

**ATIK EKMEKLERİN HİDROLİZ
OPTİMİZASYONU VE HİDROLİZATLARIN
REOLOJİK KARAKTERİZASYONUN
BELİRLENMESİ**

Şeymanur Güneş

Yüksek Lisans Tezi

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ

2018

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ATIK EKMEKLERİN HİDROLİZ OPTİMİZASYONU VE
HİDROLİZATLARIN REOLOJİK KARAKTERİZASYONUNUN
BELİRLENMESİ**

Şeymanur GÜNEŞ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: YRD. DOÇ. DR. AHMET ŞÜKRÜ DEMİRCİ

TEKİRDAĞ-2018

Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. A. Şükrü DEMİRCİ danışmanlığında, Şeymanur GÜNEŞ tarafından hazırlanan "Atık Ekmeklerin Hidroliz Optimizasyonu ve Hidrolizatların Reolojik Karakterizasyonunun Belirlenmesi" isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Yrd. Doç. Dr. A.Şükrü DEMİRCİ

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. İbrahim PALABIYIK

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ömer Said TOKER

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ATIK EKMEKLERİN HİDROLİZ OPTİMAZASYONU VE HİDROLİZATLARIN REOLOJİK KARAKTERİZASYONUNUN BELİRLENMESİ

Şeymanur GÜNEŞ

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ

Ekmek tüketilmediğinde, hem miktar hem de ekonomik değer açısından gıda atıklarının ana kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Bu çalışmada atık ekmeklerin, fermentasyon proseslerinde değerli ürünlerin öncül maddeleri olan fermente edilebilir şekerlerin üretimi için biyokaynak olma potansiyeli araştırılmıştır ve bu doğrultuda; en yüksek fermente edilebilir şeker miktarı üretimi için optimum substrat, su ve enzim oranının belirlenmesi ve hidroliz boyunca sistemin reolojik davranışlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Atık ekmeklerin 2 aşamalı hidrolizi α -amilaz ve amilo glukozidaz enzimleri ile yanıt yüzey yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve substrat, su ve enzim oranı optimize edilmiştir. Hidroliz sırasında bayat ekmek solüsyonunun sabit akış viskozitesini araştırmak için paralel plaka geometrisine sahip olan Hybrid Rheometer-2 (TA Instruments) kullanılmıştır. Atık ekmeğin sıvılaştırma ve sakkarifikasyon aşamalarındaki enzimatik hidroliz koşullarını optimize ederek glikozun teorik olarak üretilebileceği maksimum değer %99'u elde edilmiştir. α -amilaz miktarının glukoz verimine tek başına etkisi önemsiz bulunmasına karşın, α -amilaz miktarının atık ekmek oranı ve glukoamilaz miktarı ile interaksyonunun glukoz verimi üzerine etkisi kayda değer bulunmuştur. Oluşturulmuş yanıt yüzey model grafiklerinde, çok açık bir şekilde kurutulmuş ekmeklerden %86 oranında glukoz veriminin (teorik olarak %99 dönüşüm) sadece minimum miktarda substrat konsantrasyonu ile elde edilebileceği görülmüştür. α -amilaz enziminin ilavesi ile ekmek-su karışımının viskozite ve Casson görünür akma geriliminde önemli oranda düşüş gözlemlenmiştir. Sakkarifikasyon aşaması boyunca, ekmek örneklerinin viskozitelerinde zamana bağlı olarak çok az değişim olmasına karşın, glukoz veriminde çok ciddi oranlarda artış gerçekleşmiştir. Biyoteknolojik ürünlerin endüstriyel ölçekte fizibil olarak üretilip üretilemeyeceği, kullanılan herhangi bir

katı hammaddenin yüksek konsantrasyonlardaki viskozitesinin düşük olmasına ve kolay işlenebilir olmasına bağlıdır. Çünkü bu durum; daha düşük başlangıç sermayesi, ısıtma ve diğer proses basamaklarında daha az enerji harcanmasını sağlamaktadır. Sonuçlar; atık ekmeklerin biyoteknolojik ürünlerin eldesinde biyokütle olarak değerlendirilmesinin, yüksek katı hammadde kullanılan proseslerde beklenen yüksek enerji tüketimi ve ekipmanların yıpranması gibi etkenleri azaltarak ekonomik açıdan da uygun bir hammadde olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: atık ekmek, enzimatik hidroliz, viskozite

2018, 63 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

OPTIMIZATION OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WASTE BREAD AND DETERMINATION OF RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION OF HYDROLYZATES

Şeymanur ÖZALP

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Main Science Division of Food Engineering

Supervisor: Assist Prof.Dr. Ahmet Şükrü DEMİRÇİ

When it is not consumed, bread presents a major source of food waste, both in terms of the amount and its economic value. Two aims of this research investigate waste bread potential of being a bioresource for the production of fermentable sugars which are precursors of valuable bio products by fermentation process: finding optimum substrate, water and enzyme ratio to produce the high amount of fermentable sugars and investigating the rheological behavior of the system during hydrolysis. Two stage waste bread hydrolysis was performed with enzymes α -amylase and amyloglucosidase and response surface methodology was used to optimize substrate, water and enzyme ratio. Discovery Hybrid Rheometer-2 (TA Instruments) fitted with a parallel-plate geometry was used to investigate steady flow viscosity of the slurry during hydrolysis. 99 % of theoretical maximum glucose yield, a main fermentable sugar, is achieved by optimizing enzymatic hydrolysis conditions of waste bread at liquefaction and saccharification stages. Just after the addition of α -amylase enzyme, substantial decrease is observed in viscosity and Casson apparent yield stress of the slurry. During saccharification stage, glucose yield increases dramatically while viscosity of the slurries is very low and does not change considerably. The results imply that utilizing high concentrations of waste bread as a feed stock to produce fermentation products of economic benefits without causing high power consumption, excessive wear on equipment, and reduced conversion which are generally expected consequences for high-solid processing.

Keywords: Waste bread, enzymatic hydrolysis, viscosity

2018, 63 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGE DİZİNİ.....	vii
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖNSÖZ	x
1.GİRİŞ	1
2.LİTARATÜR ÖZETİ	4
2.1. Gıda Atıkları.....	4
2.1.1.Ekmek İsrافی	7
2.2.Ekmek ve Ekmek Teknolojisi.....	12
2.2.1.Ekmek Yapımında Kullanılan Temel Hammadeler	13
2.2.1.1.Un	13
2.2.1.2.Su	14
2.2.1.3.Tuz	15
2.2.1.4.Maya.....	15
2.2.1.5.Diğer Katkı Maddeleri.....	16
2.2.2.Ekmek Yapım Teknolojisi.....	17
2.2.2.1.Yoğurma	17
2.2.2.2.Fermentasyon	17
2.2.2.3.Hamurun Şekillendirilmesi.....	18
2.2.2.4.Pişirme.....	18
2.3.Ekmeğin Bayatlaması ve Nişastanın Retrograsadyonu	18
2.4.Karbonhidratların Enzimatik Hidrolizasyonu	20
2.4.1.Enzimatik Hidroliz ve Asit Hidrolizi.....	20

2.4.2.Enzimatik Hidrolizin Reoloji ile İlişkisi.....	22
2.4.3.Nişastanın Enzimatik Hidrolizi	23
2.4.4.Nişastanın Enzimatik Hidrolizi için Kullanılan Enzimler.....	25
2.4.4.1.Alfa Amilaz (EC 3.2.1.1).....	27
2.4.4.2.Gluoamilaz (EC 3.2.1.3).....	28
2.5.Çeşitli Gıda ve Tarımsal Atıkların Enzimatik Hidrolizi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	29
2.6.Atık Ekmeklerin Değerlendirilmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	33
3.MATERYAL ve METOD	36
3.1.Materyal	36
3.2.Metod	36
3.2.1.Atık Ekmeklerin Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi	36
3.2.1.1.Kuru Madde Analizi	36
3.2.1.2.Kül Analizi	36
3.2.1.3.Nişasta Analizi.....	36
3.2.1.4.Ham Protein Analizi	36
3.2.2.Atık Ekmeğin Enzimatik Hidrolizi.....	37
3.2.3.Atık Ekmek Hidrolizinin İstatistiksel Optimizasyonu	38
3.2.4.Hidrolizatın Toplam şeker ve İndirgen şeker Analizi	38
3.2.5.Hidrolizata Uygulanan Reolojik Analizler	39
4.ARAşTIRMA BULGULARI ve TARTIşMA	40
4.1.Atık Ekmeğin Kimyasal Kompozisyonu	40
4.1.Enzimatik Hidrolizasyon Optimizasyonu.....	40
4.2.Reolojik Karakterizasyon ve Glukoz Veriminin Validasyonu	47
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	51
6.KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİş	63

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Yetersiz beslenen nüfus	4
Çizelge 2.2. Türkiye’de ekmek tüketimi ve israfına ilişkin bazı göstergeler	10
Çizelge 2.3. Ülke genelinde toplam israf oranı	10
Çizelge 2.4. Tüketime sunulan ekmeğin servis edilmeden önce israf edilme nedenlerine göre dağılımı.....	11
Çizelge 4.1. Atık ekmeklerin kimyasal kompozisyonuna ait ortalama değerler (%).....	40
Çizelge 4.2. Atık ekmek miktarı (β_1), sıvılaştırma ve sakkarafikasyon aşamalarında kullanılan α -amilaz (β_2) ve glikoamilaz (β_3) miktarlarının Yanıt Yüzey Metodu ile optimizasyonu sonucu elde edilen Central Composite Design matrisi, ANOVA analiz ve katsayı tahminleri.....	41
Çizelge 4.3. Farklı miktarlardaki atık ekmek solusyonlarının 0.1’den 100 s ⁻¹ ’e kadar olan kayma hızlarına bağlı olarak oluşan kayma gerilimlerinin Casson modeline oturtulmasıyla elde edilen görünür Casson akma sınırı (τ_C) ve plastik viskozitesi	50

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Her bir ürün grubunun bölgelere göre üretim hacimleri	5
Şekil 2.2. Farklı bölgelerde tüketim ve tüketim öncesi kişi başı gıda kayıpları ve atıklar	6
Şekil 2.3. Dünya genelinde gıda atık türlerinin oransal değerleri	7
Şekil 2.4. Dünya genelinde ve bazı ülkelerdeki atık ekmek miktarları	7
Şekil 2.5. Bir yılda israf edilen ekmeğin oransal değerleri	8
Şekil 4.1. Farklı enzim seviyelerindeki 0.05 (g/g) lık atık ekmek solusyonunda glukoz verimi	44
Şekil 4.2. Farklı enzim seviyelerindeki 0.11 (g/g) lık atık ekmek solusyonunda glukoz verimi	45
Şekil 4.3. Farklı enzim seviyelerindeki 0.20 (g/g) lık atık ekmek solusyonunda glukoz verimi	46
Şekil 4.4. Farklı enzim seviyelerindeki 0.29 (g/g) lık atık ekmek solusyonunda glukoz verimi	46
Şekil 4.5. Atık ekmeklerden sıvılaşma ve sakkarafikasyon aşamalarında zamana bağlı glukoz eldesi	47
Şekil 4.6. Kayma hızı 0.519 s^{-1} 'de sıvılaşma ve sakkarafikasyon aşamalarında atık ekmelerin zamana bağlı viskoziteleri	49

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
a_w	Su aktivitesi
cm^2	Santimetrekare
dk	Dakika
DE	Dekstroz Eşdeğer
g	Gram
kg	Kilogram
K_c	Süspansiyon Plastik Viskozitesi
L	Litre
log	Logaritma 10'luk taban
M	Molarite
m	Metre
MPa	Mega Paskal
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
N	Normalite
$^{\circ}\text{C}$	Celsius derecesi
ppm	Milyonda bir kısım
s	Saat
sn	Saniye
τ	Kayma Stresi
τ_c	Casson Akma Sınırı
γ	Kayma Hızı

KISALTMALAR DİZİNİ

Ca(OH) ₂	Kalsiyum Hidroksit
CO ₂	Karbondioksit
Cs ¹³⁷	Sezyum- 137
cfu	Colony forming unit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
HCl	Hidrojen Klorür
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
kob	Koloni oluşturan birim
KM	Kuru Madde
KOH	Potasyum Hidroksit
K ₂ (CO) ₃	Potasyum Karbonat
K ₂ SO ₄	Potasyum Sülfat
LAB	Laktik asit bakterisi
LiOH	Lityum Hidroksit
NaOH	Sodyum Hidroksit
PTFE	PoliTetraFloro Etilen
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
Se	Selenyum
spp.	Türler
w/w	Yüzde Derişim
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerinin yanı sıra maddi manevi desteğinden sürekli istifade ettiğim tez danışman hocam Namık Kemal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. A.Şükrü DEMİRCİ'ye sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarına katkılarından ve yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim PALABIYIK ve Sayın Arş. Gör. Deniz Damla ALTAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim süresince yardımlarını esirgemeyen ve yanımda olarak laboratuvar çalışmalarına destek olan değerli arkadaşım Gülce Bedis BAKANOGULLARI'na teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak manevi desteklerinden dolayı saygıdeğer eşim Emin GÜNEŞ'e, annem Şükran ÖZALP, babam İsmail ÖZALP ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Tezin tamamlanmasında verdiği proje (114O429) ve burs desteği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2018

Şeymanur GÜNEŞ

1.GİRİŞ

Beslenmemizde vazgeçilmez bir önemi olan ekme , un ve unlu mam ller arasında tüketimi en fazla olan gıda maddesidir. Türk kültüründe kutsal olarak kabul edilen ekmeğın tüketim miktarı bireylerin sosyo-ekonomik durumuna bağlı olarak değişmektedir (Baysal 1994; Kılıçarslan 2000).

Ekme  uzun zamandır batı dünyasının başlıca gıda maddesi olmuş ve giderek Uzak Doğu'daki diğer tahıl esaslı gıdalara büyük bir alternatif haline gelmektedir. Bizim medeniyetimiz, yaklaşık 10 bin yıl önce bereketli hilal etrafında tahılların evcilleştirilmesi ve ekilmesi üzerine kurulmuştur. Tahılların bu şekilde ekilmesi, insanların topluluk halinde yaşamasına ve şehirler kurmaya başlamasına neden olmuştur. Günümüzde dünyada her yıl 2 milyar tondan fazla tahıl yetiştirilmektedir ve bu tahıllar, yediğimiz ya da hayvanlara beslenen yiyeceklerin yarısından fazlasını oluşturmaktadır (Melikoğlu ve Webb, 2013)

Günümüzde, özellikle gelişmiş ülkelerde süpermarketlerin ve fastfood zincirlerinin sayısının çok fazla olması insanların gıdalara daha kolay ulaşabilmesine ve daha fazla gıdayı israf etmesine sebep olmaktadır. Bununla beraber, gıda çeşitliliğinin artması, m kemmek gıda ambalajlarının cazibesi insanların ihtiya ı olandan fazlasını satın almasına ve dolayısıyla israfın artmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda dünyada, çok farklı çeşitlerde, büyük miktarlarda gıdalar israf edilmektedir. Dolayısıyla, farklı türden gıdaların büyük miktarı küresel olarak boşa gider. Bu gıdaların bölgesel olarak miktarlarını belirlemek zordur, ancak gıda atıklarının en fazla olduğu üç kategori et, meyve ve sebzeler ve fırıncılık ürünleridir. Fırıncılık  r nleri kategorisinde en çok israf olan gıda maddesi ekme tir (Jones 2006; Jones 2007; Kantoretal 1997; Parry 2007; Melikoğlu ve Webb2013).

Ekmeğın toplumumuzca kutsal kabul edilmesine rağmen, gerek dünyada gerekse ülkemizde en fazla israf edilen gıda ürünlerindendir. Üretilen ekmeğın önemli bir kısmı ne yazık ki, gıda olarak tüketilmeyip  pe atılmakta ya da hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Yüz milyonlarca insanın a  uyuduğu ve açlıktan hayatını kaybettiği bir dünyada ekmeğın  pe atılması, israf edilmesi yürek yaralayan bir olgudur.

Ekmeğın amacı dışında kullanılması, yani insan gıdası olarak tüketilmemesi veya  pe atılması, israf olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla insan gıdası olarak kullanılmayıp hayvanlara verilen ekme lerin de israf edildiği kabul edilmektedir. Zira ekmeğın insan gıdası olarak tüketilmesi için un ve ekme  üretimi sürecinde yapılan işlemler; emek, enerji, gelir ve

zaman kaybına neden olmaktadır. Bu yüzden, doğrudan hayvan yemi olarak kullanılabilen tahıl ürünleri yerine ekmeğin kullanılması ekonomik açıdan israf olarak düşünülmektedir.

Ekmeğin besin içeriği ekmeğin çeşidine göre değişmekle birlikte genel olarak ekmeğin bileşiminde 500-750 g kg⁻¹ nişasta ve 3-50g kg⁻¹ basit şeker bulunmaktadır (Dewettinck ve ark. 2008). Ayrıca 100-150 g kg⁻¹ de protein içermektedir (Thomas ve Ingledew 1990). Bu kompozisyon ekmeği birçok mikroorganizmanın yanı sıra ekmeğin tüketicileri için de kusursuz ve neredeyse eksiksiz bir beslenme kaynağı yapmaktadır (Melikoğlu ve Webb 2013). Ekmeğin, enzimler kullanılarak monomerik şekere kolaylıkla hidrolize olabilen yüksek miktarda nişasta ihtiva etmektedir. Ekmeğin içerdiği yüksek orandaki nişasta ve protein sebebiyle fermente ürünlerin üretiminde kullanılabilen çok uygun bir substrattır.

Avrupa Birliği'nde fırıncılık endüstrisi tarafından üretilen atıkların toplam üretiminin % 7'sinden yüksek olduğu ve bu miktarın yılda yaklaşık 1,3 milyon ton olduğu bildirilmektedir. Bazı iadeler ekmeğin kırıntıları üretimi ya da hayvan yemi olarak işlenirken, önemli miktarlar belirli sebeplerden dolayı yeniden işleme için uygun değildir. Atık ekmeğin laktik asit üretimi, anaerobik fermantasyon ile biyolojik hidrojen üretimi, maya ve diğer aroma bileşiklerinin üretimi için hammadde olarak kullanılması için bazı çalışmalar yapılmaktadır (Joanna Kawa- Rygielska ve ark. 2012).

Gıda atıklarının içerdiği besinler, mikroorganizmalarla biyoyakıtlar, işlevsel kimyasallar ve biyo plastiklerin monomeri gibi istenen ürünlere dönüştürülebilir. (Leung ve ark. 2012). Mutfak atıkları gibi karbonhidrat zengin organik atıklar, kısmen kolay bir şekilde değerli ürünlere (örneğin, laktik asit, biyoetanol) dönüştürülebilir. Gıda atıklarından periyodik veya sürekli pH izlenmesi ile laktik asit üretimine ilişkin çeşitli çalışmalar bildirilmiştir (Vavouraki ve ark. 2013).

Ekmeğin pişirme işlemi sırasında nişastada önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Nişastanın bir kısmı öğütme sırasında jelatinleştirilir ve kısmen depolimerleştirilir, bu da sonraki aşama olan hidrolizi kolaylaştırabilir (Joanna Kawa- Rygielska ve ark. 2012). Bunun yanı sıra nişastanın bir kısmı mayalama işlemi sırasında unda bulunan doğal enzimler tarafından hali hazırda hidrolize edilmiştir. Bu farklılıklar, ekmeğin artıklarının fermantasyon prosesleri için genel bir besleme stoku olarak kullanılma ihtimalini artırmaktadır (Ebrahimi ve ark. 2008).

Yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen nişasta selüloz ve hemiselülozların yanında doğada en bol bulunan biyopolimerdir. 17. yüzyıldan günümüze kadar olan dönemde,

çeşitli bitki kökenli yerli ve modifiye nişastalardan, teknolojinin ve beslenmenin çok sayıda alanındaki uygulamaları hakkında on binlerce makale yayınlanmıştır. Doğal, fosil olmayan kaynaklardan gelen ürünler, potansiyel kaynak materyali olarak polisakkaritleri hedef almıştır. Avrupa Birliği fosil kaynaklı materyallerin kullanımını sınırlayabilen ve hatta onları ortadan kaldıracak umut verici ve çok yönlü bir kaynak olarak nişastayı belirlemektedir. Bu tür proseslerin geliştirilmesi için çok çeşitli olasılıklar, nişastanın enzimatik dönüşümleri ile sunulmaktadır. Asit ve bazla katalize edilmiş enzimatik dönüşümlerin avantajı seçiciliklerinden kaynaklanmaktadır. Nişasta, teknolojik olarak yararlı mikroorganizmalar için bir besin maddesi olarak kullanılır. Nişastanın enzimatik dönüşümlerinde, izole edilmiş tekli enzimler veya bunların karışımları, mikroorganizmalar gibi enzim üreticileri, bitki dokusu parçaları, hayvan vücut sıvıları ve hayvan organlarını kullanabilir. Bitki atığındaki ham mısır nişastası (biyokütle) ve sözde yeşil plastik, yani, nişasta gibi biyopolimerleri ile oluşturulan sentetik plastikler de enzimatik olarak bozundurulabilir (Tomasikave Horton 2012)

Ekmek, nişasta bakımından zengindir ve ayrıca proteinler ve diğer besin maddelerini de içerir. Bu nedenle modifikasyondan sonra fermantasyonsubstratı olarak uygun bir materyeldir. Büyük makromoleküllerin, mikroorganizmaların kullanımı için daha küçük ünitelere indirgenmesi gerekir. Bu nedenle gerekli olan glikoz, azot ve minerallerden zengin bir hidrolizatın hazırlanması, daha sonra uygun biyolojik dönüşümü ile arzu edilen herhangi bir ürüne dönüştürülebilecektir. Atık ekmeği besin açısından zengin bir hidrolizata çevirmenin en önemli yollarından birisi enzimlerin kullanımınıdır. Bu yöntem maliyetli olabilir fakat aynı zamanda ticari enzimler nispeten saf halde satılmaktadır. Atık ekmekten besin açısından eksiksiz zengin bir hidrolizat hazırlamak için nişasta hidrolizinde amilaz ve gluko-amilazlar, protein hidrolizinde proteazlar vb. kullanılmaktadır (Melikoğlu ve Webb 2013).

