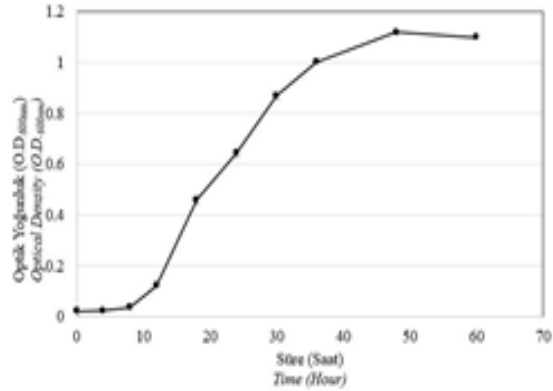
Şekil 7. Fermantasyon süresince ortam pH'sının değişimi (%2 Maltoz, %0.6 Tryptic Soy Broth, maya ekstraktı %1.7).  
Figure 7. Change of medium pH during fermentation (Maltose 2%, Tryptic Soy Broth 0.6 %, yeast extract 1.7%).

### L. sanfranciscensis'in Optimum Koşullardaki Üreme Kinetiği

L. sanfranciscensis'in gelişimine etki eden biyoproses parametreleri için optimum koşullar belirlendikten sonra optimum koşullarda (Maltoz: %2 (w/v); başlangıç ortam pH'sı: 6.5; maya ekstraktı miktarı %1.7 (w/v), Tryptic Soy Broth :%0.6 (w/v)) üreme kinetiği belirlenmiştir. Şekil 8'de belirtilen saat aralıklarında alınan örneklerde O.D.<sub>(600nm)</sub>, biyokütle miktarı ve hücre sayısı belirlenmiştir. Şekil 8'de verilen üreme kinetiği verileri incelendiğinde, lag faz'ın 12 saat sürdüğü ve 12. saatten itibaren O.D.<sub>(600nm)</sub> değerinde artış olduğu tespit edilmiştir. 12.-30. saat aralığında ise bakteri hücresi logaritmik faza girmiştir. 30. saatte logaritmik üreme evresi son ermiş ve 60. saate kadar hücrelerin durağan fazda olduğu belirlenmiştir. En yüksek O.D.<sub>(600nm)</sub> değerine ulaşıldığı 48. saatte O.D.<sub>(600nm)</sub> değeri  $1.120 \pm 0.007$ , biyokütle miktarı ise  $1.818 \pm 0.002$  g/L olarak korelasyon grafiği kullanılarak belirlenmiştir. Fermantasyonun başlangıcında hücre sayısı  $5.45 \times 10^7$  KOB/mL olarak belirlenmiş ve 48 saatte  $2.16 \times 10^{10}$  KOB/mL hücre sayısına ulaşılmıştır. L. sanfranciscensis için optimum koşullarda spesifik üreme hızı  $\mu = 0.0226 \text{ sa}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Neubauer vd. (1994) tarafından yapılan çalışmada kullanılan suşa ve ortamda bulunan karbon kaynağına göre lag faz süresinin farklılık gösterdiği belirtilmiştir. L. sanfranciscensis'in glukoz içeren ortama adaptasyonu uzun sürmekte ve bu sebeple lag faz 20 saat ile 150 saat arasında değişkenlik göstermektedir. Ancak maltoz içeren ortamda lag faz daha kısa sürmektedir. Bunun sebebi ise maltoz ve glukoz için farklı transport sistemleri kullanmasına bağlı olarak lag faz süresinin farklılık göstermesidir (Neubauer vd., 1994).

Çalışma kapsamında L. sanfranciscensis'in gelişimi için gerekli biyoproses parametrelerinin optimizasyon gerçekleştirilmiş ve optimum koşullarda yüksek miktarda hücre sayısı elde edilmiştir. Literatürde L. sanfranciscensis ile ilgili çalışmaların sayısı oldukça az olduğu görülmektedir ve özellikle son yıllarda L. sanfranciscensis'in gelişimini inceleyen hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma sayesinde farklı

azot, karbon kaynaklarının ve ortam pH'sının L. sanfranciscensis'in gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu sayede literatüre katkı sağlayarak L. sanfranciscensis'e ait literatürde daha fazla bilgi olmasına katkı sağlanmıştır. Deney sonuçlarına göre belirlenen optimum koşullar kullanılarak hazırlaması kolay ve yüksek miktarda canlı hücre sayısı elde edilmesini sağlayan bir besiyeri formülasyonu elde edilmiştir. Bu çalışma, L. sanfranciscensis'in gelişimi için farklı ortam formülasyonlarının oluşturulmasında ve bu bakteri ile yapılacak yeni çalışmalar için yol gösterici özellik taşımaktadır.



Şekil 8: Optimum koşullarda optik yoğunluk değerinin süreye göre değişimi (%2 Maltoz, %0.6 Tryptic Soy Broth, maya ekstraktı %1.7, pH 6.5).  
Figure 8. Variation of optical density value over time in optimum conditions (Maltose 2%, Tryptic Soy Broth 0.6 %, yeast extract 1.7%, pH 5.6).

### Teşekkür

Bu çalışma "Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi" tarafından 16-MÜH-115 numaralı BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.