Tüm bu bilgiler ve veriler doğrultusunda; atık ekmeklerin ekonomik olarak değerlendirilebilme potansiyelinin ortaya konulması hedefiyle, enzim ve hammaddenin optimum şekilde kullanılarak, en yüksek verimde glukoz üretimi için enzimatik hidroliz optimizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca; optimum miktarda enzim katılmış, farklı oranlardaki ekmek-su süspansiyonlarının hidroliz aşamasındaki zamana bağlı reolojik karakterizasyonu incelenmiştir.

2.LİTARATÜR ÖZETİ

2.1. Gıda Atıkları

Gıda kaybı ve gıda israfının birçok tanımı olmasına karşın genel olarak gıda kaybı üretim ve işleme sürecindeki fire kaybı olarak tanımlanabilmektedir. Gıda israfı ise nihai tüketim aşamasında atılan gıdaları içermektedir. Tüketici için üretilen gıdaların insan tüketimi dışındaki bir amaçla (hayvan beslenmesi, biyoenerji vb.) kullanılması da gıda israfı olarak tanımlanmaktadır (Gustavsson ve ark. 2011; FAO 2011). Gıda israfı dünya çapında her ülkede önemli olmakla birlikte, özellikle orta ve yüksek gelirli ülkelerde israf oranı daha yüksektir.

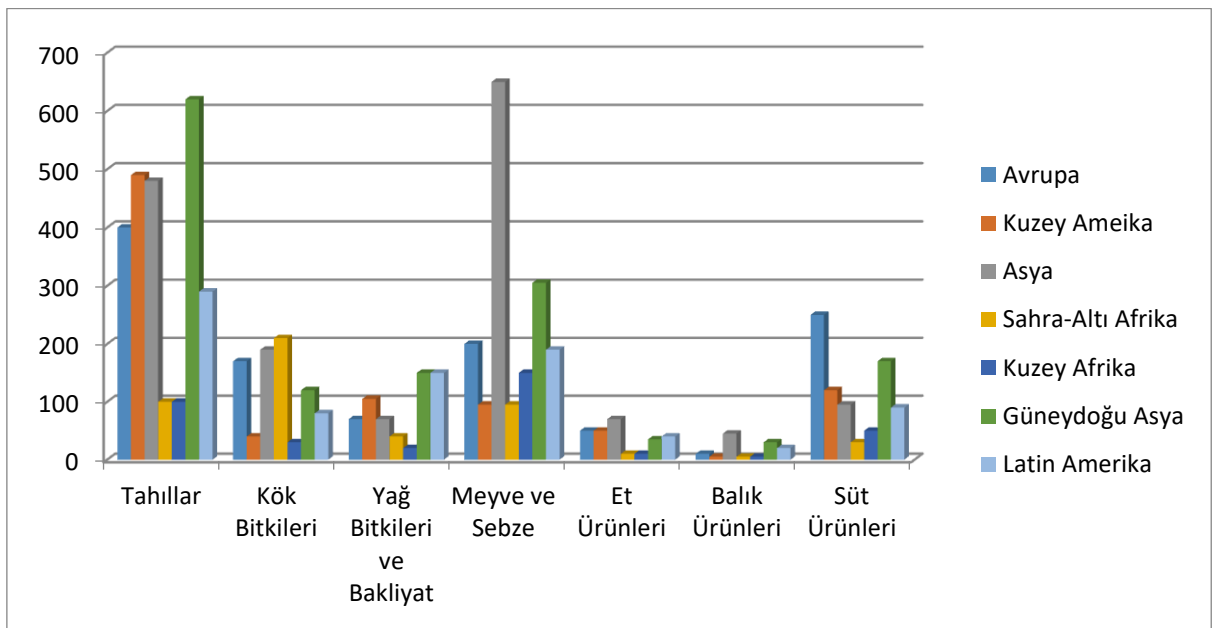
2014 FAO verilerine göre her gün yaklaşık 1 milyar kişi aç uyumaktadır. Bunun yanında 1,4 milyar kişi de aşırı kiloları nedeni ile sorunlar yaşamakta ve her yıl 2,8 milyon insan da aşırı kiloları nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Dünyada üretilen gıdaların üçte biri olan 1,3 milyar ton gıdanın israfı da dikkat çekmektedir. Çöpe atılan ve israf edilen gıdalar dünya enerji tüketiminin % 10'unundan fazlasına denk olmakla beraber ekonomik yükü ise 750 milyar dolardır. Gıda israfı ve kaybında en büyük payı endüstrileşmiş ülkeler %56 oranı ile almaktadır ve bu israfın boyutları, çeşitliliği ve yönü ülkelerin sosyo-ekonomik özelliklerine göre değişmektedir (Dölekoğlu ve ark. 2014).

Çizelge 2.1.Yetersiz beslenen nüfus (milyon kişi) (FAO,2014)

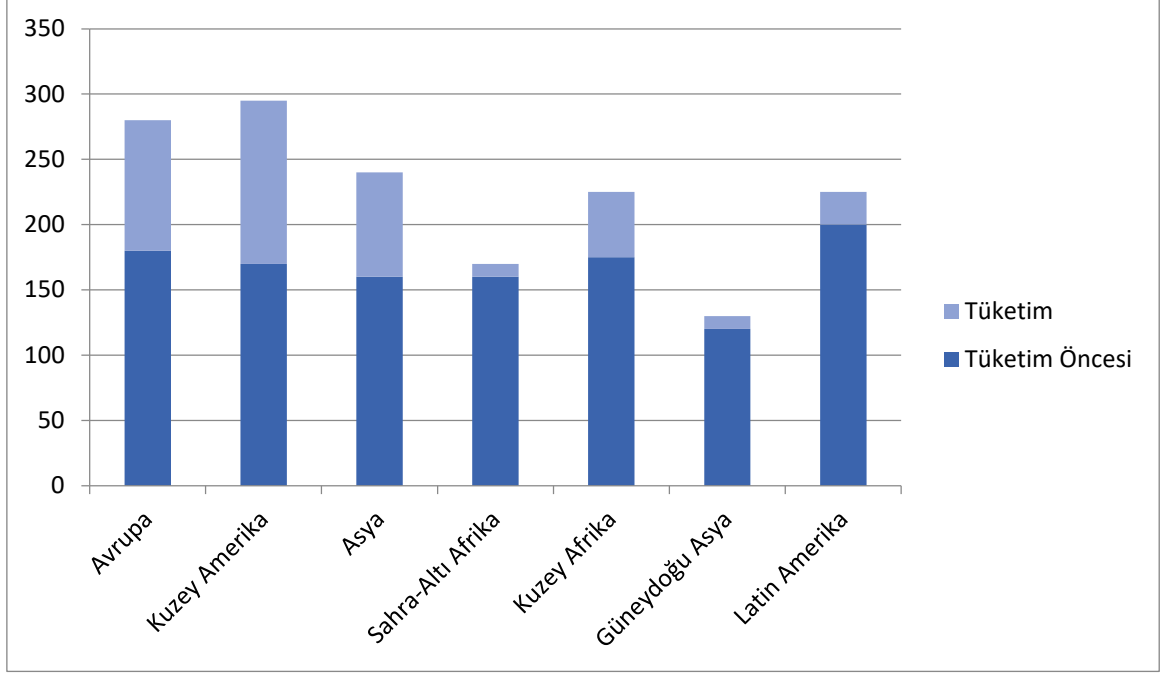
Bölgeler	1990-92	2000-02	2010-12	2011-13
Dünya	1015,3	957,3	853,6	842,3
Gelişmekte olan bölgeler	995,5	938,9	837,8	826,6
Afrika	177,6	214,3	228,6	226,4
Asya	751,3	662,3	560,0	552,0
Latin Amerika ve Karayipler	65,7	61,0	48,0	47,0
Okyanusya	0,8	1,2	1,1	1,2
Gelişmiş bölgeler	19,8	18,4	15,9	15,7
Az gelişmiş bölgeler	201,9	245,4	253,4	252,1
Düşük gelirli ülkeler	193,0	241,0	238,3	235,4
Düşük-orta gelirli ülkeler	436,8	438,6	390,4	384,7
Düşük gelirli gıda açığı olan ülkeler	531,5	591,5	561,2	554,9

Yılda 870 milyon insanın yetersiz beslendiği dünyamızda, gıda israfı ciddi boyutlara ulaşmıştır. FAO verilerine göre, yıllık ekonomik değeri yaklaşık 1 trilyon dolara karşılık gelen 1.3 milyar ton gıda, tarımsal ürünlerin üretiminden son olarak hanelerde tüketime kadar tüm gıda tedarik zinciri boyunca israf edilmektedir. FAO verileri, israf edilen veya kayba uğrayan miktarın küresel besin tedarikinin üçte birini oluşturduğunu göstermektedir. Dünyamızda israf edilen bu gıdalar ile 870 milyon insanın beslenmesi mümkündür. Dahası bu gıdaları yetiştirmek, işlemek ve taşımak için harcanan enerji ve gıdalar çürürken ortaya çıkan metan gazı hesaba katıldığında, israf edilen gıdalar nedeniyle her yıl 3,3 milyar tona denk gelen karbon dioksitin atmosfere salındığı kabul edilmektedir (FAO, 2015).

Orta ve yüksek gelir düzeyindeki ülkelerde daha fazla gıda atığı meydana gelmekte yani insan tüketimi için hala uygun olsa bile yiyecekler atılmaktadır. Bununla birlikte, önemli miktarda gıda kaybı ve israf, gıda tedarik zincirinin başında gerçekleşmektedir. Düşük gelirli ülkelerde tüketici düzeyinde çok daha az gıda israf edilirken gıda tedarik zincirinin ilk ve orta safhalarında kayıplar meydana gelmektedir. FAO verilerine göre, gıda atık ve kayıplarının yıllık maliyeti 940 milyar dolara ulaşüyor ve bu kayıplar dünya çapında sera gazı emisyonunun yüzde sekizini oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalar, Afrika’da yüzbinlerce çiftçinin kötü depolama yöntemleri, finansmana ulaşamama veya sürdürülebilir pazarlara girememe gibi nedenlerden dolayı meyve ve sebze hasatlarının yüzde 15 ila 42’sini kaybettiklerini ortaya koymaktadır (FAO, 2015).



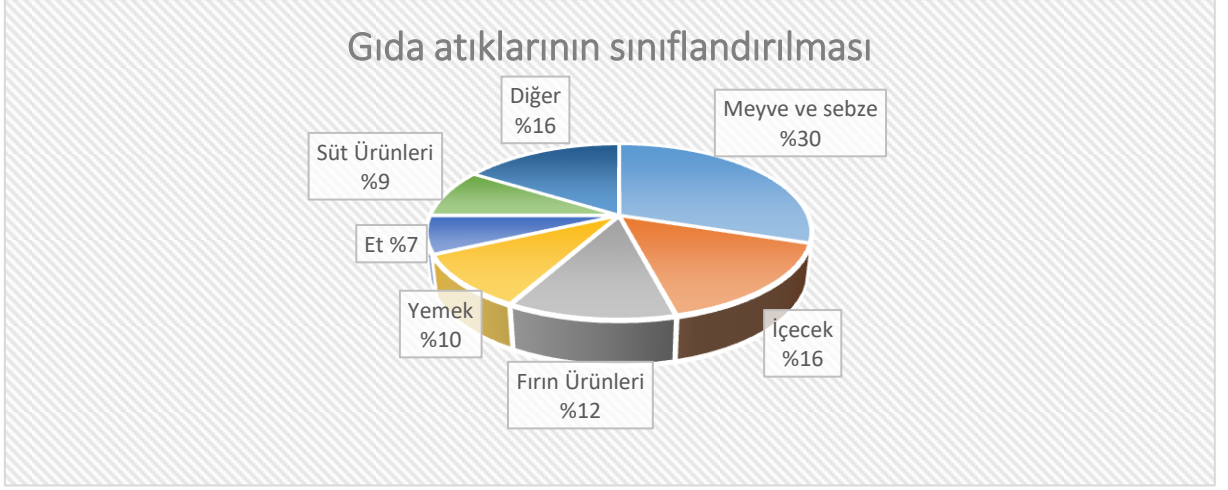
Şekil 2.1. Her bir ürün grubunun bölgelere göre üretim hacimleri (milyon ton) FAO,2011



Şekil 2.2.Farklı bölgelerde tüketim ve tüketim öncesi kişi başı gıda kayıpları ve atıklar (FAO 2011)

Veriler Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da kişi başına düşen gıda kaybının 280-300 kg / yıl Sahra altı Afrika ve Güney / Güneydoğu Asya'da yılda 120-170 kg/yıl olduğunu göstermektedir. İnsan tüketimi için yenilebilir gıdaların toplam kişi başına üretimi, Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da yaklaşık 900 kg / yıl, Sahra altı Afrika ve Güney / Güneydoğu Asya'da ise 460 kg / yıldır. Kişi başı tüketilen gıda Sahra altı Afrika ve Güney / Güneydoğu Asya'da sadece 6-11 kg / yıl iken Avrupa ve Kuzey Amerika'da tüketici tarafından tüketilen gıda 95-115 kg / yıldır.

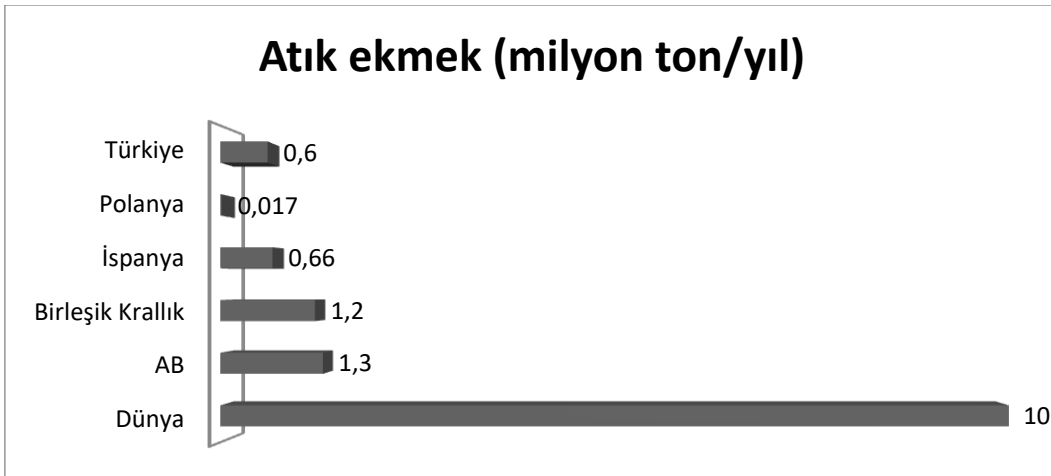
Sonuç olarak, dünya genelinde çok farklı çeşitlerde, büyük miktarlarda gıda israf edilmektedir. Şekil 2.3'den de görüldüğü gibi gıda atık türleri içerisinde ilk üç sırayı meyve ve sebzeler, içecekler ve fırın ürünleri teşkil etmektedir. Fırın ürünleri atıklarının çoğunu ekmek atıkları oluşturmaktadır olup, toplam gıda atıkları içerisindeki oranı yaklaşık %12'dir (Kantor ve ark. 1997; Parry 2007; Jones 2007).



Şekil 2.3. Dünya genelinde gıda atık türlerinin oransal değerleri (Jones, 2007)

2.1.1.Ekmek İsrافی

Dünya genelinde; fırıncılık endüstrisinde toplam üretilen ürünün yaklaşık %7-10'u değerlendirilemeyip atık oluşturmaktadır (Mena ve ark. 2011). Dünyada yıllık ekmek üretimi yaklaşık 100 milyon tondur (Melikoglu ve Webb 2013). Dolayısıyla ortaya çıkan atık miktarı yıllık yaklaşık 10 milyon ton olmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde çöpe giden ekmek miktarı yıllık yaklaşık 1,3 milyon ton, Birleşik Krallık 'ta ise bu rakam 1,2 milyon ton olmaktadır. İspanya'da toplam ekmek üretiminin %30'una tekabül eden yaklaşık 660 milyon kg ekmek zayi olmaktadır. Almanya, Polonya, Avusturya ve İran gibi ülkelerde de üretilen ekmeklerin yaklaşık %10'u tüketilmeyip çöpe atılmaktadır (Kawa-Rygielska ve ark. 2012).

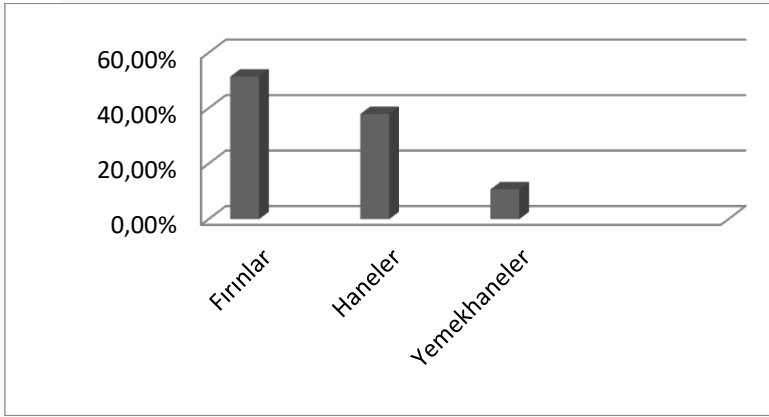


Şekil 2.4. Dünya genelinde ve bazı ülkelerdeki atık ekmek miktarları

Ülkemizde günlük 200 gramlık 123 milyon adet ekmek üretilmekte ve bunların sadece 116,9 milyon adedi tüketilmektedir. Dolayısıyla günde 6,14 milyon ekmek tüketilmeyip israf edilmektedir. Kişi başı ekmek tüketimi yıllık ortalama 121 kg iken 445,3 bin ton ekmek israf edilmektedir. Yani ürettiğimiz ekmeğin % 5'ini israf etmekteyiz (Kurter 2011).

Bir yılda israf edilen 2,1 milyar adet ekmek, ülkenin 23 günlük ekmek ihtiyacı kadardır. Bir günde israf edilen toplam 6 milyon adet ekmeğin;

- 3 milyonu fırınlarda (%51,4),
- 2.3 milyonu hanelerde (%37,9),
- 0,6 milyonu kurumlarda; personel ve öğrenci yemekhanelerinde, lokantalarında ve otellerde (%10,7) israf edilmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Bir yılda israf edilen ekmeğin oransal değerleri (Anonim 2014)

571 bin ton buğdaya karşılık gelen 542 bin ton ekmeğin israf edilmesi ile aynı zamanda 21,420 ton maya, 8,136 ton tuz, 21 bin ton mazot ve 1,2 milyar küp su israf olmaktadır (Elgün ve ark. 2014).

Ekmeğin israfının nedenlerini şu şekilde sıralayabiliriz;

- Ekmeğin bayatlaması ve taze tüketim alışkanlığı (Atık ekmek miktarının bu denli olmasının en büyük nedeni ekmeklerin bayatlama sebebiyle satılamaması ve fırınlara geri gelmesidir. Fırınlanmış ürünlerde bayatlamamanın nedeni nişasta retrogradasyonu ve nem kaybıdır. Bayat ekmek duyuşsal özelliklerini kaybetmekte ve ürün hala sağlıklı ve besinsel olarak zengin olmasına rağmen tüketici üzerinde negatif algı oluşturmaktadır (Ribotta ve Bail 2007).

- Ekmeğin bozulması (Besin kompozisyonu, yüksek nem içeriği (yaklaşık 40% wb) ve su aktivitesi (a_w 0.94-0.97) ekmeği mikroorganizmalar ve özellikle küfler için kusursuz bir besin kaynağı yapmaktadır.)
- Fırın sayısının çokluğu nedeniyle genellikle büyük kentlerde ihtiyacın üzerinde ekmek üretimi yapılması
- Tüketici taleplerinin artması ve farklılaşması sebebiyle üretilen fırın ürünlerinin çeşitliliğinin ve miktarlarını artması
- İhtiyaçtan fazla satın alınması
- Değerlendirme yöntemlerinin bilinmemesi
- Saklama ve dağıtım koşullarına uyulmaması
- Ekmek satan perakendecilerin yüksek sayıda ve dağınık olması ve uygun olmayan koşullardaki satış yerleri
- Düşük buğday kalitesi
- Fırıncılık teknolojisindeki eksiklikler

Toprak Mahsülleri Ofisinin ilkinin 2008, ikincisini 2012 yılında olmak üzere; “Ekmek Tüketimiyle İlgili Tutum ve Davranışlar ile Ekmek İsrafı ve İsfraf Üzerinde Etkili Olan Faktörler” adı altında yaptığı araştırmalardan 2012 yılı araştırmasına göre; 2008 yılında % 5 olan israf oranının % 20 artışla % 6’ya yükseldiği, günde 6 milyon ve yılda 2,17 milyar adet ekmeğin israf edildiği, bunun parasal karşılığının ise 1,6 milyar TL olduğu tespit edilmiştir. Ekmek israfı hakkında farkındalık oluşturup, israftan kaynaklanan ekonomik kayıpların önüne geçilmesi amacıyla 17 Ocak 2013 tarihinde “Ekmek İsrafını Önleme Kampanyası” başlatılmıştır. Yürütülen kampanya sürecinde 2012 yılında 5 milyon 950 bin adet olan günlük ekmek israfı 4 milyon 900 bin adede düşürülmüş olup her gün 1 milyon 50 bin adet, yılda 384 milyon adet ekmek çöpe atılmaktan kurtarılmış ve dolayısıyla israfta % 18’lik bir azalış sağlanmıştır. Diğer yandan kampanyanın etkisi ile tüketim alışkanlıklarını değiştiren halkımız ekmeği kontrollü şekilde tüketmiş, tüketiceğinden fazlasını almamış bu da günlük ekmek tüketiminde, parasal değeri 2,5 milyar TL olan bir tasarruf daha sağlamıştır. Bir yıllık kampanya sonucunda bu iki tasarruf şekli ile günlük 7,8 milyon TL, yıllık ise 2,5 milyar TL olarak tasarruf sağlanmıştır (Elgün ve ark. 2014).

Çizelge 2.2. Türkiye’de ekmek tüketimi ve israfına ilişkin bazı göstergeler (Anonim 2013)

	2008	2012
Günlük ekmek üretimi (adet/gün)	98 231 304	101 181 223
Günlük ekmek israfı (adet/gün)	4 911 832	5 944 708
Yıllık ekmek israfı (TL) (0,70 TL)	1 245 973 056	1 518 872 894
Ülke geneli ekmek israf oranı (%)	5.0	5.9
Kişi başı ekmek günlük tüketimi (adet)	1,32	1,28
Kişi başı ekmek günlük tüketimi (g)	331	319
Kişi başı ekmek günlük israfı (adet)	17,4	19,9

Ekmek israfının en çok yapıldığı yerler; evde yapılan israf, ekmek fabrikaları ve fırınlarda satılmadan önce çöpe atılan ekmekler ve toplu tüketim yerlerinde çöpe atılan ekmekler olarak belirtebiliriz. Evlerde yapılan israf yıllık çöpe atılan ekmeğin %30’luk kısmını oluşturmaktadır (Kılıçarslan 2000).

Çizelge 2.3’de belirtildiği gibi fırınlarda üretilen ekmeklerin % 3,4’ünün; 1,7’si satılmayarak, yüzde 1,72’si ise iade olarak geri dönerek israf olmaktadır. Bu ekmeklerin yüzde 1.98’i çöpe atılarak ya da hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Günlük üretilen ekmeğin 2.44 milyon adedi daha satılmadan fırınlarda israf olmaktadır.

Çizelge 2.3. Ülke genelinde toplam israf oranı (Kurter 2011)

Yemeğin kaynağı	Lokanta, otel, büfe, kantin, pastane vs.	İşyeri yemekhanesi (tabldot)	Öğrenci yemekhanesi (tabldot)	Hane	Fırınlarda	Toplam
200 gr standardize edilmiş ekmek alım/üretim adedi	27.145.530	8.173.463	2.431.524	82.906.670	118.206.047	123.002.005
200 gr standardize edilmiş toplam ekmek israf adedi	843.304	201.876	209.620	2.540.170	2.334.819	6.139.790
Toplam israf (%)	3,11	2,47	8,62	3,06	1,98	4,99

Birer ve ark. (1982)’de yaptığı çalışmada toplu beslenme yapan kurumlarda ekmek israfını incelemişlerdir. 3 öğün yemek veren yetiştirme yurdu ve yatılı okullarda ekmeğin ortalama %16,69’u yenilmeyip atıldığı bildirilmiştir. Özellikle kız çocuklarına fazla gelen ekmeklerin yenilmemesi ile ekmek israfının olduğu gözlenmiştir. Günde bir öğün yemek veren ve yetişkinlerin çalıştığı kurumda yapılan araştırmaya göre birey başına 100-250 gr

ekmek verildiği ve bu ekmek miktarının fazla gelmesi sebebiyle ekmeğin %28,4'ünün israf edildiği belirtilmiştir.

İzmir Bornova ilçesinde sosyo-ekonomik ve kültürel farklılıkları olan 400 aile üzerinde yapılan değerlendirmede birey başına alınan ortalama ekmek miktarının düşük gelirli ailelerde 421 gr, orta gelirli ailelerde 373, yüksek gelirli ailelerde 374 gr olduğu belirlenmiştir. Atılan ortalama ekmek miktarının da aynı sıra ile 28, 39, 49 gr olduğu görülmüştür. Geliri az olan ailelerde artan ekmeği yine insan tüketiminde farklı şekillerde değerlendirildiği gözlenirken yüksek gelirli ailelerin ekmeği çöpe attıkları ya da hayvan yemi olarak kullandıkları belirtilmiştir (Yılmaz 1983).

Arslan ve Yüksel (1986) Ankara Maden Araştırmaları Enstitüsünde yaptığı bir araştırma göstermiştir ki tüketime sunulan ekmeğin servis edilmeden önce israf edilmesinin birçok nedeni vardır.

Çizelge 2.4. Tüketime sunulan ekmeğin servis edilmeden önce israf edilme nedenlerine göre dağılımı (Arslan ve Yüksel 1986)

İsraf nedeni	Memur sayısı	%	İşçi sayısı	%	Toplam sayı	%
İhtiyaçtan fazla satın alınması	73	35,9	33	28,4	106	33,2
Büyük dilimler halinde servis edilmesi	106	53,2	73	62,9	181	56,7
Yemek yiyen sayısı az, lezzeti iyi değil, bayat	22	10,9	10	8,7	32	10,1
Toplam	203	100,0	116	100,0	319	100,0

Ekmeğin büyük dilimler halinde tüketime sunulması israfın ilk nedeni olarak görülürken kurum yemekhanesinde yemek yiyenlerin sayısının az olması ve tüketime sunulmadan ekmeğin % 11,1'nin artması israf sebeplerinden bir diğeridir. Bu da kurum bütçesini yılda 1.625.000 TL zarara sokmaktadır. İncelenen grupta kişilerin % 97,7'si verilen ekmeğin taze olmadığını iddia etmiştir.

Gül ve ark. (2003)'nin Adana ilinde yaptıkları bir çalışma göstermiştir ki çoğu evdeki atık ekmekler başka bir ürüne dönüştürülerek kullanılmaktadır. Analiz edilen hane halklarındaki israf oranı % 9,63'dür. Bu oranın yüksek gelir grubunda maksimum, düşük gelir grubunda minimum olduğu belirlenmiştir. Analiz edilen hane halklarının % 21,75'inin ekmek

israf ettiği ve bunun sebebinin bayat ekmekten hoşlanmadıkları olarak kaydedilmiştir. 400 anketin sonucuna göre hane halkının % 63,25'i ekmeğin ihtiya ca göre satın alınması gerektiğini, eğitimle ekmek israfının öneminin açıklanmasını, farklı ağrlıkta ekmek üretilmesini, geç bayatlayan ve ekmek israfının önüne geçecek ekmek çeşitlerinin üretilmesi gerektiğini belirtmiştir.

Ertürk ve ark. (2015)'de yaptığı çalışmada Isparta ilinde ailelerin ekmek tüketimi ve israfı incelenmiş ve günlük ihtiyaçları kadar ekmek alan ailelerin oranı % 60,7, günlük ihtiyaçlarından fazla ekmek alan ailelerin oranı ise % 37,5 olarak tespit edilmiştir. Fazla ekmek alan ailelerin % 87,8'i bayatlayan ekmekleri yine insan gıdası olarak değerlendirirken bayatlamış ekmeklerin hayvanlara verilmesi de oldukça yaygın bir uygulama olmaya devam etmektedir. Ailelerin % 8,9'u ise bayat ekmekleri çöpe attıklarını belirtmişlerdir.

Ekmek alırken tüketecek kişi sayısı, günlük yemek menüsü ve mevcut ekmek miktarı göz önüne alınarak ve alındığı gün ekmek tüketilmeyecekse ambalajlı ekmek tercih edilerek ekmek israfının azaltılması sağlanabilir. Fazla alınan ekmeklerin muhafazasında ise şunlara dikkat edilebilir;

- Muhafaza edilen yer temiz olmalı.
- Gün içinde tüketecek ekmekler kapaklı ekmek kutusunda, gıda dolabında ya da poşette saklanmalı.
- Ambalajı açılmış ekmeğin tamamı tüketilmemiş ise yine ambalajında muhafaza edilmeli.
- Birkaç gün içerisinde tüketecek ekmekler poşet içinde buzdolabında muhafaza edilmeli.
- Gereğinden fazla alınan ekmekler birkaç gün içerisinde tüketilmeyecekse derin dondurucuya konulmalı (Anonim 2013).

2.2.Ekmek ve Ekmek Teknolojisi

Fermente tahıl ürünleri içinde önemli bir yeri bulunan ekmeğin tarihi ve ekmek üretimi çok eski çağlara uzanmaktadır. İlk zamanlarda ekmeğin pişirilmesi buğdayın ezilip, su ile karıştırıldıktan sonra, kızgın taşlarda haşlanması şeklinde olmuştur. Zaman içerisinde gelişme gösteren ekmek üretimi, çağımızda ileri teknolojilerden yararlanan bir bilim dalı haline gelmiştir (Göçmen 1996).

19. yüzyılda, buğday ekmeği üretimi uzun bir süreçti. İşlem yavaşça un ve suyun karıştırılması ve uzun bir fermantasyon ile gluten ağının oluşması ile başlıyordu. Yavaş karıştırma ve uzun süren fermantasyon nedeniyle ekmeklerin çok güzel bir aroması vardı. Daha sonra fermente olmuş hamur el ile parçalara bölünüyordu. Mayalanan hamur dinlenmesi için biraz daha bekletiliyordu ve bir gece mayalandırılan hamur ertesı sabah pişiriliyordu (Decock ve Cappelle 2005).

Tahıla dayalı beslenmenin hakim olduğu ülkemizde günlük besin ihtiyaçlarının karşılanmasında çok önemli bir yeri olan ekmeğin, ülkede günlük kalori gereksiniminin %44'ünü karşılamaktadır (Karaoğlu ve Kotancılar 2005).

Ekmeğin besin değeri; yapıldığı una ve formülasyonundaki ingredientlerin cins ve miktarına bağlı değişmektedir. Karbonhidratça zengin bir gıda olan ekmekte, esmer ekmekler de daha az olmak kaydıyla % 50 oranında karbonhidrat, % 8,5-9,0 protein, % 3-3,5 yağ, %2,0 mineral madde, % 37 su bulunmaktadır (Kotancılar ve ark. 1995). Günlük ortalama 300 gram ekmeğin tüketen bir bireyin günlük ihtiyacı olan enerjinin % 30-36'sı, proteinin % 39-42'si, demirin % 12-48'i, kalsiyumun % 9-57'si, B₁ vitamininin % 27-63'ü, B₂ vitamininin % 15-27'si ve niasinin % 15-27'si tükettiği ekmeğin ile karşılanabilmektedir (Ercan ve Ekşi 1992).

2.2.1.Ekmeğin Yapımında Kullanılan Temel Hammaddeler

Ekmeğin, temel hammadde olarak buğday unu, maya, tuz ve suyun belli oranlarda karıştırılarak yoğurulması ve hamurun belirli süre ve sıcaklıkta fermente edilip daha sonra pişirilmesi ile elde edilen besleyici ve doyurucu bir gıda maddesidir (Elgün ve Ertugay 2011).

Ekmeğin hamuru, buğday unu, su ve diğer malzemelerin bileşmesi ile oluşan kapsamlı bir ağıdır. Buğday unu içindeki gluten, hamur ve ekmekte viskoelastik yapı oluşturmak için çok önemli bir proteindir. İstikrarlı ve güçlü bir ağ, iyi tat ve ekmekte daha uzun bir raf ömrü elde etmek için, bazı geliştiriciler glutenin yapısını güçlendirerek, dokuyu yumuşatıpışlemeyi optimize etmiştir. Amilaz, ksilanaz, transglütaminaz ve glikoz oksidazın hamurun özelliklerini etkileme kabiliyetine sahip olduğu ispatlanmıştır. Lipidler, gluten proteini ile etkileşime girerek, üç boyutlu ağ yapısının daha iyi bir mukavemetini oluştururlar (Peng ve ark. 2017)

Ekmeğin hamurunu proteinler, lipitler, karbonhidratlar, su ve hava hücreleri oluşturmaktadır. Üretim aşamaları sırasında hamur içeriklerinin birleşik bir yapı oluşturması son ürünün görünüşünü, tekstürünü, lezzetini, dayanıklılığını ve besin değerlerini belirlemektedir (Altınel 2008).

2.2.1.1.Un

Kaliteli bir ekmeğin yapımı için; ekmeğin yapım işlemlerinden karıştırma, fermantasyon ve oksidasyon sürelerinin ayarlanması oldukça önemlidir. Fakat bunların yanı sıra kimyasal, biyokimyasal ve reolojik testler önemli bir yer tutar. Bu yüzden ekmeğin temel hammaddesi olan un için gerekli testlerin yapılması ve özelliklerinin belirlenmesinin yararlı olacağı bilinmektedir (Doğan ve Ünal 1990; Altınel 2008).

Ekmeklerde beyaz renklilik genellikle kabul edilen bir özellik olduğundan ekmek yapımında kırmızı renkli buğdaylardan ziyade beyaz renkli buğday unları kullanılmaktadır (Coşkuner ve ark.1999).

Buğday unu temizlenmiş ve tavllanmış buğdayın öğütülmesi ile elde edilen yarı işlenmiş bir gıdadır. Unların rengi, protein miktarı, protein kalitesi, üniformitesi, su absorpsiyonu, yoğurma ve fermentasyon toleransı, hamurun gaz meydana getirme kabiliyeti, glutenin gaz tutma kapasitesi ve diastatik aktivitesi ekmeklik unların kalitesini gösteren başlıca kriterlerdir (Elgün ve Ertugay 2011).

Unun ekmekçilik kalitesini belirlerken son ürün özellikleri, varyetelerin protein miktarı ve kalitesi, hamur dayanıklılığı ve yoğurma özellikleri, zedelenmiş nişasta miktarı gibi özellikler dikkate alınmaktadır. Protein miktar ve kalitesi ekmek hacmini ve tekstür özelliklerini belirlemektedir. Protein kalitesi birbirinden farklı olan aynı protein içeriğine sahip iki un ekmek yapımında farklı performans göstermektedir. Farklı formülasyona sahip çok sayıda ekmek çeşidi vardır. Bu nedenle buğday unu kalitesi son ürüne göre tanımlanmalıdır (Carson and Edwards 2009; Şahin ve ark.2013).

2.2.1.2.Su

Ekmek bileşenlerinden su, diğer hamur bileşenlerinin karışmasını ve birbirleriyle etkileşime girmelerini sağlar. Hamura arzu edilen visko-elastik yapıyı kazandırır, fermentasyonun başlamasına ve devamına olanak sağlar ve son ürün kalitesi üzerinde etkili bir bileşendir. Organik ve inorganik birçok madde için çözücü olan su; hamurda tuz, şeker ve çözünen proteinler gibi hidrofilik bileşenleri çözer ve suda çözünmeyen proteinleri hidrate ederek glutenin oluşmasına katkı sağlar (Kent ve Evers 1994).

Ekmek yapımında kullanılacak su, mikroorganizmalardan arınmış, temiz, renksiz, kokusuz ve orta sertlikte olmalıdır. Eğer fazla sert sular kullanılırsa fermentasyonu sırasında oluşan ve mayanın çalışması için uygun bir ortam oluşturan asitler, nötralize olurlar. Sert suların kullanıldığı durumlarda olumsuz şartları giderebilmek için kullanılan maya miktarı artırılabilir, hamurun diastatik aktivitesini artırmak için malt katkısı yapılabilir ve hamura katılan gıda mayası azaltılabilir (Elgün ve Ertugay 2011). Çok yumuşak suların kullanılması ise, hamurdaki asitlik artışının nötralize edilememesi ve gluten proteinlerinin niteliklerinin bozulmasına sebep olur (Pylar 1988; Kaya 2007). Bu tip suların kullanıldığı hamurlarda iyileştirme yapmak için; suyun mineral kompozisyonu göz önüne alınarak hazırlanmış uygun maya gıdası eklenmeli ve hamurda kullanılan tuz miktarı artırılmalıdır. Ekmek yapımında kullanılacak olan en iyi su, orta sertlikte olan (50-100 ppm) sulardır (Elgün ve Ertugay 2011).

2.2.1.3.Tuz

Pişirme için esas maddelerden un ve su, ekmeğin genel yapısı ve ekmek içi yapısında etkili iken tuz; gluten ağını ve mayanın iyi bir hamur gelişimi için güçlenmesini sağlar (Struyf ve ark. 2017).

Ekmekçilikte kullanılan tuz; depolama sırasında topaklaşmayacak iyi bir granüle sahip olmalı, fiziksel olarak temiz, parlak ve beyaz olmalı, topaklaşmaya neden olacak higroskopik safsızlıklar içermemeli, hamurda ve üründe yağ oksidasyonunu ve ransiditeyi hızlandıran Cu ve Fe minerallerini ihtiva etmemeli ve su çözünürlüğü iyi olmalıdır (Elgün ve Ertugay 2011)

Tuz, ekmeğin çeşidine ve hamurdaki kullanım amacına göre %1-3 oranında ekmek hamuruna ilave edilebilmektedir (Kaya 2007).

2.2.1.4.Maya

Ekmek mayası hamurdaki basit şekerleri kullanarak fermentasyon yapar ve fermentasyon sonucu oluşan CO₂ ile hamurun kabarmasını sağlar. Fermentasyon ürünü diğer bileşenler ile de hamurun olgunlaşmasından ve aroma oluşumundan sorumlu olan mikroorganizma *Saccharomyces* cinsine ait *Saccharomyces cerevisiae*'dir (Elgün ve Ertugay 2011).

S. cerevisiae maya hücreleri fermentasyon için substrat olarak maltoz yerine glikoz ve fruktozu tercih etmektedir. Bu nedenle, glukoamilaz ve α -glukosidaz gibi glikoz üreten enzimler maya hücrelerinin fermentasyon oranını α -amilaz gibi maltoz üreten enzimden farklı şekilde etkileyebilir. Yüksek glikoz seviyeleri, maya hücrelerini glikoz / fruktozdan maltoz tüketimine yönlendirirken, yüksek maltoz seviyeleri fermentasyon oranını etkileyip doğrudan doğruya fermentasyon işleminin başlangıcından itibaren CO₂ üretim oranını artırabilir (Struyf ve ark. 2017).

Fırınlama proseslerinin çoğu, *Saccharomyces cerevisiae*'nin baskın olduğu fermentasyon ile ilişkilidir (Heitmann ve ark. 2015). Mükemmel işleme özelliklerine sahip bir fırıncı mayası, hamurun homojen bir şekilde kabarmasını sağlamalı, iyi bir lezzet üreticisi olmalı ve geniş bir sıcaklık aralığına, bazen değişen pH, şeker ve tuz konsantrasyonuna dayanıklı olmalıdır (Linko ve ark. 1997). Bu nedenle, ekmek yapımında önemli bir adım olan fermentasyon, nihai ürünün raf ömrü, dokusu, tat ve lezzetinin geliştirilmesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Mayalar ayrıca her bir fırın ürününün üretimi, kalitesi ve güvenliği üzerinde de etkili olabilmektedirler (Fleet 2007).

Maya üreme hızı 20°C'den düşük ve 40°C'den yüksek sıcaklıklarda önemli ölçüde azalır. Maya hücrelerinin geliştiği optimum sıcaklık 20-27°C'ler arasındadır. Mayaların

ekmek hamurunda optimum şekilde çalışması için ortamın pH'sı 4-6 arasında olmalıdır (Özkaya ve Özkaya 1994).

2.2.1.5.Diğer Katkı Maddeleri

Üretici açısından kayıp ve atıkların azaltılarak verimin artırılması; tüketici açısından ise güvenilirliğin ve sipariş kolaylığının sağlanarak standardizasyonun uygulanabilmesi için katkı maddelerinin kullanılması gerekli görülmektedir.

Katkı maddeleri ekmeğe, ekmeğin raf ömrünü uzatmak ya da besin değerini yükseltmek ve yapısını geliştirmek amacıyla katılabilmektedir. Raf ömrünü uzatmak için katılan gluten, soya unu, malt unu, patates unu, bitkisel yağlar ile lesitin, yağ asitlerinin mono ve di-gliserid esterleri, sitrik asit, laktik asit gibi yüzey aktif maddeler ekmeğin yapısında bulunan protein içeriğini artırmakta ya da protein ve nişasta özelliklerini iyileştirmektedir. Ekmeğin besin değerini yükseltmek amacı ile ise; enzimler, süt tozu, şeker, ait düzenleyici, stabilizerler, sorbik asit, mineral maddeler ve tuzlar eklenebilmektedir (Cabı 1992;Göçmen 1996).

Çok eski zamanlardan beri ekmek yapımında temel hammaddelerin dışında; şeker, yağ, bazı baharatlar ve bitkiler gibi çeşitli maddeler de kullanılmıştır. Değişik özellik ve yapılarıdaki ekmekleri üretmenin bir yolu da imalat yöntemlerinde bazı değişikliklerin geliştirilmesidir. Ekmek yapımında katkı maddeleri diye tanımladığımız sağlığa zararsız doğal veya doğala özdeş maddeler geçmişten beri kullanılmaktadır (Cabı 1992; Pala 2012)

Süt ürünleri, besleyici ve fonksiyonel özellikleri artırmak için fırın ürünlerine çeşitli formlarda (tam yağlı süt tozu, yağsız süt tozu, peyniraltı suyu tozu ve / veya peynir altı suyu protein konsantreleri) ilave edilir. Böylelikle fırın ürünlerinin kalsiyum ve protein içeriği artmakta ve fırın ürünleri lizin, metionin ve triptofan dahil olmak üzere gerekli aminoasitler açısından zenginleşmektedir (Bilgin ve ark. 2006).