### KAYNAKLAR

Aeschlimann, A., Von Stockar, U. (1990). The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 32:398–402, doi: 10.1007/BF00903772.

Amrane, A., Prigent, Y. (1997). Growth and lactic acid production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey: Influence of peptidic nitrogen deficiency. *J Biotechnol*, 55(1): 1–8, doi:10.1016/S0168-1656(97)00041-2.



- Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, A., Pankova, L. and Danilevich, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase, *Process Biochem*, 38:701-706, doi: 10.1016/S0032-9592(02)00189-9.
- De Vuyst, L., Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Technol*, 16:43-56, doi: 10.1016/j.tifs.2004.02.012.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiol*, 37:11-29, doi: 10.1016/j.fm.2013.06.002.
- Decock, P., Cappelle, S. (2005). Bread technology and sourdough technology. *Trends Food Sci Technol*, 16(1-3): 113-120, doi:10.1016/j.tifs.2004.04.012.
- Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Storia, A., Gobbetti, M., Di Cagno, R. (2013). Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Appl. Environ Microbiol*, 79 (24):7827-7836, doi: 10.1128/AEM.02955-13.
- Gobbetti, M., Corsetti, A. (1997). *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiol*, 14:175-187.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Cagno, R.D. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol*, 16:57-69, doi: 10.1016/j.tifs.2004.02.013.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., De Angelis, M. (2016). Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *Int J Food Microbiol*, 239:3-18, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.022.
- Göçmen, D. (2001). Ekşi hamur ve laktik asit starter kullanımının ekmekte aroma oluşumu üzerine etkileri. *GIDA*, 26(1):13-16.
- Göksungur, Y. (1998). Melastan laktik asit üretiminde farklı üretim tekniklerinin kullanılabilirliği ve ortam şartlarının optimizasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, İzmir, Türkiye, 155s.
- Göksungur, Y. (2011). *Reaction and fermentation kinetics in food engineering*. Sidaş Medya Ltd. Şti., İzmir, Türkiye, 143s. ISBN: 978-9944-5660-1-8.
- Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, J., Seitter, M.F.H., Vogelmann, S.A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci Technol*, 16: 4-11, doi: 10.1016/j.tifs.2004.02.010.
- Hendek Ertop, M., Hayta, M. (2016). Ekşi hamur fermantasyonunun ekmeği biyoaktif bileşenleri ve biyoyararlanım üzerindeki etkileri. *GIDA*, 41(2): 115-122, doi: 10.15237/gida.GD15053.
- Jaapar, S.Z.S., Ali, E., Kalil, S., Anuar, N. (2011). Effects of different initial pH, argon gas and nitrogen gas on cell growth and hydrogen production using *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol*, 1(1): 8-15, doi: 10.3923/bj.2011.8.15.
- Kline, L., Sugihara, T.F. (1971). Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl Microbiol*, 21 (1971):459-465.
- Kulp, K., Lorenz, K. (ed.), Wirtz, R.L., Stolz, P., Maloney, D.H., Foy, J.J., Martinez- Anaya-M.A., Kulp, K., Sugihara, T.F., Lorenz, K., Poitrenaud, B., Katina, K., Kerojoki, H. Valjakka, T.T, Bruemmer, J.M., Benedito, Carmen, Rosell, C.M. (2003). Handbook of sourdough Fermentations. Marcel Dekker Inc, New York, USA. 303p.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol*, 15: 67-78, doi:10.1016/j.tifs.2003.09.004.
- Messens, W., Neysens P., Vansielegheem, W., Vanderhoeven, J., De Vuyst, L. (2002). Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* dce 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Appl Environ Microbiol*, 63:1431-1435, doi: 10.1128/AEM.68.3.1431-1435.2002.
- Neubauer, H., Glaasker, E., Hammes, W.P., Poolman, B., Konings, W.I.L.N. (1994). Mechanism of maltose uptake and glucose excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. *J. Bacteriol*, 1(5): 3007-3012, doi: 0021-9193/94/\$04.00+0.

Paramithiotis, S., Chouliaras, Y., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G. (2005). Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochem*, 40:2813–2819, doi:10.1016/j.procbio.2004.12.021.

Rehman, S., Paterson, A., Piggott, J.R. (2006). Flavour in sourdough breads: a review. *Trends Food Sci Technol*, 17: 557-566, doi:10.1016/j.tifs.2006.03.006.

Stolz, P., Böcker, G., Vogel, R.F., Hammes, W.P. (1993). Utilisation of isolated from maltose and

glucose by sourdough *Lactobacilli* isolated from sourdough. *FEMS Microbiol Lett*, 109: 237-242.

Toit, M. D., Engelbreht, L., Lern, E., Krieger-Weber, S. (2011) *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures-an overview. *Food Bioprocess Technol*, 4:876-906, doi: 10.1007/s11947-010-0448-8.

Ünlütürk, A., Turantaş, F. (2002). Gıdaların mikrobiyolojik analizi, Meta Basım ve Matbaacılık İşleri, İzmir, Türkiye, 186s.

Weiss, N., Schillinger, U. (1984). *Lactobacillus sanfrancisco* sp. Nov., nom. Rev. *Syst Appl Microbiol*, 5: 230-232..