Nohudun lif, karbonhidrat, elzem aminoasitlerden lizin-lösin, vitaminler ve mineral maddelerce (Fe, Mo, Mn) zengin bir besin maddesi olması sebebi ile ekmeğe ilave edilerek ekmeğin besleyici değeri yükseltilmektedir. Ayrıca nohut proteinlerinin emülsifiye edici olma ve kabarmayı destekleme gibi fonksiyonel özelliklerinden ekmek yapımında yararlanılmaktadır.Fermente edilmiş nohudun buğday ununa ilave edilmesi ile ekmeğin besin kalitesi artırılırken raf ömrü de uzatılmaktadır. Nohut fermantasyonunda *Bacillus* ve *Clostridium* türleri aktivite göstererek bu ekmekleri diğer ekşi mayalı ekmeklerden ayırmaktadır (Erginkaya ve ark. 2016).

Giderek artan ekmek israfına çözüm arayışları artarken maya yanında laktik starter ve şerbetçi otu kullanımı ekmek kalitesini düzeltip ekmek bayatlamasını azaltacağı düşünülmektedir (Göçmen 1996).

Ekmek hamuruna amilolitik ve proteolitik enzimlerin yanı sıra bazı suda çözünen proteinler, mineraller ve çeşitli aroma maddeleriyle fırın ürünlerinde maya aktivitesini artıran malt unu ilave edilerek, tat ve aromaya katkı sağlamaktadır. Malt unu ilavesi ile fonksiyonel özellikleri iyileştirilen hamurda gaz üretimi artar, kabuk rengini geliştir ve ekmek içi rutubetin korunmasını sağlamaktadır(Hruskova ve ark. 2003; Boz 2008).

2.2.2.Ekmek Yapım Teknolojisi

2.2.2.1.Yoğurma

Ekmek üretimdeki ilk işlem olan yoğurma, hamuru oluşturmak için çeşitli ingredientlerin homojen bir şekilde karıştırılması ve en iyi şekilde hamur elde etmek üzere gerçekleştirilen bir işlemdir (Elgün ve Ertugay 2011). Yoğurma işlemi ile hamur ortamındaki moleküller arası mesafe azalarak farklı yüzeylerin birbirlerine yaklaşması sağlanır. Yapılan bu fiziksel etki ile temel proteinlerdeki aktif gruplar belirli doğrultular üzerinde yönlendirilir ve birbirlerine yaklaştırılmaları sağlanır. Aktif gruplar arasında S-S, iyon, hidrojen ve Van der Waals bağları oluşturularak gluten ağı meydana gelmesi temel amaçtır (Dizlek 2011). Böylelikle hamura arzu edilen vizkoelastik özellikleri vermek koşulu ile glutenin optimum derecede gelişmesi sağlanır. Hamurun homojen bir hale gelmesi undan unda değişmektedir. Absorbsiyon kuvveti, ingredientler, yoğurma hızı, sıcaklık ve un kalitesi yoğurma süresini etkileyen faktörlerdir (Elgün ve Ertugay 2011).

Ekmek yapımında kullanılan un kuvvetli ise glutenin yapısını mekanik şekilde yumuşatmak amacıyla yoğurma işlemi daha uzun tutulabilir. Sürenin artması durumunda hamurun işlenebilirlik özelliklerinin azaldığı da belirtilmiştir (Coşkuner ve ark. 1999).

2.2.2.2.Fermentasyon

Ekmek hamur fermentasyonu; maya ve LAB (*Lb.sanfrancisco*, *Lb.fermantatum* ve *Lb.fructivorans*)'ın metabolik aktiviteleri sonucu meydana gelmektedir. Maya fermentasyonu ile ortamda bulunan şekerler kullanılır ve CO₂ gazı oluşumu ile hamur hacmi artar, ortam pH'sı azalır. Bunun yanında nişasta ve proteinin hidrolizi sonucu glutenin yumuşaması ve hamur özelliklerinin değişmesi sağlanır (Erkmen 2011).

Fermentasyonda etkili olan esas enzimler karbonhidratlara etki eden enzimlerdir. Bunlar unda bulunan alfa-amilaz ve beta-amilaz, mayadaki maltaz, invertaz ve zimaz kompleksidir. Zimaz, içerisinde 14 çeşit enzim ihtiva eden bir enzim kompleksidir. Unun nişastası, amilaz enzimleri tarafından disakkarit ve maltoza ayrılır; maltoz, maltaz tarafından

glukoza ayrılır; glikoz ve fruktoz, zimaz kompleksi ile karbon dioksit ve alkole fermente edilir. Un içerisindeki nişasta granüllerinden bazıları öğütme işlemi sırasında mekanik hasar görür ve bu hasarlı granüller un amilazları tarafından tutulabilir. Bu nedenle, unun fermentasyon esnasında şekere parçalanması için yeterli miktarda zarar görmüş nişasta içermesi şarttır. Amilaz enzimleri zarar gören nişastayı parçaladığında, nişasta ile bağlı olan su salınır ve hamurun yumuşamasına neden olur. Salınan su miktarı yalnızca hasar gören nişasta seviyesine değil ayrıca alfa-amilaz aktivitesine, fermentasyon süresinin uzunluğuna ve hamur sıcaklığına bağlıdır. Fermentasyon sırasında, 100 kg un başına yaklaşık 0,8 kg alkol üretilir, ancak bunun çoğu fırınlama işlemi sırasında uçar. Yani ekmeğin yaklaşık% 0,3 alkol içerdiği söylenebilir. Fermentasyon sırasında meydana gelen ikincil ürünler olan asitler, karboniller ve esterler, gluteni etkiler veya ekmeğe lezzet katarlar (Kent ve Evers 1994).

2.2.2.3.Hamurun Şekillendirilmesi

Yapılan ekmek çeşidine bağlı olarak 2-10 mm arasında olmak kaydı ile hamurun düzleştirilmesi ve tabaka haline getirilerek yapıdaki gazların uzaklaştırılması işlemidir. Hamur kalınlığı pişme üzerinde etkili önemli bir faktördür (Coşkuner ve ark. 1999).

Hamurun şekillendirilmesi fermentasyondan sonra ve tavalama işleminden önce gerçekleştirilen bir işlemdir. Şekil vermek için hamur kuru, yumuşak ve uzayabilir olmalıdır (Elgün ve Ertugay 2011).

2.2.2.4.Pişirme

Ekmeğin pişirilmesi sırasında ekmek ana bileşeni olan nişastanın jelatinizasyonu gerçekleşir. Jelatinizasyon büyük bir yapısal değişiklik ile meydana gelir. Şişmiş nişasta granülleri ve kısmen çözülmüş nişasta, ekmeğin yapısal elemanları olarak önemli rol oynamaktadır. Buğdayın diğer bir önemli bileşeni olan protein, hamurda viskoelastik oluşumundan sorumludur. Pişirme işleminde, gluten polimerizasyon yoluyla bir jelden koagele dönüşür; bu da jelin yapışkanlığını kaybettiği anlamına gelir. Böylece, hamurdan ekmeğe dönüşüm sırasında hem nişasta hem de protein fraksiyonunda değişiklikler meydana gelmektedir. Makroskopik seviyede, pişirme, hamurun katılaşmasını ve gaz hücreli köpük tipi bir sisteminden açık bir gözenek sistemi şekline dönüşmesini sağlar (Hug-İten ve ark. 1999).

2.3. Ekmeğin Bayatlaması ve Nişastanın Retrogradasyonu

Genel anlamda bayatlama ekmeğin mikrobiyolojik bir bozulma olmadan tüketici tarafından beğenilirliğinin azalması olarak tanımlanabilir. Bayatlama olayı ortamdaki rutubet miktarı arttıkça hızlanmaktadır. Ekmeğin bayatlaması kabuk ve ekmek içi bayatlaması olarak tanımlanabilir. Kabuğun bayatlaması ekmek içindeki nemin kabuğa geçişi ile

gözlemlenir. Ekmek içi bayatlaması ise nişastanın retrogradasyonu ile yani çok daha kompleks bir şekilde olur (Elgün ve Ertugay 2011).

Ekmeğin soğutulması ve eskimesi sırasında nişasta fraksiyonunda bir dizi değişiklik meydana gelir. Jelleşme ve kristalizasyonu da içeren bu dönüşüme nişastanın retrogradasyonu denir (Hug-Iten ve ark. 1999).

Taze ekmek içi, esnek elastik hücre duvarlarına sahip gözenekli bir yapıda olmalıdır. Bayatlama testleri ile belirlendiği üzere taze ekmek içinin sertliği düşüktür çünkü nişasta ve protein yumuşatıcı olarak yüksek seviyelerdeki su nedeniyle plastik haldedir. Bayatlama esnasında ekmek içinde tipik değişiklikler meydana gelerek sıklığın ve kırılabilirliğin arttığı gözlemlenmektedir (Hug-Iten ve ark. 2003).

Pişirme süresi ve sıcaklığı ekmeğin morfolojisini, doku ve kalitesini (belirli hacim, kabuk rengi, kabuk / ekmek içi oranı, kabuk sertliği ve nem içeriği) etkilemektedir. Bu morfoloji, ekmeğin bayatlaması sırasında nem transferinin kinetiğini ve dolayısıyla mekanik özellikleri etkiler (Besbes ve ark. 2014). Ekmek içi bayatlama kinetiği ekmek içindeki nem dağılımı ile yakından ilişkilidir. Bu yüzden gluten içeriği, nişasta jelatinleşme derecesi ve bayatlamayı önleyici madde eklenmesi bayatlamayı etkilemektedir (Błaszczak ve ark. 2004).

Ekmek karakterizasyonu olarak kabul edilebilen farklı fiziksel özellikler arasında porozite sadece ekmek içi maddesinin mekanik özellikleri için değil aynı zamanda ürün içindeki nem aktarımı için de önem taşır (Besbes ve ark. 2014). Błaszczak ve ark. (2004)'de yaptığı çalışmada bayatlama sırasında porozitenin azaldığını ve ekmek içi gözeneklerinin daha küçük ve yuvarlak olduğunu bildirmiştir. Ekmek içi yumuşaklığın zamanla azalması, bayatlamının önemli bir belirtisidir. Çeşitli un bileşenlerinin ekmek bayatlama oranını etkilediği iyi bilinmektedir. Yüksek protein içeriğinin, ekmek içi bayatlamayı geciktirdiği bildirilmiştir. Yine un pentozanlarının ekmek bayatlama oranı üzerinde hidratlı film tabakaları oluşturmak için gluten ile etkileşerek azaltıcı bir etki yaptığını, böylece hamurun su emilimini arttırdığını ve bunun da ekmek içi yumuşak dokusuna katkıda bulunduğunu göstermiştir. Ekmek hamuru yaparken su kaldırma kapasitesinin yüksek olması daha yumuşak bir ekmek içine ve daha geç bayatlamaya neden olmaktadır (Rogers ve ark 1988; Bhattacharya ve ark. 2002). Ekmek içi bayatlamının geciktirilmesi için ekmek içi nem miktarının korunması gerektiği belirtilmiştir (Piazza ve ark 1995; Bhattacharya ve ark. 2002).

Nişasta retrogradasyonu nişastanın dönüşümüne ve nişasta-gluten etkileşimlerine dolayısıyla ekmek içi bayatlamasına yol açmaktadır. Çişişlenmiş nişasta granüllerinin içinde bulunan dallı amilopektinin yavaş şekildeki retrogradasyonu ekmek bayatlamasının başlıca

nedeni olarak görülse de amilozun intra- ve granüller arası ağlar oluşturan sisteminde bayatlamaya neden olduğu bildirilmiştir (Blaszczak ve ark. 2004).

İki nişasta polimeri olan amiloz ve amilopektinin nişasta retrogradasyon kinetiği önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Saf amiloz solüsyonları saatler içinde jel verirken, amilopektin solüsyonlarının jelleşmesi birkaç gün gerektirir (Miles ve ark. 1985; Hug-Iten ve ark. 2003). Ekmeğin bayatlaması birkaç gün içinde meydana geldiğinden, bayatlamadan amilopektin fraksiyonundaki değişikliklerin sorumlu olduğu belirtilmektedir (Zobel ve Kulp 1996; Hug-Iten ve ark. 2003).

Aissave ark.(2010) yaptığı çalışmada pişirme süresinin, amiloz ve amilopektin arasındaki faz ayrımının derecesini etkilediğini ve bu nedenle pişirmeden sonra ve depolama sırasında ekmek içi maddesinin mekanik özellikleri ile etkileşime girdiğini bildirmiştir. Çözünür amiloz miktarının fırınlama süresi ile birlikte arttığı gözlemlenmiştir. Nişasta polimerlerinin retrogradasyonu ekmeğin bayatlamasının ana sebeplerindendir. Taze ekmeğin x-ışını kırınım desenleri, yeni jelatinleştirilmiş buğday nişastasına benzerken bayat ekmek desenleri ise retrograde olmuş nişasta desenlerine benzemektedir. Bu bulgu, nişasta bileşenlerinde amorfumsu formlardan kristal formlara kademeli bir değişikliğin bayatlama süreci için önem taşıdığı hipotezine yol açmıştır (Gray ve Bemiller 2003). Nişasta jellerinde kristalleşme gelişme oranının ekmek bayatlama hızına benzer olduğu kanıtlanmıştır (Hellman ve ark 1954; Gray ve Bemiller 2003).

2.4.Karbonhidratların Enzimatik Hidrolizasyonu

2.4.1. Enzimatik Hidroliz ve Asit Hidrolizi

Nişastanın geleneksel olarak asit kullanarak hidroliz yöntemi dünya enzim pazarında yaklaşık %15 pay oluşturan nişasta sakkarifikasyon enzimlerinin kullanıldığı işlemlerle değiştirilmiştir (Kunamneni ve Singh 2005).

Enzimatik hidroliz asit veya alkali hidrolizlerle karşılaştırıldığında; düşük toksisite, düşük maliyet yararlılığı ve düşük korozyon nedenleriyle avantajlı bir uygulamadır. Ayrıca enzimatik hidrolizde inhibitör yan ürünler de oluşmaz. Asit hidrolizi sonucunda asetik asit, furfural ve 5 hidroksimetilfurfural gibi çeşitli yan ürünler meydana gelmektedir. Bu ürünler mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir. Dolayısıyla fermentasyon için kullanılacak hidrolizatların detoksifiye işlemine tabi tutulması gerekmektedir. (Sarkar ve ark. 2012)

Kimyasal hidroliz, biyokütlenin endüstriyel ölçekte sürekli işlenmesi için çok uygundur. Ancak, biyokütleyi şekere hidrolize etmek için yararlanılan fermantasyon aşamasında birbirini izleyen basamaklarda önemli ölçüde yan ürünler meydana gelmektedir (Balat 2011; Taherzadeh ve Karimi 2007; Patel ve ark. 2017).

Ligno-selülozik hammaddelerden biyoetanol üretiminde kimyasal hidroliz, enzimatik hidroliz ve her biri için varyasyonlara sahip termokimyasal süreçler olmak üzere üç tür hidroliz işlemi vardır (Majia ve ark 2012; Mukthama ve ark. 2012). En yaygın işlem asit hidrolizi olup, neredeyse her asit kullanılabilir. Reaksiyon sıcaklığı, asit konsantrasyonu ve reaksiyon zamanı gibi önemli parametreler, şekerlerin dönüşümü ve verimini belirler. Daha sonraki mikrobiyolojik fermantasyonda hidrolizatın toplanması için kimyasal olarak muamele edilmiş biyokütlenin nötralizasyonu veya kondenzasyonu bir ön şarttır. Şu anda, biyokütle ön-muamele teknolojileri, büyük miktarda su kullanımı ve işlem materyalinin 100-200°C ön işleme sıcaklıklarına kadar ısıtılması gereği nedeniyle enerji gerektirmektedir (Jorgensen ve ark, 2007; Mukthama ve ark. 2012). Buna ek olarak, dönüştürme işlemine müteakip biyo-rafineri proseslerinde toksik olan tuzların ve inhibitörlerin birikmesine neden olur. Bu nedenle, lignoselülozlu biyokütlenin etanole dönüştürülmesi hem ön hidrolizin terimlerinin optimizasyonu yoluyla hem de şeker verimini en üst düzeye çıkararak ve enerji ihtiyacını en aza indirgeyerek elde edilen etkili ön işlem teknolojisini gerektirmektedir (Mukthama ve ark. 2012).

Son zamanlarda, biyolojik olarak parçalanabilir nanokompozitlerin mekanik özelliklerini arttırmak için asit hidroliziyle hazırlanan nişasta nanopartikülleri çok dikkat çekmektedir (Jiang ve ark. 2016). Asit konsantrasyonu, türü ve hidroliz zamanı nişastanın mikroyapı ve fonksiyon özelliklerini etkileyebilir (Wang ve ark.2003;Chen ve ark. 2017). Tek asit modifikasyonu ile karşılaştırıldığında, kombine modifikasyon yöntemleri nişasta yapısını ve işlevselliğini değiştirmek için, özellikle dirençli nişasta oluşumu için yaygın olarak kullanılır. Örneğin, hidrotermal modifikasyonlar ile birlikte asit hidrolizi dirençli nişastanın oluşumuna fayda sağlayabilir (Zavareze ve Dias, 2011; Chen ve ark. 2017). Ayrıca, otoklavlama işlemi ile asit hidrolizi ardından β -amilaz ile nişastanın sindirilebilirliğini önemli ölçüde azaltabilir (Song ve ark 2010; Chen ve ark. 2017). Bu kombine modifikasyon yöntemleri, modifiye nişastaların gıda ve malzemelerdeki endüstriyel uygulamalarını daha da genişletecektir.

2.4.2.Enzimatik Hidrolizin Reoloji ile İlişkisi

Gıda endüstrisinde, sıvılar için termal proses tasarımları, emniyet ve ürün kalitesini sağlayan işleme koşullarını geliştirmek için akış davranışları hakkında kesin bilgi sahibi olunması gerekmektedir. Reolojik özellikler, viskoz veya yarı sıvı gıdalar gibi pompalanabilir sıvılardaki akış özelliklerinde büyük rol oynadığı için sıvıların viskozitesine ve yoğunluğuna bağlı sürekli bir işleme yöntemleri gereklidir. (Marcotte ve ark. 2001; Jiang 2016). Bu

nedenle, yeni nanopartiküller içeren süspansiyonların saptanan reolojik özelliklerine daha fazla dikkat etmek önemlidir (Jiang 2016).

Tayal ve ark. (1997) enzimatik hidrolizin mısır bulamacı gibi çözeltilerin viskozitesini zamanla önemli ölçüde düşürdüğünü bildirmiştir. Başlangıç materyali enzim hareketi ile azaldığından, yüksek sıcaklıklarda önemli viskozite azalmaları görüldüğünü bulmuşlardır. Viskozitedeki bazı düşüşlerin yaygın reaksiyon sıcaklıklarından çok daha düşük sıcaklıklarda da bile gerçekleştiğini ifade etmiştir.

Dunaway ve ark (2010) yaptığı çalışmada mısır bulamacındaki selülozun enzimatik hidrolizi sırasındaki viskozite değişimini incelemiştir. Viskozite değişiklik eğilimlerinin iki fazda ortaya çıktığı ve viskozite eğilimindeki en büyük değişikliğin ilk 8 saatte gerçekleştiği bildirilmiştir. Viskozite değişim hızı ilk 8 saatten sonra hızla azalır, sonuçta reaksiyon 168 saate yaklaştığında kararlı bir değere ulaşır. Bulamacın başlangıçta psödoplastik davranış sergilemekte ve kuru maddenin çoğunun hidrolizinden sonra reaksiyonda dilatant davranış sergilendiği bildirilmiştir.

Enzimatik hidrolizde kullanılan tepki yüzeyi metodolojisi, bir veya daha fazla seçilmiş kriterlere göre, kontrollü deneysel faktörlerin bir kümesi ile ölçülen cevaplar arasındaki mevcut ilişkilerin değerlendirilmesine ayrılmış ampirik teknikler grubundan oluşur. Daha gerçekçi bir model elde etmek için sürecin önceden edinilmiş bilgi ve incelenen süreç değişkenleri gereklidir. Önceki deneylerde elde edilen sonuçlara dayanarak, maksimum dönüştürme etkinliği için ön-işlem, α -amilaz dozu, glukoamilaz dozu ve sakarifikasyon sıcaklığı önemli değişkenlerdir. Bu nedenle, bu değişkenler, merkezi kompozit tasarım ve tepki yüzeyi metodolojisini kullanarak daha yüksek dönüştürme verimliliği için optimize edilmiş koşulları belirlemek üzere seçilmektedir.

Enzimler, gamların düşük viskoziteli bir sıvıya hidrolize edilmesi için etkili bir yöntem sunar. Tayal ve ark. (1997) yaptığı çalışmada enzimlerin kapasiteleri ve sınırlamaları hakkında temel bilgileri elde etmek için steady shear rheometri metodunu kullanılmıştır. Ticari ve yeni termostabil enzimlerin polimer viskozitesi üzerindeki etkisi, hidroliz sıcaklığı, solüsyonun pH değeri ve enzim konsantrasyonu gibi proses değişkenleri açısından araştırılmıştır. Ticari enzimin, hafif asidik koşullarda ve 60°C'ye kadar gamların hidrolizinde etkili olduğu bildirilmiştir. 60°C'nin üstünde, gam solüsyonlarının hidroliz derecesinin azaldığı ve sıcaklık arttıkça, enzimatik aktivite arttığı ancak enzim stabilitesinin azaldığı belirtilmiştir. Önceden ısıtılmış enzim solüsyonları ile yapılan deneylerde daha düşük viskozite düşüşü ortaya çıkmıştır. Bu sonuca göre enzimin ısınması sırasında hidrolizin çoğunun gerçekleştiği ve bunun ardından enzimlerin hızla deaktive olduğu bildirilmiştir.

Enzim sistemi ile yapılan benzer deneyler, yükseltilmiş sıcaklıklarda (85°C'ye kadar) yüksek viskozite azalması ve ortam koşullarında sınırlı viskozite azalması göstermiştir.

2.4.3. Nişastanın Enzimatik Hidrolizasyonu

Başlangıçta, insan tüketimi dışında kullanılan nişasta, papirüs ve kâğıt kullanımı için jelatinleştirilmiştir. Bu uygulama, sirke ile asit hidrolizi yani dekstrinleşme adı altında anılmaktadır. Kirchhoff nişastanın asit katalizli sakkarifikasyonunu anlatan, nişastaların asit katalizli bozunması üzerine sistematik bir çalışma dönemi başlatmıştır.

Nişasta stabil olmayan bir sisteme sahiptir. Nemli depolama şartlarında nişastanın granülleri, granüller içerisinde doğal olarak bulunan enzimler tarafından otolize tabi tutulur. 20.yüzyılın ikinci yarısından itibaren nişasta granüllerinin enzimatik hidrolize eğilimli olduğu gözlemlenmeye başlamıştır. Bu aşamadaki kilometre taşlarından biri, Amerika da elma suyunun enzimatik arındırılması için yapılan çalışmadır. Bu çalışma ile nişastayı hidrolize eden enzimlerin çevrede ve canlı organizmalarda ortak olduğu açık bir şekilde ortaya çıkmıştır (Tomasika ve Horton 2012).

Yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen nişasta selüloz ve hemiselülozların yanında doğada en bol bulunan biyopolimerdir. 17. yüzyıldan günümüze kadar olan dönemde, çeşitli bitki kökenli yerli ve modifiye nişastalardan, teknolojinin ve beslenmenin çok sayıda alanındaki uygulamaları hakkında on binlerce makale yayınlanmıştır. Doğal, fosil olmayan kaynaklardan gelen ürünler, potansiyel kaynak materyali olarak polisakkaritleri hedef almıştır. Avrupa Birliği fosil kaynaklı materyallerin kullanımını sınırlayabilen ve hatta onları ortadan kaldıracak umut verici ve çok yönlü bir kaynak olarak nişastayı belirlemektedir. Bu tür proseslerin geliştirilmesi için çok çeşitli olasılıklar, nişastanın enzimatik dönüşümleri ile sunulmaktadır. Asit ve bazla katalize edilmiş enzimatik dönüşümlerin avantajı seçiciliklerinden kaynaklanmaktadır. Nişasta, teknolojik olarak yararlı mikroorganizmalar için bir besin maddesi olarak kullanılır. Nişastanın enzimatik dönüşümlerinde, izole edilmiş tekli enzimler veya bunların karışımları, mikroorganizmalar gibi enzim üreticileri, bitki dokusu parçaları, hayvan vücut sıvıları ve hayvan organlarını kullanabilir. Bitki atığındaki ham mısır nişastası (biyokütle) ve sözde yeşil plastik, yani, nişasta gibi biyopolimerleri ile oluşturulan sentetik plastikler de enzimatik olarak bozundurulabilir (Tomasikave Horton 2012)

Ekmek, nişasta bakımından zengindir ve ayrıca proteinler ve diğer besin maddelerini de içerir. Bu nedenle modifikasyondan sonra fermantasyon substratı olarak uygun bir materyaldir. Büyük makromoleküllerin, mikroorganizmaların kullanımı için daha küçük ünitelere indirgenmesi gerekir. Bu nedenle gerekli olan glikoz, azot ve minerallerden zengin

bir hidrolizatın hazırlanması, daha sonra uygun biyolojik dönüşümü ile arzu edilen herhangi bir ürüne dönüştürülebilecektir. Atık ekmeği besin açısından zengin bir hidrolizata çevirmenin en önemli yollarından birisi enzimlerin kullanımınıdır. Bu yöntem maliyetli olabilir fakat aynı zamanda ticari enzimler nispeten saf halde satılmaktadır. Atık ekmekten besin açısından eksiksiz zengin bir hidrolizat hazırlamak için nişasta hidrolizinde amilaz ve glukoamilazlar, protein hidrolizinde proteazlar vb. kullanılmaktadır (Melikoğlu ve Webb 2013).

Nişastanın amilazlar tarafından hidroliz hızı, selülozlar tarafından endüstriyel işleme koşullarında selülozun hidroliz olma oranından 100 kat daha hızlıdır. Bu nedenle Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Avrupa'daki etanol üretiminin ana üretim malzemesidir (Biolas ve ark. 2010).

Endüstriyel bir ham madde olan nişastalı biyokütlenin kullanımı amilazlar ile doğrudan ilişkilidir. Kuru bazda, mısır, buğday, sorgum ve diğer hububat taneleri gibi tarımsal substratlar, önemli bir verim ile glikoza hidroliz edilebilen yaklaşık % 60 /% 75 oranında nişasta içerir ve birçok fermantasyon prosesi için iyi birer kaynaktır (Soni ve ark. 2003).

Nişastanın basit şekerlere enzimatik olarak hidrolize edilmesi; jelatinleştirme, sıvılaştırma ve sakarifikasyon aşamalarından oluşan önemli bir endüstriyel procestir. Büyük çaplı nişasta işleme sanayi, geçen yüzyılda önem kazanmaya başlamıştır. Nişastanın enzimatik sıvılaştırılması için çift cidarlı ekstruder daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekstrüzyon işlemi, glukoz şurubu üretimi veya sakkarifikasyon süresini azaltarak fermentasyona substrat hazırlaması için farklı nişasta türlerinin sıvılaştırılmasında kullanılmıştır (Harper 1989; Myat ve Ryu 2013). Arpa nişastası, çift cidarlı ekstrüderde *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz ile sıvılaştırılmış ve daha sonra sıvılaştırılmış şurup, *Aspergillus niger* kaynaklı glukoamilaz kullanılarak şekerleştirilmiştir (Linko ve ark 1983; Myat ve Ryu 2013). Başlangıç kuru madde içeriği % 50-60 (w / w) olan mısır ve buğday gibi diğer hububat nişastalarının sıvılaştırılması, termostabil α -amilaz ilavesi ve çift cidarlı ekstrüder kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Linko 1983; Myat ve Ryu 2013). Endüstride, %30-35 kuru madde içeren mısır nişastası ile bir nişasta bulamacı hazırlanır ve basınç altında 100-175°C'de enzimatik hidrolizi gerçekleştirilir (Van der ve ark 2002; Myat ve Ryu 2013). Şurupların endüstriyel olarak üretilmesi sırasında, termostabil α -amilaz tipik olarak nişasta bulamaçlarına 90-165°C arasındaki sıcaklıklarda ilave edilir. Bu bulamaçlar 1-3 saat 90 ° C'de tutulur ve daha sonra glukoamilaz ilavesiyle 60°C'ye soğutulur (Robertson ve ark. 2006; Li ve ark. 2016). Geleneksel yöntemin sıcaklık gereksinimleri önemli bir ekonomik dezavantajdır.

Geleneksel şekilde uygulanan sıvılaştırma işlemlerinde büyük miktarda enerji kullanır (Gibreel ve ark. 2009).

Enzimatik hidroliz sırasında substrat konsantrasyonunun arttırılması, daha yüksek üretkenlik ve daha yüksek enzim kararlılığı sağlayabilir (De Cordt 1994; Van der ve ark. 2002; Myat ve Ryu 2013). Nişasta konsantrasyonu arttıkça, tam jelatinizasyona erişmek için gereken sıcaklık hızla artar (Donovan 1979; Myat ve Ryu 2013). Ayrıca, nispeten düşük kuru madde içeriği olan nişasta bulamaçlarının kullanılması, sakkarifikasyondan sonra elde edilen hidrolizatın konsantre edilmesi gerekliliğinden dolayı fazla suyu buharlaştırmak için gereken enerji miktarını artıracaktır (Li ve ark.2015; Li ve ark 2016). Dolayısıyla, nişastanın şeker artığı içine enzimatik hidrolizini gerçekleştirmenin en etkili yollarından biri nişasta bulamacının başlangıç konsantrasyonunu arttırmak, böylece bulamacın nem içeriğini düşürmektir (Li ve ark. 2016).

Yüksek nişasta konsantrasyonlarında jelatinleştirme ve enzimatik hidrolize uygun bir yöntemin optimizasyonu için, tam jelatinleşmenin olup olmadığının bilinmesi önemlidir. Yüksek hidroliz oranı için enzimin hidroliz reaksiyonu sırasında halen aktif olup olmadığı ve hidroliz reaksiyonu için ne kadar zaman gerektiğine karar vermek için istenen ürünün oluşup oluşmadığı kontrol edilmelidir. Bu nedenle nişastanın enzimatik hidrolizasyonu sırasında; jelatinleşmenin, enzim aktivitesinin ve karbonhidrat bileşiminin derecesinin ölçülmesi esastır (Baks ve ark. 2008).

2.4.4. Nişastanın Enzimatik Hidrolizi için Kullanılan Enzimler

Nişasta işleme endüstrisi endüstriyel biyoteknoloji alanında oldukça önemlidir. Büyük ölçekli üretim için enzimlerin kullanımına tamamen bağımlıdır. Mısır, buğday veya tapyoka nişastası, termostabil alfa amilaz ile maltodekstrinlere hidroliz edilir ve daha sonra glucoamilaz ile glukozu sakkarafike edilir. Glukoz daha sonra doğrudan kimyasal sentez veya fermantasyon işlemleri için bir hammadde olarak kullanılabilir veya fruktoz için izomerize edilebilir (Cinelli ve ark. 2015).

Nişastanın hidrolizi için kombine asit-enzim işlemleri veya enzimatik kokteylleri kullanılmaktadır. Hidrolitik enzimler bir kokteyl şeklinde veya iki aşamalı olarak uygulanabilir. Sıklıkla enzim kombinasyonlarında kullanılan ve nişastayı daha verimli bir şekilde sindiren hidrolazlar arasında bir sinerji söz konusudur. Sinerjizm, mısır nişastasının sıvılaştırılmasında kullanılan *B. licheniformis* ve *B. stearothermophilus*'tan, pityalin ve pankreatin, pitalin ve malt amilaz ve pantreatin ile malt amilaz içeren termostabil enzimlerin kombinasyonu ile gösterildiği gibi, iki alfa amilaz arasında da gözlemlenebilir. Kullanılan kombinasyon ne olursa olsun, maltoz oluşmaktadır. Bakteriyel alfa amilaz ve arpa beta amilaz

arasındaki sinerjizm zayıf olmasına ve her iki enzimin oranına bağlı olmasına rağmen, alfa ve beta amilazlar arasındaki hidrolitik etkileşimde bir sinerji vardır. Siyah koji küfünden ekstrakte edilen amilaz enzimi çok düşük aktiviteye sahip olmasına karşın aynı kaynaktan elde edilen beta amilazın çok kuvvetli bir aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. pH 4,6 ve 21°C'de beta amilaz ile çözünür nişastanın% 15'e kadar hidrolizi ve alfa ve beta amilazların birlikte kullanıldığı kombinasyonlarda ise % 20-25'lik hidrolizi sağlanmaktadır. Tek başına kullanılan alfa amilaz için bu ilişki biraz belirsizdir. Nişastanın her iki enzim ile dönüşümü, çeşitli tuzların eklenmesiyle hızlandırılır ve bu kapsül, ancak her iki enzim de mevcut olduğunda çalışır. Tuzların beta amilaz tarafından üretilen dallı nişasta türevleri ile etkileşime girmesi ve böylece alfa amilazın aktivitesini kolaylaştırdığı ileri sürülmektedir. Alfa ve beta amilazların hidrolize edici etkisi hayvanlardaki pitalalin ve pankreatin ile etkili bir şekilde arttırılmıştır. Böylelikle maltoz verimi % 70'e kadar yükseltilebilmektedir (Tomosika ve Horton 2012).

Nişasta konsantrasyonunun artması nişastanın jelatinleşmesiyle alakalı işlemleri zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte, nihai nişasta bulamacının konsantrasyonunun arttırılması üretkenliği arttıracaktır (Baks ve ark. 2008). Bu aşamanın geliştirerek şurup üretim süreçlerini daha verimli hale getirme ihtiyacı vardır. Granüler veya pişmemiş nişastayı glukoz ve diğer şekerlere dönüştürmek için granüler nişasta hidrolizojenize edici enzimlerin kullanıldığı alternatif bir yöntem önerilmiştir (Bialas ve ark. 2008). Bu enzimler ticari olarak etanol üretimi prosesinde eş zamanlı olarak sakkarifikasyon ve fermantasyon sürecinde kullanılır (Wang ve ark. 2005,2007; Li ve ark. 2016).

Glukozidik hidrolazlar genel olarak modüler enzimlerdir ve çoğunlukla karbonhidrat bağlayıcı modüller olarak adlandırılır. Bu enzimler spesifik polisakkarit yüzeylerine bağlanmayı sağlayan katalitik olmayan yardımcı alanlar içerir. Aynı zamanda karbonhidrat bağlayıcı modüller çoğunlukla ham nişastaya bağlanma alanları içerir. Yaklaşık 100 çeşit amino asit kalıntısına sahip bu alanlar yaklaşık % 10 amilaz ve bunlarla ilgili enzimler de ihtiva etmektedir. Bunlar, α -amilazların, β -amilazın, glukoamilazın ve siklodekstrin glukanoziltransferazın C veya N-ucunda bulunurlar. Nişasta bağlanma alanları enzimin aktif bölgesindeki substrata bağlanarak nişasta granülünün yüzeyinde bozucu bir işlev gösterir. Dolayısıyla, ham nişasta parçalanma enzimleri genellikle nişasta bağlanma alanına sahiptir (Peng ve ark. 2014).

Granüllü nişasta hidrolizi için gerekli olan enzimler arasında, ana grup, nişasta polisakkaritleri ile glikoz arasında sinerjik hareket eden amilolitik enzimleri içerir. Amilolitik kompleks, endoamilazlar, ekzoamilazlar ve ayrışan enzimlerden oluşur. Diğer hidrolazların da

süreçte önemli bir rol oynadığını belirtmek önemlidir. Yardımcı hidrolazlar arasında selülazlar, ksilanazlar ve proteazlar bulunur ve bunların hareketi, ham nişastayı amilazlara maruz bırakmaya katkıda bulunur. Bu nedenle, amilazları ve yardımcı enzimleri içeren çoklu enzim komplekslerinin üretimi, granüllü nişasta hidrolizinin dönüşümünü ve fizibilitesini önemli derecede artırır (Cinelli ve ark. 2015).

Yüksek konsantrasyonlu çığ nişasta bulamaçlarının tam hidrolizi, çığ nişasta granüllerini parçalayan en az iki tip enzim gerektirir: 1,4- α -D-glukan glukanohidrolazı (α -amilaz, EC 3.2.1.1) ve 1,4- α -D glukan glukohidrolaz (glukoamilaz, EC 3.2.1.3). Normal olarak nişasta granülleri içindeki hidrolitik enzimlerin etkisi çok değildir. Çünkü granüller amilolitik sindirime karşı çok dirençlidir ve nişastanın bozunması için uzun bir hidroliz süresi gereklidir. Son zamanlarda biyolojik kombinasyon işlemleri kullanılarak, ham nişasta hidrolitik özelliklere sahip yüksek etkili enzim sistemleri, *Aspergillus kawachi*'den doğal olarak oluşan amilazları ve *Aspergillus niger*'den glikoamilazlardan oluşan yüksek etkili bir enzim sistemi meydana getirilmiştir ve bu özel nişasta hidrolize edici enzimlerin uygulanması, masraflı sıvılaştırma basamağını ortadan kaldırabilir (Biolas ve ark. 2010).

2.4.4.1. Alfa Amilaz (EC 3.2.1.1)

α -amilazlar, gıda, fermantasyon, tekstil, kağıt, deterjan ve ilaç endüstrisi gibi çok sayıda endüstriyel proseste potansiyel bir uygulama alanına sahiptir. Fungal ve bakteri amilazları farmasötik ve kimyasal endüstrisinde potansiyel olarak faydalı olabilir. Bununla birlikte, biyoteknolojideki gelişmelere paralel olarak, amilaz uygulaması klinik, tıbbi ve analitik kimya gibi pek çok alanda yaygınlaşmış olmasının yanı sıra, nişasta şekerlemesi ve tekstil, gıda, ve damıtma endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Souza ve Magalhães 2010).

Polisakkaritin enzimatik hidrolizi, iki temel enzim türü tarafından gerçekleştirilir. Endoenzim, substrat molekülünü rasgele bir şekilde iki küçük moleküle parçalarken eksoenzim substrat molekülünün indirgenmeyen ucundan bir monomer veya bir dimerler oluşturur. Genellikle, her iki enzim tipi de canlı hücrelerde polisakaritlerin biyolojik olarak parçalanması ve aynı zamanda nişasta ve selüloz gibi polisakarit kaynaklarının endüstriyel sakkarifikasyonunda birlikte çalışırlar (Fujii ve Kawamura 1985).

Dekstrinojenik amilaz olarak da adlandırılan alfa amilaz, amiloz ve amilopektin içindeki α -(1,4) bağlarını rastgele şekilde parçalayarak bunların endohidrolizini gerçekleştirir. Bu amilaz, amilozdan maltoz, maltotrioz ve daha yüksek oligosakaritler meydana getirirken bunun yanı sıra amilopektinden maltoz, glikoz ve limit dekstrinleri meydana getirir. (Wild 1954; Tomosika ve Horton 2012)

Alfa amilazlar nişastanın sıvılaştırılması ve sakkarifikasyonunda kullanılabilir. Birinci kategoride kullanılan amilazlar, nişastayı % 30-40 oranında hidrolize eder; İkincisi % 50-60'a kadar uzanmaktadır. Alfa amilazlar genellikle 6,7-7,0 pH aralığında en iyi performans gösterir ve alkaline ortamı asidik çözeltilerden daha iyi tolere eder. Aktiviteleri, sıcaklık artışı ile zamanla bozulmakta ve hidrolitik hareketi engelleyen glikoz ve maltoz gibi düşük moleküllü sakkaritlerin konsantrasyonunun artması ile bozulmaktadır (Hill ve ark. 1997; Tomosika ve Horton 2012)

Amilazların izole edilebileceği çok sayıda bakteri ve küf bulunur ancak en dikkatle incelenenler *Bacillus* ve *Thermomyces lanuginosus* suşlarıdır (Kunamneni ve Singh 2005).

Birçok endüstriyel alanda kullanılan termostabil α -amilaz *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces* ve birkaç *Bacillus* türü gibi ısıya dayanıklı bakteriler bu enzimin çok yönlü üreticisidir. Tanımlanan 48 kadar *Bacillus* türünden sadece 32'sinin α -amilaz üreticisi olduğu ve bunlardan çok az bir kısmının yüksek sıcaklıkta enzim aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. En yaygın *B.subtilis* türünün ısıya stabil α -amilaz ürettiği rapor edilmiştir (Medda ve Chandra 1980).

Bacillus licheniformis, pH 6 ile 7 arasında değişen 85°C'de en iyi performans gösteren, termostabil bir alfa amilazı üretmektedir. Bu bakterilerin bazı suşları (CUMC 305) ve *B. coagulans* CUMC 512, 91°C ve pH 9,5'te optimum çalışabilen, termostabil bir alfa amilazı üretmektedir. Bu enzim etkinliğini 110°C'de % 50'ye kadar muhafaza etmektedir. Bu enzimin 100°C'de kullanılma olasılığı da bulunmaktadır ve yüksek konsantrasyondaki substrat ve glukoz tarafından enzim aktivitesi engellenmektedir (Tomosika ve Horton 2012).

2.4.4.2. Glukoamilaz (EC 3.2.1.3)

Amilazlar, dünyada kullanılan ikinci en büyük enzim grubudur ve nişasta hidrolizinde son derece etkili olan çeşitleri de endüstriyel proseslerde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Birçok amilaz grubu enzimin en önemlilerinden biri, amiloglukosidazlar olarak da bilinen glikoamilazlar (EC 3.2.1.3 1,4-d-glukan glukohidrolaz), α -1,4 türünün glikozidik bağlarını hidrolize edebilen eksoamilazlardır. Zincirin indirgeyici olmayan ucundan glikoz birimlerinin birbiri ardına hidroliz edilmesi, D-glikoz moleküllerinin konformasyonda serbest bırakılmasını sağlar. Bu enzimler aynı zamanda çok düşük oranda da olsa α -1,6 bağlarını ve bazı α -1,3 türlerini hidrolize eder (Pasina ve ark. 2017).

Glukoamilazlar, dünya endüstriyel enzim pazarında satılan tüm amilazların yaklaşık % 25-33'ünü oluşturur (Souza ve Magalhães 2010; Pasina ve ark. 2017).

Fujii ve Kamawara (1984); yaptığı çalışmada α -amilaz ve glikoamilazın nişastanın hidrolizi üzerine sinerjik etkisi olduğunu belirtmiştir. α -amilaz, başlangıçtaki nişasta

moleküllerini parçalayarak nişasta moleküllerinin hidrolizinde glikoamilaza katkıda bulunmaktadır. Bu, α -amilaz ve glikoamilaz için her hız denkleminde oluşan eşzamanlı diferansiyel denklemler ile ifade edilir. Nişasta işlenmesinde bu endüstriler tarafından glikoamilazların tercihi, termostabilitelerinin iyi olmasıdır (Norouzian ve ark.2006; Pasina ve ark. 2017).

Amilazların endüstriyel önemi nedeniyle, yeni endüstriyel uygulamalar için uygun yeni mikrobik amilazların izolasyonuna büyük bir ilgi duyulmaktadır. Son yıllarda fungusların biyoproseslerde kullanılması, farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip enzimlerin üretimi ve endüstriyel uygulamalar için mükemmel potansiyel olmaları nedeniyle değerlendirilmiştir (Pasina ve ark. 2017). Birçok hayvan türü, bitki ve mikroorganizma nişastayı parçalayıcı enzimler üretebilir; bununla birlikte, funguslar, tüm mikroorganizmalar arasında başlıca endüstriyel kaynağı oluşturmaktadır (Riaz ve ark. 2007; Ayodeji ve ark. 2017). Endüstriyel olarak uygulanabilir enzimlerin potansiyel kaynakları olarak mikroorganizmaların kullanılması, bu mikroorganizmaların doğada her yerde bulunması ve ilgilenilen enzimi eşzamanlı olarak hızlı şekilde üretilmesi nedeniyle biyoteknoloji alanında popülerlik kazanmaktadır (Saha ve Zeikus 1989; Ayodeji ve ark. 2017).

Funguslar tarafından salgılanan enzimler, organik çözücülere karşı direnç ve termo ve pH stabilitesi gibi birçok endüstriyel avantaj sağlayabilmektedir. *Aspergillus*, endüstriyel olarak enzim üreten klasik biyolojik bir model olmasının yanı sıra organik asitler ve diğer ticari olarak önemli ürünler üreten türleri olduğundan genel olarak pratik önemi olan bir küf türüdür (Pasina ve ark. 2017).

Glukoamilaz için optimum sıcaklık 40 ila 60°C arasındadır ve bu sıcaklık fungal α -amilaz için yüksektir. Fungal α -amilaz 30 ila 50°C arasında çalışmaktadır. Bu sıcaklık aralıklarında glikoamilazlar için optimum pH, 3.6-6.5 arasındadır. Genellikle, glikoamilazı salgılayan organizmalar da α -amilazı da salgılar. Glikoamilazlar, nişasta ve β -limit dekstrinleri tamamen glikoza çevirebilmektedir (Fleming 1968; Tomosika ve Horton 2012).

2.5. Çeşitli Gıda ve Tarımsal Ürünlerin Enzimatik Hidrolizi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Fermente edilebilir bir substrat olan patates işleme atıklarının bir çeşit biyopolimer poli β -hidroksi bütirat (PHB)'a dönüştürmek için enzimatik hidroliz metodu kullanan Rusendi ve ark. (1995) mikroorganizma olarak *Alcaligenes eutrophus*'u kullanmıştır. Sonuçlar, patates nişasta atığının yüksek verimle konsantre bir glikoz çözeltisine dönüştürülebileceğini göstermiştir. En ekonomik yöntemin arpa maltının 1:9 g/g patates atığı oranına sahip bir karışımın amilaz enzimi kaynağı olarak kullanması olduğu belirtilmiştir. Teorik olarak % 96'lık bir dönüşüm etkinliği ile 208 mg / ml'lik bir son glikoz konsantrasyonu elde edilmiştir.

Wang ve ark. (1996) hint irmiği (sago) nişastası ile ilgili yaptığı çalışmada; tek enzimin ham sago nişastasının hidrolizinde etkili olmadığı α -amilazın glikoamilaz ile güçlü bir sinerjik etki sergilediğini belirtmiştir. Bunun sebebinin α -amilazın, glikoamilaz için yeni indirgenmeyen gruplar sağlayan granül yüzeyindeki etkisinden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Soni ve ark. (2003)'de yaptığı çalışmada laboratuvar izolatu olan *Bacillus sp.* AS-1 ve *Aspergillus sp.* AS-2 suşlarını kullanarak sırasıyla, termostabil α -amilaz (198 950 U / g fermente kuru madde) ve glikoamilaz (3426 U / g fermante kuru madde) enzimlerini izole etmiştir. Geniş sıcaklık ve pH aralığında aktif bu iki enzim buğday kepeğinin katı fermantasyonunda kullanılmıştır. % 15'lik bir nişasta çözeltisinde 50°C'de α -amilaz ile % 96'lık bir yüksek sınıvlaşma verimi sergilerken, glikoamilaz ile % 87'lik yüksek bir sakkarifikasyon verimi ortaya koymuştur. Bu enzimler, kombinasyon halinde kullanıldıklarında, buğday kepeğinin etkili bir şekilde hidrolize edilebileceğini ve minimum % 96 dönüşüm verimliliğini ortaya çıkarabileceği bildirilmiştir.

Gibreel ve ark. (2008) 3 çeşit arpa tipinin (Xena, Bold ve Fibar) mısır ve buğday ile karşılaştırmalı olarak etanol üretimini incelemiştir. Nişasta hidrolizinde; *Trichoderma reesei*'den elde edilen granüler nişastayı glikoza hidrolize etmek için kullanılan glikoamilaz ile *Aspergillus kawachi* α -amilazın sinerjik olarak çalıştığı bir enzim kokteyli olan Stargen 001, Optimash TBG (viskozite azaltıcı) ve Fermgen (proteaz) enzimleri kullanılmıştır.

Ruiz ve ark. (2011); cassava nişastasından glikoz şurubu üretmek için *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz ve *Aspergillus niger* kaynaklı glikoamilaz kullanılarak enzimatik hidroliz uygulamıştır. Bu enzimlerin dışında *A.kawachi* kaynaklı α -amilaz ve *A.niger* kaynaklı glikoamilazdan bir enzim karışımını da test etmiştir. Nişasta hidrolizi için enzim koşulları, substrat konsantrasyonu, enzim/substrat oranı ve zaman reaksiyonu değişkenlerini kullanarak deney tasarımı optimize edilmiştir. 100 g nişasta için pH 5.0, 80°C'de α -amilaz ve 130,5 U g⁻¹ nişasta enzim dozajı; ve pH 4.5, 70 ° C glikoamilaz ve 81,5 U g⁻¹ nişasta enzim dozu optimum sonucu vermiştir. Ek olarak, enzimatik karışım için en uygun koşullar, pH 4.5, 46 ° C ve enzim dozajı 16,4 U g⁻¹ olarak belirtilmiştir.

Sindhu ve ark. (2011); biyoetanol üretiminde hammadde olarak şeker kamışı küspelerinin kullanılmasını incelemiştir. Proseste şeker kamışı küspeleri asit kullanılarak ön işleme tabi tutulduktan sonra selülozlar kullanılarak enzimatik sakkarifikasyon ve işleme uygulanmıştır. Sistem çeşitli parametreler için optimize edildikten sonra en iyi şartlar altında, ön işleme tabi tutulmuş biyokütlenin gramı başına 0.685 g indirgen şeker ürettiği rapor edilmiştir. Hidrolizatın *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak fermantasyonu sonucu % 11 verimle 11.365 g / L biyoetanol ürettiği verilen sonuçlar arasındadır.

Biyoetanol üretimi için hammadde olarak pamuk hasatından sonra atık bitki materyalini kullanan Binod ve ark. (2011) bu hammaddeye yüksek basınçlı bir reaktörde sodyum hidroksit uygulamış ve bunu takiben selülozlar kullanılarak enzimatik hidroliz gerçekleştirmiştir. Ön muamele, 100 ppm'de substratın karıştırılması ile 45 dakika boyunca 180°C'de gerçekleştirilmiştir. Ön işlem uygulanmış pamuklu bitki atığının hidroliz etkinliği % 96 olarak bildirilmiş ve bu da ligninin çıkarılması ile yöntemin mükemmel verimliliğini göstermektedir. Glikoz dönüşümündeki verimlilik % 53 olarak belirtilmiştir.

Kuttirajave ark. (2013), bambu endüstrisinden gelen proses atığının, enzimatik sakarifikasyon ile biyoetanol üretimi için bir hammadde olup olmadığını üzerine bir araştırma yaptırmış. Bambu biyokütlesinde yüksek oranda bulunan lignin için seyreltik alkali ön-muamelesi uygulanmış ve bunun sonucunda selüloz konantrasyonu % 46,7'den % 63,1'e etkili bir şekilde arttırılmıştır. Ön işlem sayesinde toplam şeker polimerleri % 64,31'den % 82,36'ya yükseltilmiştir. Selüloz ile enzimatik hidrolize uğratılan bambu biyokütlesinden etanol üretim sisteminde tüm işlemler sonu verimliliğinin % 43 olduğu bildirilmiştir.

Dávila ve ark. (2014), şeker kamışı küspesi, plantain (bir tür muz) kabuğu, cassava kabuğu, mango kabuğu, pirinç kabuğu ve mısır koçanın da arasında bulunduğu çevresel atıkları selüloz, hemiselüloz ve lignin ile enzimatik hidrolize uğratarak ile glikoz şurup üretiminin tekno-ekonomik değerlendirmesini yapmıştır. Ekonomik analize göre, mısır koçanı yüksek selüloz ve hemiselüloz içeriğinden dolayı hem en düşük üretim maliyetine (2,48 USD / kg şurup) hem de en yüksek verime (0,61 kg şeker / kg tarımsal endüstriyel atık) sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuçlara göre şurup üretiminde; ön-muamele işlemine ihtiyaç duyulan şeker konsantrasyonu ayarlama bölümü diğer aşamalara kıyasla daha fazla enerji gerektirmektedir.

Kiran ve ark. (2015), yaptığı çalışmada atık çöplerden hidrolitik enzim bakımından zengin mantar karışımı üretmiş ve bu enzimi karışık gıda atıklarının hidrolizi için kullanmıştır. Gıda atığının mantar püre ile enzimatik ön-işleminden 24 saat sonra 127 g / L glikoz ve 1,8 g / L serbest amino azot içeren dengeli bir besin ortamı meydana geldiği belirtilmiştir. Bu çözelti fermantasyon substrat olarak kullanarak 32 saat içinde 0,5 g / g glikozun bir etanol verimine tekabül eden 58 g / L etanol elde edilmiştir. Karma gıda atıklarının, bu çalışmada üretilen mantar püresiyle ön işleme tabi tutulmasının, gıda atıkları sakkarifikasyonu ve biyoetanol üretimi için etkili bir seçenek olduğu gösterilmiştir.

Scholl ve ark. (2015), fil otunun (*Pennisetum purpureum*) içerdiği selülozu etanole dönüştürmek için bu hammaddeye buhar püskürtme (steam explosion) ön işleminin uygulanmasını incelemiştir. Bu şekilde, vakumla boşaltılan ve suyla yıkanmış buharla

muamele edilmiş substratların enzimatik hidrolizi *Penicillium echinulatum* enzimleri ile gerçekleştirilirken etanol üretiminde fermentasyon için *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 kullanılmıştır. 48 saatlik hidrolizden sonra, en yüksek indirgen şeker verimi; 200°C'da 10 dakika ($863,42 \pm 62,52$ mg / g) muamele edilmiş substrattan elde edildiği, bununla birlikte, en yüksek glikoz verimi, 190°C'de ($248,34 \pm 6,27$ mg / g) ve 200 ° C'de ($246,0 \pm 9,6$ mg / g) 10 dakika muamele edilen substratta olduğu bildirilmiştir.

Hudečková ve ark. (2017) atık ekmeklerin değerlendirilmesi için yaptıkları çalışmada hidroliz; % 15 (w/v) atık ekmek içeren 100 ml suda gerçekleştirilmiştir. Atık ekmeğin iki ticari enzim tarafından hidrolize edildiği çalışmada sıvılaştırma için α -amilaz (BAN 240) sakarifikasyon için glukoamilaz (AMG 300 L) kullanılmıştır. α -amilaz için en uygun şartların pH 6 ve 80°C olduğu ve bu şartlarda maltoz veriminin $67,08 \text{ g L}^{-1}$ glukoamilaz için ise optimum koşulların pH 4.2 ve 60°C bulunduğu bu şartlardaki glikoz miktarının $70,28 \text{ g L}^{-1}$ olduğu bildirilmiştir. Atık ekmeklerin sıvılaştırma süresi 180 dakika iken şekerleşme süresinin 90 dakika olduğu belirtilmiştir.

Li P ve ark. (2017) yaptığı çalışmada ksantan fermantasyonunda kullanılacak mutfak atıklarında kimyasal ön arıtma ve enzimatik hidroliz ön işlemlerinin önemini araştırmıştır. Kimyasal ön arıtmanın enzimatik veya toplam hidroliz işlemi üzerinde pozitif etkisi olduğunu göstermiştir. En yüksek indirgen şekeri konsantrasyonu %2 HCl ile 90 ° C ön muamele edilmiş numunede $51,87 \text{ g / L}$ olarak görülürken Kjeldahl azotu ile ön muamele edilmiş mutfak atıklarında $7,79 \text{ g / L}$ indirgen şeker olduğu belirlenmiştir. Farklı ön-muamele yöntemleri ile muamele edilen mutfak atık örnekleri daha sonra sırasıyla 100 U/mg, 4 U/mg, 100 U /mg enzim aktivitelerine sahip proteaz, α -amilaz ve glukoamilaz kullanılarak hidrolize edilmiştir. Elde edilen mutfak atığı hidrolizatının ksantan fermantasyonu için başarılı bir hammadde olduğu bildirilmiştir.

Şeker bakımından zengin bir gıda atığı olan ve pahalı termokimyasal bir ön-işleme gerek olmadan etanole dönüştürülebilir pasta atıklarının etanole olan dönüşümü Magyar ve ark. (2017) tarafından incelenmiştir. Pasta atıklarının iki aşamalı bir süreçle, yani ticari enzim ürünleri karışımlarını kullanarak enzim hidrolizi ve mayayı kullanarak mikrobiyal fermantasyon yoluyla etanole dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Optimize edilmiş enzim kokteyli, yüksek glukoz konsantrasyonuna sahip bir hidrolizat üreten $2,5 \text{ mg}$ enzim proteini / g glukoz'da % 45 alfa amilaz, % 45 gama amilaz ve % 10 pektinaz olduğu bildirilmiştir. Üç farklı katı ağırlığında da (% 20, % 30 ve % 40) enzim ya da maya inhibisyonundan çok az ya da hiç etkilenmeden şeker bakımından zengin hidrolizatları ve etanol üretimi gerçekleştirilmiştir.

Saha ve ark. (2017) yaptığı çalışmada lignoselülozik tarım kalıntısından biyoetanol üreterek sera gazlarına neden olan petrol esaslı fosil yakıtlara umut verici bir alternatif olduğunu bildirmektedir. Bu amacı gerçekleştirmek için, ön-muamele, enzimatik hidroliz, fermentasyon ve dehidrasyon içeren uygun biyoetanol üretim teknolojisi geliştirilmelidir. Genellikle lignoselülozlardan selüloz için % 30-46, lignin için % 18-25 olan geri kazanım iyonik sıvı destekli ön işlem ile selüloz için % 80'e lignin için ise % 42'ye çıkarılabilir. Geri kazanılan selülozun biyoetanol üretimine enzimatik hidroliz ile doğru işlenmesi % 76 indirgen şeker demektir. Ayrıca hidrolizde ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon kullanımı % 50'den fazla katalitik aktivite ile % 27 indirgen şeker ve % 73'den fazla enzimi geri kazandırır.

Shigematsu ve ark. (2017)'de yaptığı çalışmada yüksek hidrostatik basınç uygulanan tatlı patates yumrularındaki nişastanın basınçla jelatinleşmesini ve daha sonra internal amilazlar tarafından sakkarifikasyonu ile şeker üretiminin etkilemesini incelemiştir. Ortam sıcaklığında 10 dakika süreyle 600 MPa'da yapılan işlem indirgen şeker konsantrasyonunu etkilemezken basınç ve sıcaklık arttıkça 100 ila 500 MPa ve 10 dakika boyunca 60-70°C'de uygulanan yüksek basınç uygulaması şeker konsantrasyonunu azaltmıştır. Yüksek basınç uygulamasının tatlı patatesin yumru kökündeki nişastanın, atmosferik basınçta termal işlemde daha düşük bir sıcaklıkta jelatinleştirilmesi ve enzimatik sakkarifikasyonunu kolaylaştırdığı sonucuna varılmıştır.

2.6. Atık Ekmeklerin Değerlendirmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Daigle ve ark. (1999), atık ekmek parçacıklarında *Geotrichum candidum* tarafından aroma bileşiklerinin üretimi ile ilgili çalışmışlardır. Fermente edilmiş % 65 su % 35 ekmek içi ihtiva eden ekmek süspansiyonuna *Geotrichum candidum* ATCC 62217 inokule edilmiş ve bu mikroorganizma fermante atık ekmek üzerinde meyveli aroma bileşikleri (ananas benzeri) oluşturmuştur. Bu bileşenlerin arasında yağ asit esterleri de dahil olmak üzere, asetik asit etil esterleri, propiyonik asit, bütirik asit tanımlanmıştır. Bu maddelerin üretimlerinin suşun sabit büyüme evresinde olduğu bildirilmiştir.

Ebrahimi ve ark (2008), ekmek artıklarını amilolitik enzimler kullanarak iki basamaklı bir nişasta hidroliz yoluyla fermentasyona uygun şekle dönüştürmüştür. Buğday unu hidrolizi de karşılaştırma için aynı koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Sıvılaştırma için sıcaklık (50-85°C) ve substrat konsantrasyonu (% 20 ve % 35) etkileri araştırılmıştır. % 20 ekmek süspansiyonunun 3 saatlik sıvılaştırması, başlangıçtaki kuru maddenin % 70'ini sıcaklıktan bağımsız olarak çözdüğü % 35 ekmek süspansiyonunun sıvılaştırılması süspansiyonun macunumsu davranışından ötürü kesikli bir yöntemle gerçekleştirilmelidir. Süspansiyon haline getirilmiş ekmeğin 85°C'de % 65 oranında hidrolizi gerçekleşmiştir. Sakkarifikasyon

sonunda başlangıçtaki kuru maddenin neredeyse % 80'lik bir kısmı hidroliz olmuştur. Ve 95'den fazla bir dekstroz eşdeğeri (DE) sahip fermantasyona uygun hammadde elde edilmiştir. Hazırlanan besleme stoğuna daha sonra *Saccharomyces cerevisiae* eklenerek başlangıçtaki ekmek kuru madde kg başına toplam 350 g etanol verimiyle sonuçlandığı bildirilmiştir.

Leung ve ark (2012) atık ekmeklerin *Actinobacillus succinogenes*'in fermantatif süksinik asit üretimi için besin açısından zengin bir substrat olduğunu belirtmiştir. Sırasıyla amilolitik ve proteolitik enzim bakımından zengin enzim kompleksleri üreten *Aspergillus awamori* ve *Aspergillus oryzae* katı faz fermentasyonlarında atık ekmekler kullanılmıştır. Ortaya çıkan fermantasyon katıları doğrudan bir ekmek süspansiyonuna ilave edilerek 100 g / L'den fazla glikoz ve 490 mg / L serbest amino azotu ihtiva eden bir hidrolizat üretilmiştir. *A. succinogenes* substrat olan ekmek hidrolizatına eklenmiş fermantasyon için kullanılmıştır. Bunun ekmek başına 0,55 g süksinik asit toplam verimine karşılık geldiği bildirilmiştir.

Melikoğlu ve ark. (2013), yaptığı çalışmada katı faz fermantasyonu yoluyla atık ekmek parçalarından glikoamilaz ve proteaz üretimini ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Enzim üretimi için optimum fermantasyon koşulları, 20 mm parçacık boyutu, 1.8 (w / w, db) başlangıç nemi oranı ve 144 saatlik süre olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında glikoamilaz ve proteaz aktiviteleri sırasıyla 114,0 ve 83,2 U / g ekmek (db) seviyesine ulaştığı belirtilmiştir. Bu çalışma, tahıl esaslı biorefinerilerde atık ekmeğin ana hammadde olarak başarıyla kullanılabileceğini doğrulamaktadır.

Acanskı ve ark (2014) yaptığı çalışmada atık ekmeklerden oluşan 7 örnekte biyoetanol verimlerini karşılaştırılmıştır. Ekmek numuneleri, buğday ununa 0, 20, 40, 50, 60, 80 ve 100% oranında karabuğday karıştırılarak hazırlanmıştır. Atık ekmek süspansiyonları, ticari hidrolitik enzimler olan Termamyl® SC ve SAN Extra® L uygulanarak hidrolize edilmiş ve fermantasyon işlemi *Saccharomyces cerevisiae* ile gerçekleştirilmiştir. Yedi numunenin ve damıtılması gerçekleştirilmiş ve hepsinin distilatlarındaki etanol içeriği belirlenmiştir. En yüksek biyoetanol verimi, saf buğday unu ile yapılan ekmek numunesinde tespit edilmiş, ekmekteki karabuğday ununun miktarı arttıkça etanol veriminin yavaş yavaş azaldığı bildirilmiştir.

Alkalin katalizörler kullanılarak ekmek artıklarından laktik asit üretimi üzerinde duran Sánchezve ark. (2014), NaOH, KOH, Ca(OH)₂, LiOH ve K₂(CO)₃ 'un 0,5 M'lık konsantrasyonlarını 300°C'de 30 dakika olmak şartı ile katalizör olarak kullanmıştır. Ön denemeler KOH, NaOH ve Ca(OH)₂'nin en iyi katalizör olduğunu göstermiştir. Bu

katalizörleri kullanarak, aynı çalışma koşullarında katalizör konsantrasyonunun değiştirilmesi ile başka deneyler gerçekleştirilmiştir.

Pietrzak ve ark. (2014), yaptığı çalışmada granül nişasta hidrolize edici enzim (GSHE) kullanarak atık buğday ekmeğindeki nişastanın etanole dönüştürme işlemi seyri değerlendirilmiştir. Fermantasyonun gidişatını iyileştirmek için çeşitli ön-muamele yöntemleri (enzimatik ön hidroliz, mikrodalga ışınlama, sonifikasyon) uygulanan fermentasyon ile kesikli hidroliz ve fermentasyon karşılaştırılmıştır. Hammaddenin yüksek su bağlama kapasitesinden ötürü fermentasyonlar, 150 g kg⁻¹lik gerçekleştirilmiştir. Sadece enzimatik ön muamele edilmiş ve kesikli hidroliz fermentasyonu prosesi esnasında hammadde daha önceden sıvılaştırılmış ve böylece daha yüksek konsantrasyonları uygulanabilmiştir. Fermantasyonun dinamiklerinin incelenen tüm varyantlarda benzer olduğu; ön işlem görmemiş atık ekmeğinin fermentasyonu, % 80.00 etanol verimi (354,36 g kg⁻¹ hammadde) ile sonuçlandığı ve hammaddenin ön işleme tabi tutulması etanol verimini yaklaşık %3-8 oranında arttırdığı bildirilmiştir.

Pietrzak ve ark. (2015), çavdar ekmeğinin yüksek kuru madde içerikli süspansiyonunda (300 g kg⁻¹) etanol fermentasyon süreci verimi, eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon aşamaları incelemiştir. Enzimatik sıvılaştırma koşulları, nişastanın ısı özellikleri temelinde değiştirilmiş ve α -amilaz aktivitesi için en uygun sıcaklık (85°C) ile karşılaştırılmıştır. Modifiye edilmiş koşullardaki hammaddenin sıvılaştırılması 85°C'de hidrolizle karşılaştırıldığında hidroliz etkinliğinin azaldığı belirtilmiştir. Optimize edilmiş sıvılaştırma koşullarında eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon prosesinin seyri ve etanol verimi, standart koşullara kıyasla karşılaştırılmış ve daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

3.MATERYAL ve METOD

3.1.Materyal

Materyal olarak kullanılan ekmek Tekirdağ'daki bir ekmek fırınından temin edilmiştir. Ekmeklerde küflenme olmamasına dikkat edildi. Enzim olarak; *Bacillus licheniformis* bakterisi tarafından üretilen Termostabil alfa-amilaz (EC 3.2.1.1) enzimi (Termamyl 120 L (Novozyme, Danimarka)(enzim aktivitesi 120 KNU/g (KNU=Kilo Novo Units α -amilaz–Novozyme standart metoduna göre saatte 5,26 g nişasta parçalayan enzim miktarı) ve genetik olarak modifiye edilmiş *Aspergillus* türleri tarafından üretilen amiloglukozidaz enzimi (EC 3.2.1.3) AMG 300 L (Novozyme, Danimarka) (enzim aktivitesi 300 AGU/ml (AGU= belirtilen şartlar altında dakikada 1 μ mol maltozu hidrolize eden enzim miktarı). Kullanılan enzimler Sigma-Aldrich temsilcisi Interlab firmasından temin edilmiştir.

3.2.Metod

3.2.1.Atık Ekmeklerin Kimyasal Bileşimin Belirlenmesi

Atık ekmekler 2-5 cm lik ufak parçalara kesildikten sonra sabit nem miktarına gelinceye kadar laboratuvar tipi etüvde 50°C'de kurutulmuştur. Daha sonra ekmek laboratuvar tipi öğütücüde öğütülerek toz haline getirildi ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.1.Kuru Madde Analizi

Ekmeğin kimyasal kompozisyonun belirlemek amacıyla; nem miktarı tayini standart kurutma metodu ile materyalin 95°C'de 24 saat, sabit ağırlığa gelinceye kadar tutulması ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.2.Kül Analizi

Kül miktarı ekmeklerin bir gece boyunca 550°C sıcaklıktaki kül fırınında sabit ağırlığa gelinceye kadar yakılması ve yakılan örneklerin desikatörde soğutulduktan sonra tartılması ile hesaplanmıştır.

3.2.1.3.Nişasta Analizi

Atık ekmeklerdeki nişasta miktarı ISO 10520 (1997) metodu ile belirlenmiş olup, kuru ekmek içerisindeki nişasta miktarı ortalama % 87 olarak belirlenmiştir.

3.2.1.4. Ham Protein Analizi

Bu çalışmada protein analizleri Kjeldahl protein tayin cihazı kullanılarak yapılmıştır. 1 g örnek hassas terazide tartılıp yakma tüpü içerisine ilave edilip, üzerine 2 tablet katalizör (3,5

g K₂SO₄, 0,035g Se) ve 15 ml derişik sülfürük asit ilave edilerek yakma cihazına yerleştirilmiştir. Örnek berrak yeşil renk alıncaya kadar yakma işlemine devam edilmiştir. Yeşil renk oluşumundan sonra tüp bir müddet soğuması için bekletilmiş ve üzerine 70 ml saf su ilave edilmiştir. Bu işlemlerden sonra tüp destilasyon cihazına takılmış ve aletin deposundaki %33'lük NaOH'ten 50 ml otomatik olarak tüpün üzerine ilave edilmiştir. Diğer taraftan 25 ml %4'lük borik asit erlenmayer içerisine konup sisteme bağlanarak destilasyon cihazı çalıştırılmıştır. Destilasyon sona erdikten sonra toplanan destilat 0,2 N HCl ile titre edilmiş ve sarfiyat miktarı ile % azot hesaplanmış, daha sonra da 6,25 faktörü ile çarpılarak % protein bulunmuştur.

3.2.2. Atık Ekmeğin Enzimatik Hidrolizi

Atık ekmeğin enzimatik hidrolizinde uygulanan optimal şartlar Novo Nordisk ürün forumu (2013) 'na göre belirlendi. Ekmek miktarı, α-amilaz ve glukoamilaz miktarı optimum şartları belirleyen kriterler olmuştur.

Atık ekmeğin enzimatik hidrolizi 2 aşamada gerçekleştirilmiştir; ilk hidroliz aşamasında; jelatinize nişasta çözeltisinin viskozitesini düşürmek ve amiloz ve amilopektin zincirinin ortasındaki α-1,4 glikozidik bağları kırarak kısa zincirli dekstrinleri oluşturmak için sıcaklığa dayanıklı α-amilaz (EC 3.2.1.1) enzimi (Termamyl 120 L) kullanılmıştır. Ekmeğin enzimatik sıvılaştırma işlemi 1 litrelik erlenlerde mekanik karıştırıcılı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş ve öğütölmüş atık ekmekler distile su ile karıştırılmış ve pH'sı 1 mol L⁻¹ H₂SO₄ veya NaOH çözeltileri kullanılarak 6,0'a ayarlanmıştır. Erlenler su banyosunda 45°C'de 20 dk ön ısıtmaya tabi tutulmuştur. Ekmek bulamacının sıcaklığı 60°C'ye ulaştığında Termamyl 120 L enzimi ilave edildi ve toplam ağrılık distile su ile 200 gr'a tamamlanmıştır. Daha sonra örnekler 90°C'ye getirildi ve sıvılaştırma işlemi 150 rpm çalkalama hızında 60 dk boyunca gerçekleştirilmiştir. Uygulanan optimal şartlar Novo Nordisk ürün forumu (2013) 'na göre belirlenmiştir.

Nişasta hidrolizinin ikinci basamağında (sakkarifikasyon), dekstrinler monomer şekerler (glukoz) elde etmek amacıyla glukoamilaz (amiloglukozidaz) (EC3.2.1.3) (AMG 300 L) enzimi ile sakkarifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sıvılaştırılmış süspansiyonun pH'sı 1 mol L⁻¹ H₂SO₄ özeltisi ile 5,0'a ayarlanmıştır. Sakkarifikasyon denemeleri çalkalamalı inkübatörde, 55°C sıcaklıkta ve 200 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Uygulanan optimal şartlar Novo Nordisk ürün formu (2013)'na göre belirlenmiştir. Sakkarifikasyon 24 saat boyunca yürütölmüş ve süre sonunda süspansiyon hemen 20°C'ye soğutulmuştur.

Sıvılaştırma ve sakkarifikasyon aşamalarının belirli süre aralıklarında örnekler alınarak -20°C'de analizler için saklanmıştır.

3.2.3. Atık Ekmek Hidrolizinin İstatistiksel Optimizasyonu

Hidroliz parametrelerinin glukoz verimi üzerine etkisini araştırmak için yanıt yüzey metodu kullanılmıştır. Design Expert® yazılımı (Stat Ease Corp, ABD) ile üretilen beş seviyeli üç faktörlü merkezi kompozit tasarım (CCD) kullanılarak, ekme hidrolizinin sıvılaştırma kısmında substrat miktarı (w/w) ile α -amilaz enzim konsantrasyonunun (KNU/g substrat) ve sakkarifikasyon basamağında glukoamilaz enzim konsantrasyonunun (AGU/g substrat) atık ekmeklerden glukoz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Tahmin edilen glukoz veriminin hesaplanması, deneysel tasarım verilerinin analizi ve etkileşim etkilerini analiz etmek için üç boyutlu cevap yüzeylerinin oluşturulması Design Expert Software kullanılarak gerçekleştirilmiştir. R-kare ve öngörülen R-kare'ye göre en iyi model iki faktörlü etkileşim (2FI) denklemi olarak bulunmuştur;

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j$$

Bu denklemde, y tahmin edilen glikoz verimini, (w / w); x glukoz verimine etki eden faktörleri (substrat yüklemesi, α -amilaz enzim konsantrasyonu ve glukoamilaz enzim konsantrasyonu) β_0 merkez noktasındaki tepkinin ortalama değerini ve β_1 , β_2 , β_3 ve β_{12} , β_{13} , β_{23} sırasıyla doğrusal ve etkileşim terimlerini ifade etmektedir.

3.2.4. Hidrolizatın Toplam Şeker ve İndirgen Şeker Analizi

Ekmek hidrolizatlarının glukoz miktarı, refraktif index detektörüne (RID) sahip yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile, Johansen ve ark. (1996)'nin önerdiği metoda göre belirlenmiştir. 1 g örnek (ekmek hidrolizat süzüntüsü) 25 ml hacimli erlende tartıldıktan sonra 10 ml % 80 (v/v) etanol ilave edilmiştir. Erlen termostatlı su banyosunda magnetik karıştırıcı altında 80°C'de 30 dk bekletilmiştir. Soğutulduktan sonra örnek 10 ml'lik plastik tüplere alınarak 10000 g, 10 dk santifüj edilmiştir. Supernatant toplanıp ve 0.45 μ m PTFE membrandan filtre edilmiştir. Filtre edilen çözeltilerden 20 μ l HPLC sitemine enjekte edilmiştir. HPLC karbonhidrat kolonu VA 300/7.7 NUCLEOGEL SUGAR 810 H, hareketli faz akış hızı 0,6 ml/dk, kolon fırın sıcaklığı 35°C.

3.2.5. Hidrolizata Uygulanan Reolojik Analizler

Tüm reolojik ölçümler, paralel plate geometrisi (paslanmaz çelik, 40 mm çap, 1000 lm boşluk) ile donatılmış bir kontrollü stres Discovery Hybrid Rheometer-2 (TA Instruments)

kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık her durumda bir peltier plaka sistemi kullanılarak 25°C'de muhafaza edildi. Deneyler sırasında kayma hızı, kayma gerilmesi, normal kuvvet, tork, görünür viskozite ve sıcaklık verileri toplanmıştır. Hidroliz sırasında 0,5, 0,11, 0,20 ve 0,29 (g / g) oranında distile su ile karıştırılmış kurutulmuş atık ekmeğinin reolojisi araştırılmıştır. Zaman ölçeği çalışması sırasında, reolojik analiz için sıvılaştırma ve sakarifikasyon evrelerinden önce ve boyunca 10 mL örnek toplanmıştır. Her bulamaç numunesine logaritmik olarak 0,1 ile 300 s'lik bir süre boyunca 100 s⁻¹ uygulanmıştır. Verilerin tekrarlanabilirliği, yeni numunelerle 3 ve 59 arasındaki deneyler tekrarlanarak kontrol edilmiştir.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1.Atık Ekmeğin Kimyasal Kompozisyonu

Bayatlamış ve raf ömrü tükenmiş buğday ekmekleri Tekirdağ'daki bir ekmek fırınından temin edildi. Ekmeklerde küflenme olmamasına dikkat edildi. Çalışmada kullanılan atık ekmeklerin kimyasal kompozisyonu Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Atık ekmeklerin kimyasal kompozisyonuna ait ortalama değerler (%)

Bileşen	Oran (%)
Toplam karbonhidrat	54
Nem	38
Protein	6
Kül	1

4.2.Enzimatik Hidroliz Optimizasyonu

Sıvılaştırma ve sakkarifikasyon aşamalarının optimizasyonu amacıyla atık ekmeklerden elde edilen glukoz verimi yanıt yüzey metodu deney tasarımı kullanılarak araştırıldı. Deney tasarımı matrisi ve glukoz verimleri Çizelge 4.2.'de gösterilmektedir. R^2 değerleri (R^2 , adj- R^2 , pred- R^2) 0.78 ile 0.946 arasında bulunmuş olup, bu değerler ortaya konan modellerin yeterli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. Atık ekmek miktarı (β_1), sıvılaştırma ve sakkarafikasyon aşamalarında kullanılan α -amilaz (β_2) ve glikoamilaz (β_3) miktarlarının Yanıt Yüzey Metodu ile optimizasyonu sonucu elde edilen Central Composite Design matrisi, ANOVA analiz ve katsayı tahminleri.

CCD Matrisi				
Deneme	Atık ekmek oranı (w/w)	α -amilaz miktarı (KNU/g substrat)	Glukoamilaz miktarı (AGU/g substrat)	Glukoz dönüşümü (%)
1	0.20	0.16	3.60	80
2	0.20	0.03	1.89	74
3	0.11	0.25	0.87	76
4	0.29	0.08	2.91	71
5	0.20	0.16	1.89	73
6	0.20	0.16	0.18	69
7	0.11	0.25	2.91	78
8	0.29	0.25	2.91	73
9	0.05	0.16	1.89	78
10	0.11	0.08	0.87	75
11	0.29	0.25	0.87	75
12	0.20	0.30	1.89	73
13	0.35	0.16	1.89	68
14	0.11	0.08	2.91	86
15	0.20	0.16	1.89	72
16	0.29	0.08	0.87	62
ANOVA analizi				
Kaynak		F değeri	p-değeri	Tahmini katsayı
Model/kesişim		26.66	<0.0001	76.09
β_1		72.78	<0.0001	-89.47
β_2		1.13	0.3165	-13.17
β_3		41.77	0.0001	9.48
$\beta_1\beta_2$		23.28	0.0009	384.11
$\beta_1\beta_3$		1.73	0.2207	-8.27
$\beta_2\beta_3$		19.24	0.0018	-30.63
Modele uygunsuzluk		5.72	0.3131	-

Çizelge 4.2'deki ANOVA sonuçlarına göre; p değerleri her bir katsayının önemini kontrol etmek amacıyla kullanılmıştır. p değerlerinin daha küçük çıkması, ilgili katsayı ile korelasyonun daha önemli olduğuna işaret etmektedir. Önemli bulunmayan terimlerin elenmesi ile oluşturulan 2FI modeli, verilerin oluşturulan modelle iyi olarak temsil ettiğini göstermiştir ($p < 0.0001$). Modelin en önemli verilerine baktığımızda; atık ekmek miktarı (w/w) ve glucoamilaz konsantrasyonunun, nişastanın glukoza dönüşümünde çok ciddi etkisinin olduğu görülmektedir (p değer < 0.0001). Substrat miktarının artması glukoza verimini önemli derecede düşürmüştür. Substrat miktarının artışı, enzimlerin aktivitesine karşı bir takım engeller oluşturması beklenen bir durumdur. Bu engellerden bazıları; her birim substrat için daha az enzim mevcudiyeti, enzimin spesifik olmayan bağlanmaları, daha yüksek viskozite, daha az kütle transferi ve nişasta granüllerinin yüzeyine daha az enzim taşınması gibi durumlardır. Ayrıca sakkarifikasyon aşamasında glucoamilaz miktarının artırılması glukoza dönüşüm verimini pozitif yönde etkilemiştir. Bu durum, bütün disakkarit ve polisakkarit moleküllerinin glukoza dönüşümü için daha yüksek enzim gerekliliğinden kaynaklanmaktadır. Bununla beraber sonuçlar çarpıcı bir şekilde α -amilaz konsantrasyonunun glukoza verimi üzerinde önemli etkisinin olmadığını göstermektedir.

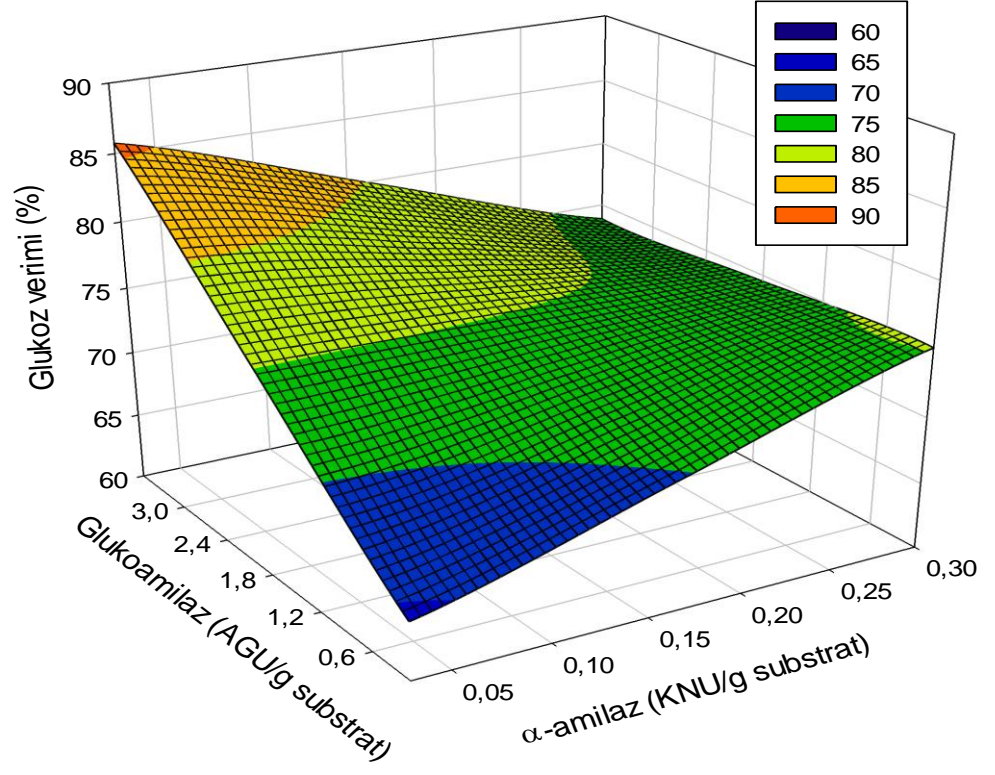
α -amilaz miktarının glukoza verimine tek başına etkisi önemsiz bulunmasına karşın, α -amilaz miktarının atık ekmek oranı ve glucoamilaz miktarı ile interaksiyonunun glukoza verimi üzerine etkisi kayda değer bulunmuştur.

Bir taraftan, sonuçlar α -amilaz ve atık ekmek miktarının pozitif interaksiyon etkisinin olduğunu göstermekte bu da sıvılaştırma fazında yüksek konsantrasyonlarda biyokütle hidrolize edildiğinde, α -amilaz miktarının artması gerektiği manasına gelmektedir. Bir diğer ifade ile substrat miktarının artırılması ile meydana gelen yüksek viskozitenin daha fazla α -amilaz kullanılarak düşürülmesi gerektiğini göstermektedir.

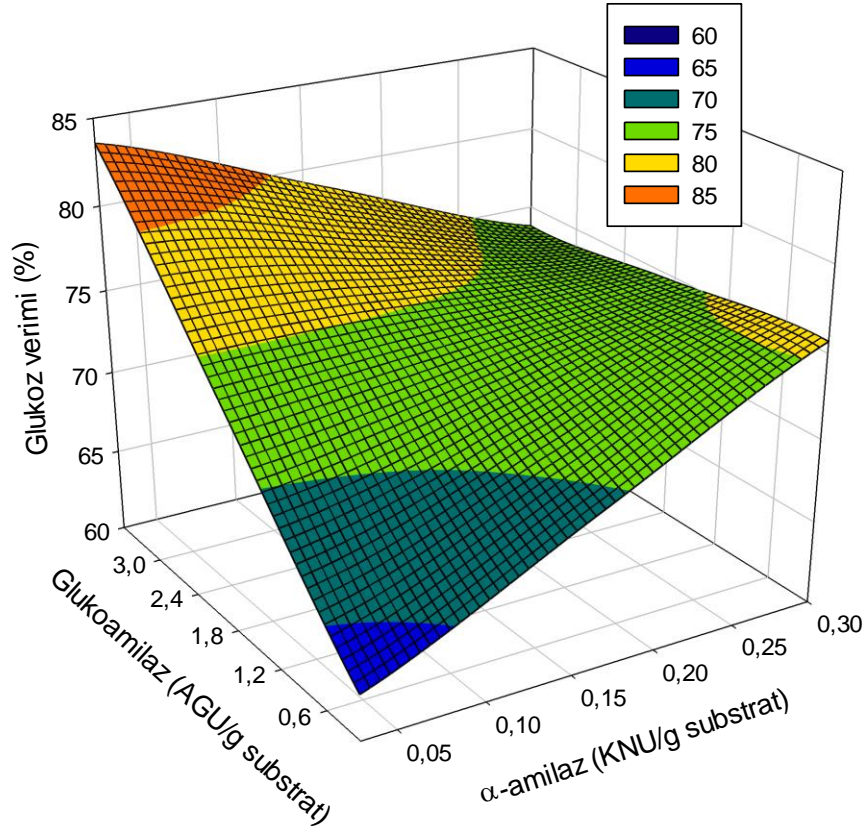
Diğer taraftan, kullanılan iki enzim kombinasyonunda negatif bir etki gözlemlenmiştir. Yani, iki enzimin aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda kullanılması etkinliklerini inhibe etmiş böylece dönüşüm verimliliği azalmıştır. Bütün bu sonuçlar, glucoamilazın substrata karşı etkinliği hususunda en iyi şartların sağlanması için biyokütle karışım viskozitesinin incelenmesi gereken bir parametre olduğunu ve çok az da olsa α -amilaz kullanımının kaçınılmaz olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Montesinos ve Navarro (2000) sakkarifikasyon aşamasında viskozitenin önemli bir faktör olduğunu belirten benzer sonuçlar bulmuştur.

Yanıt yüzey metodu ile elde edilen grafikler Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'de verilmektedir. Yanıt yüzey grafikleri değişkenler arasındaki ilişkiyi ve maksimum glukoza verimi için farklı atık ekmek oranlarında kullanılması gereken optimum enzim miktarlarını ortaya koymaktadır.

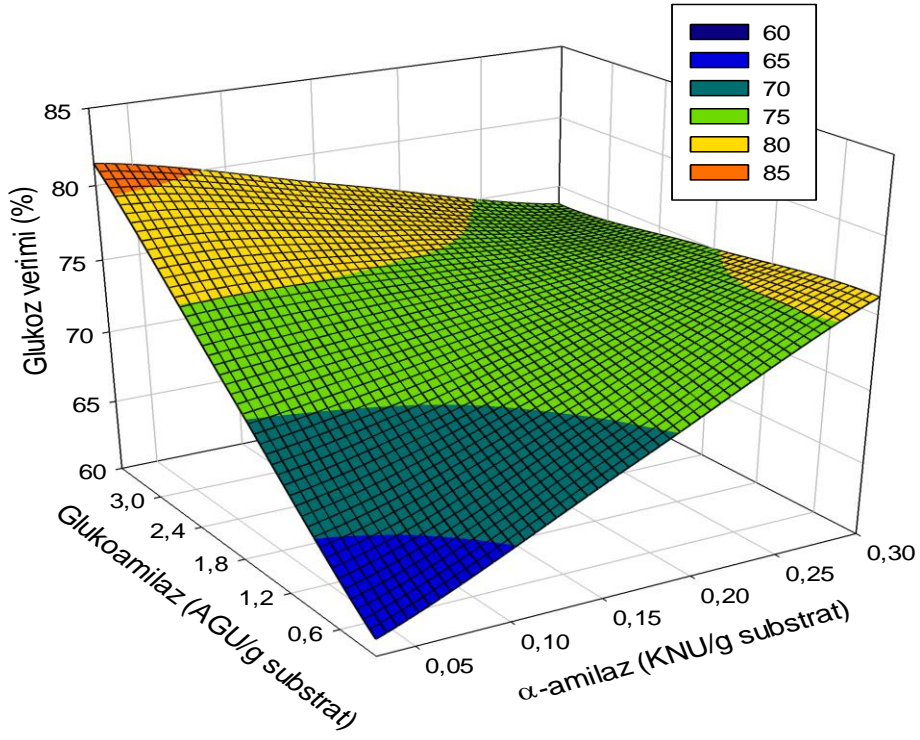
Oluşturulmuş model grafiklerde, çok açık bir şekilde kurutulmuş ekmeklerden %86 oranında glukoz veriminin (teorik olarak %99 dönüşüm) sadece minimum miktarda substrat konsantrasyonu ile elde edilebileceğini göstermektedir. 0.05 (g/g) atık ekmeğin 0.03 KNU/g substrat α -amilaz ile sıvılaştırılması ve hemen ardından 3.6 AGU/g substrat glukoamilaz ile sakkarifikasyonun bu en yüksek verimi verdiği modelleme sonucunda ortaya çıkmıştır. Genel olarak yanıt yüzey grafikleri benzer trendler göstermiştir. Örneğin Şekil 4.1-4.3'te görüldüğü gibi, ekmeğin miktarının 0.05 (g/g) den 0.20 (g/g)'a çıkarılması ile optimum enzim konsantrasyonları; minimum miktarda α -amilaz (0.03 KNU/g substrat) ve maksimum miktarda glukoamilaz (3.6 AGU/g substrat) olarak belirlenmiştir. Fakat substrat miktarı 0.20 (g/g)'ı aştığı durumda enzimlerin tam tersi şekilde kullanılması (maksimum α -amilaz, minimum glukoamilaz) gerektiği belirlenmiştir. Şekil 4.4'de, atık ekmeğin 0.29 (g/g) oranında kullanıldığı durumda grafiğin en yüksek seviyesinin maksimum α -amilaz ve minimum glukoamilaz katıldığı noktada olduğu net bir şekilde görülmektedir. Bu nedenle, sonuçlar substrat miktarının artırılması ile oluşan yüksek viskozitenin, proseste α -amilaz ihtiyacının artmasına sebep olduğunu göstermektedir. Bu durum, α -amilaz enziminin biyokütle viskozitesini önemli derecede düşürerek, glukoamilaz aktivitesine katkı sağlamasından kaynaklanmaktadır. Sonuçlar, kütle transferinin artırılarak enzim-substrat kompleksi oluşumunun kolaylaştırılması için viskozitenin düşürülmesinin oldukça önemli olduğunu göstermektedir.



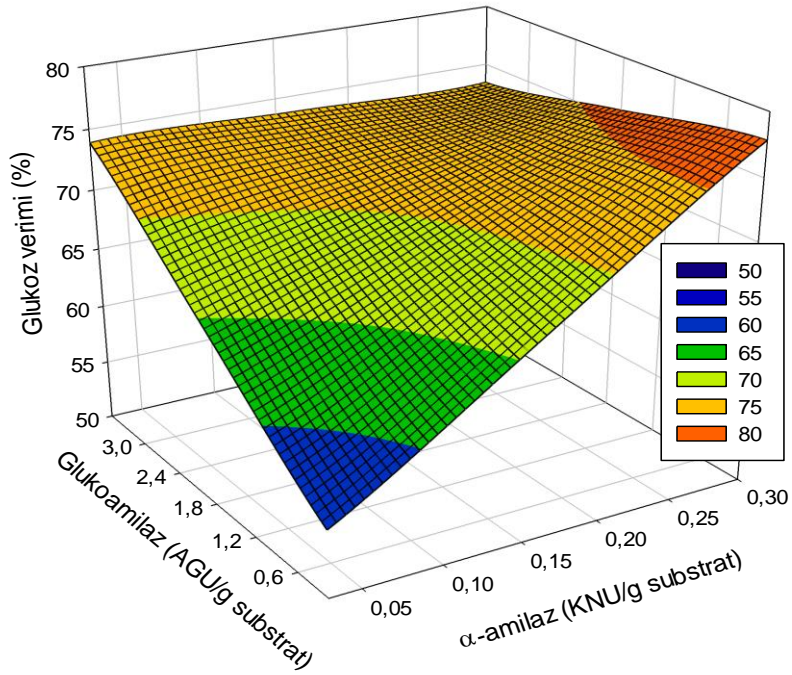
Şekil 4.1. Farklı enzim seviyelerindeki 0.05 (g/g) lık atık ekmek solusyonunda glukoz verimi.



Şekil 4.2. Farklı enzim seviyelerindeki 0.11 (g/g) lık atık ekmek solusyonunda glukoz verimi.

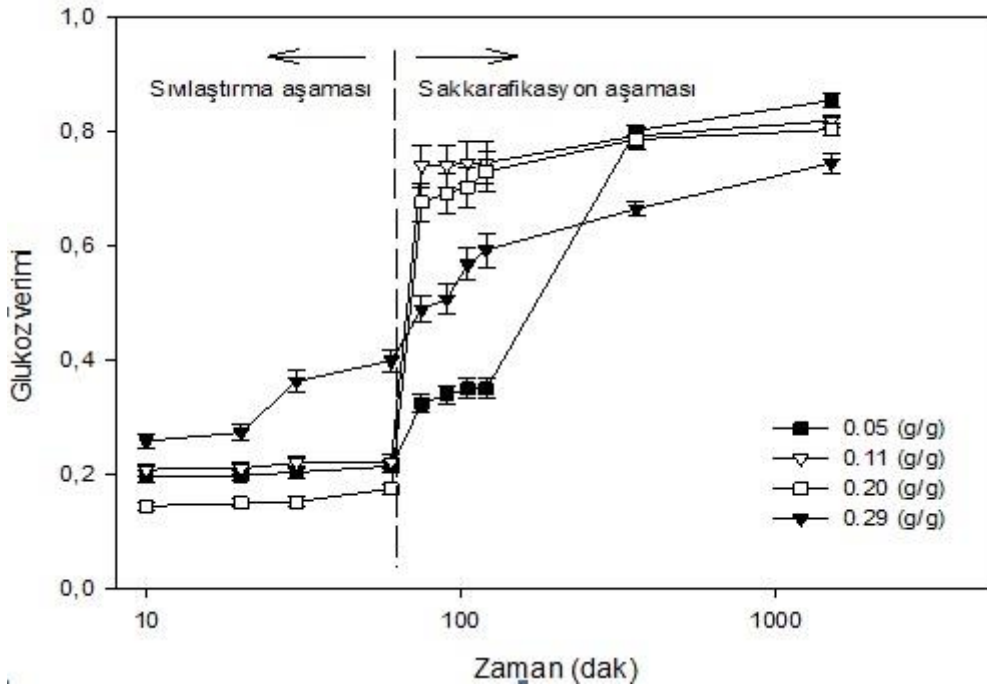


Şekil 4.3. Farklı enzim seviyelerindeki 0.20 (g/g) lık atık ekmek solusyonunda glukoz verimi.



Şekil 4.4. Farklı enzim seviyelerindeki 0.29 (g/g) lık atık ekmek solusyonunda glukoz verimi.

4.3.Reolojik Karakterizasyon ve Glukoz Veriminin Validasyonu



Şekil 4.5. Atık ekmeklerden sıvılaştırma ve sakkarafikasyon aşamalarında zamana bağlı glukoz eldesi.

Optimizasyon sonuçlarını doğrulamak ve hidroliz prosesi boyunca atık ekmeğin reolojik özellikleri ile glukoz verimi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla zamana bağlı çalışma yapıldı.

Şekil 4.5’de farklı ekmek konsantrasyonlarında hazırlanmış örneklerle modelde belirlenmiş optimum enzim oranlarının ilavesi ile zamana bağlı glukoz verimleri gösterilmektedir. Grafikte en yüksek glukoz oranının (% 85), 0,05 (g/g) kuru atık ekmek konsantrasyonu ile çalışıldığında elde edildiği görülmekte ve bu da oluşturulan modelimizi doğrulamaktadır. Elde edilen % 85’lik glukoz oranı, kurutulmuş ekmek içerisindeki nişastanın neredeyse tamamının glukozla dönüştüğünün göstergesidir (%98,3). Bu sonuç atık ekmeklerin çok verimli ve etkin bir biyokütle olduğunu ispatlamaktadır. Hammadde olarak kullanılabilir atık ekmeklerin hem ön işlem gerektirmemesi hem de kütle ağırlığının büyük bir kısmının glukozla dönüşebilmesi gibi çok önemli avantajlara sahip bir biyokütle olduğu gerçeği ortaya çıkmaktadır.

Şekil 4.5’de farklı substrat miktarlarından zamana bağlı glukoz eldesine baktığımızda daha önce oluşturulan yanıt yüzey grafiklerinde görüldüğü gibi benzer sonuçlar elde edilmiş ve substrat miktarının artışı glukoz verimini düşürmüştür.

Sıvılaştırma aşamasında, tüm substrat oranlarında sınırlı glukoz verimi elde edilmiştir (Şekil 4.5). Bu durum ANOVA analizinde ortaya çıkan “ α -amilazın glukoz verimi üzerindeki etkisinin önemsiz olduğu” sonucunu doğrulamıştır.

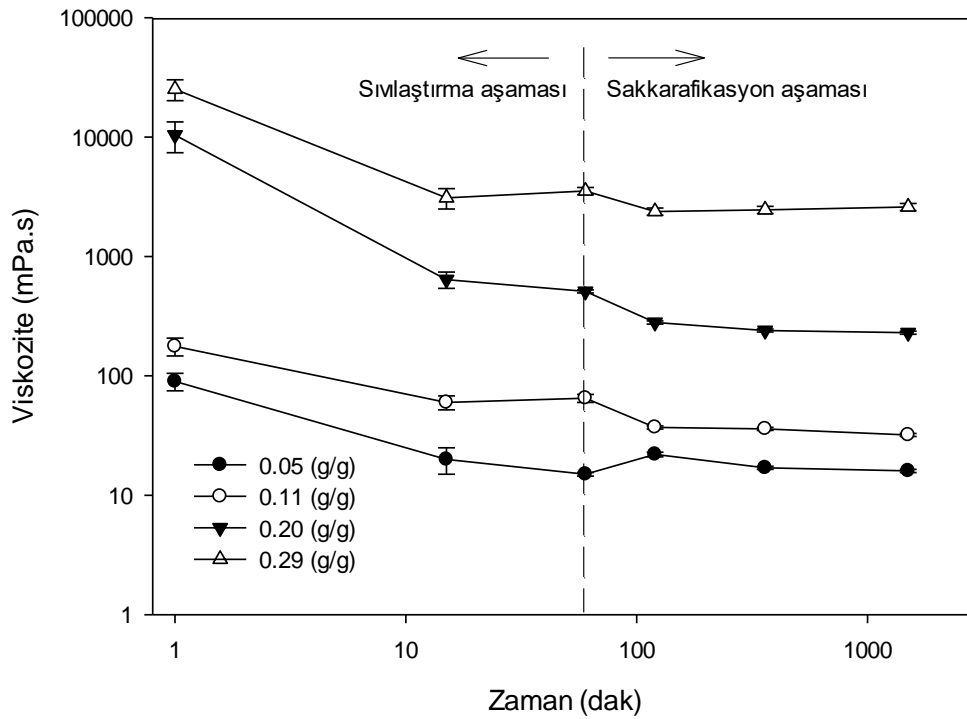
Şekil 4.6’da ekmek örneklerinin zamana bağlı viskoziteleri incelenmiş ve sıvılaştırma fazında örneklerin görünür viskozitelerinde çok ciddi düşüşler gözlemlenmiştir. Şöyle ki; 0.519 s^{-1} kayma hızında yapılan ölçümlerde, 0.29, 0.20, 0.11 ve 0.05 (g/g) ekmek konsantrasyonlu örneklerin viskoziteleri sıvılaştırma aşaması boyunca sırasıyla 25200’dan 3100’e, 10400’dan 510’a, 177 den 65’e ve 90’dan 15 mPa.s’ye kadar düşmüştür. Sıvılaştırma aşamasında glukoz verimi düşük olmasına rağmen, viskozitedeki ciddi düşüşler, α -amilaz enziminin önemli etkisiyle nişasta moleküllerinin daha kısa zincirli birimlere parçalandığını göstermektedir. Bununla birlikte bu faz sonunda, biyokütle hem fiziksel hem kimyasal açıdan daha kolay işlenebilir hale gelerek, 2. aşama olan sakkarifikasyonda kullanılan glukozamilaz enzimi için uygun bir substrat haline dönüşmüştür.

Sakkarifikasyon aşamasında, ekmek örneklerinin viskozitelerinde zamana bağlı olarak çok az değişim olmasına karşın, glukoz veriminde çok ciddi oranlarda artış olduğu (neredeyse 4 kat) Şekil 4.6’da görülmektedir. Bu sonuçtan kısa zincirli şeker moleküllerinin monosakkaritlere parçalanmasının atık ekmek hidrolizatlarının akışkanlık özelliklerini değiştirmediği ve atık ekmek–su süspansiyonunun başlangıçtaki yüksek viskozitesinden içerdiği nişasta moleküllerinin sorumlu olduğu anlaşılmaktadır. Endüstriyel ölçekte biyokütle dönüşümü açısından bakıldığında bu çalışmalardan elde edilen en önemli sonuçlardan bir tanesi; yüksek katı konsantrasyonlarda (0.29 g/g) bile atık ekmek hidrolizatları viskozitesinin çok kısa sürede çok fazla düştüğü ve biyokütlenin daha kolay işlenebileceği ortaya çıkmaktadır. Örnek verecek olursak; 0.29 g/g ekmek konsantrasyonlu örneğin viskozitesi literatürde Dunaway (2010)’in çalışmasındaki 0.20 g/g oranında hazırlanmış mısır anızı örneklerinden 30 kat daha düşük bir viskoziteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Ebrahimi ve ark (2008), yaptığı çalışmada ekmek artıklarını amilolitik enzimler kullanarak iki basamaklı bir nişasta hidroliz yoluyla fermantasyona uygun şekle dönüştürmüştür. Buğday unu hidrolizi de karşılaştırma için aynı koşullar altında gerçekleştirilmiştir. % 20 ekmek süspansiyonunun 3 saatlik sıvılaştırması, başlangıçtaki kuru maddenin % 70’ini sıcaklıktan bağımsız olarak çözdüğü % 35 ekmek süspansiyonunun sıvılaştırılması süspansiyonun macunumsu davranışından ötürü kesikli bir yöntemle gerçekleştirilmesi gerektiğini göstermiştir. Süspansiyon haline getirilmiş ekmeğin 85°C ’de % 65 oranında hidrolizi gerçekleşmiştir. Hazırlanan besleme stoğuna daha sonra *Saccharomyces*

cerevisiae eklenerek başlangıçtaki ekmek kuru madde kg başına toplam 350 g etanol verimiyle sonuçlandırıldığı bildirilmiştir.

Biyoteknolojik ürünlerin endüstriyel ölçekte fizibil olarak üretilip üretilemeyeceği kullanılan herhangi bir katı hammaddenin yüksek konsantrasyonlardaki viskozitesinin düşük olmasına ve kolay işlenebilir olmasına bağlıdır. Çünkü bu durum, daha düşük başlangıç sermayesi, ısıtma ve diğer proses basamaklarında daha az enerji harcanmasını sağlamaktadır. İşte bu yüzden, israf edilen atık ekmeklerin yüksek skalada fermente edilebilir şeker üretimi ve biyoteknolojik ürünlerin eldesinde biyokütle olarak kullanılmasının ne kadar uygun bir hammadde olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.6. Kayma hızı 0.519 s^{-1} 'de sıvılaştırma ve sakkarafikasyon aşamalarında atık ekmelerin zamana bağlı viskoziteleri.

Şeker kamışı küspesi ve mısır anızı gibi biyokütlelerin (Pereira ve ark. 2011; Viamajala ve ark. 2009), hidroliz süresince göstermiş olduğu reolojik özelliklere benzer olarak atık ekmek süspansiyonları da yield stress ve pseudoplastik davranış göstermiştir. Aşağıdaki Casson modeli bu tür akış davranışını açıklayabilmektedir:

$$\tau^{0.5} = \tau_c^{0.5} + (K_c \dot{\gamma})^{0.5}$$

Formülde τ kayma stresi (shear stress) (Pa), τ_c Casson akma sınırı (yield stress) (Pa), K_c süspansiyon plastik viskozitesi (Pa.s) ve $\dot{\gamma}$ 'de kayma hızını (shear rate) (s^{-1}) vermektedir. Farklı substrat oranlarındaki Casson modeli parametreleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge 4.3'den de görüldüğü gibi Şekil 4.6'ya benzer şekilde sadece sıvılaştırma aşaması boyunca tüm substrat konsantrasyonlarında Casson akma sınırı ve plastik viskozitesinde ciddi düşüşler olmuştur. Bu sonuç, ekme su süspansiyonlarındaki yüksek viskozitesi yanında yüksek akma sınırı değerlerinden de uzun zincirli şeker moleküllerininin sorumlu olduğunu göstermektedir.

Herhangi bir biyokütlenin karıştırılması ve pompalar yardımı ile borulardan aktarılması için gereken güç gereksiniminin hesaplanmasında sıvının akma sınırı parametresi kullanılmaktadır. Bu bakımdan akma sınırı parametresi endüstriyel ve ekonomik açıdan çok önemli bir değerdir. Bu bağlamda, atık ekmeğin biyokütle olarak kullanılmasının diğer avantajı da, sıvılaştırma fazında yüksek konsantrasyonlarda (0.29 g/g) kullanılsa bile akma sınırının 126,26'dan 12.57 Pa değerine kısa bir süre içerisinde düşmesidir.

Çizelge 4.3. Farklı miktarlardaki atık ekme solüsyonlarının 0.1'den 100 s^{-1} 'e kadar olan kayma hızlarına bağlı olarak oluşan kayma gerilmelerinin Casson modeline oturtulmasıyla elde edilen görünür Casson akma sınırı (τ_c) ve plastik viskozitesi (K_c).

Kuru atık ekme miktarı	Aşamalar	Casson model parametreleri			
		τ_c (Pa)	K_c (mPa.s)	R^2	
0.5 (g/g)	Hidroliz öncesi	0.11	3.15	0.86	
	Sıvılaştırma	0.03	2.39	0.95	
	Sakkarifikasyon	0.04	1.41	0.98	
0.11 (g/g)	Hidroliz öncesi	0.39	10	0.98	
	Sıvılaştırma	0.18	6.92	0.99	
	Sakkarifikasyon	0.08	3.12	0.98	
0.20 (g/g)	Hidroliz öncesi	51.7	200	0.88	
	Sıvılaştırma	1.46	40	0.99	
	Sakkarifikasyon	0.76	10	0.99	
0.29 (g/g)	Hidroliz öncesi	126.26	290	0.79	
	Sıvılaştırma	12.57	160	0.99	
	Sakkarifikasyon	10.2	60	0.97	

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmada tüm gıda ürünlerinden en çok israf edilenlerden biri olan atık ekmeğin bir biyokütle olarak yararlanılabilmesinin bazı avantajları incelenmiştir. İki aşamalı hidroliz koşullarını optimize ederek, teorik olarak maksimum glikoz veriminin yaklaşık % 100'ünün ön işleme gerek kalmadan mümkün olduğu bulunmuştur. Bu hammadeden fermente edilebilir şekerlerin üretilmesinin ekonomik ve teknik canlılığını göstermektedir.

Bu çalışmada iki önemli konu ele alınmıştır. İlk olarak büyük ölçekli fermente edilebilir şekerler üretmek için atık ekstraktının geri dönüşümü ele alınmıştır. Bunun için sıvılaştırma ve sakkarifikasyon aşamaları uygulanan ekmeğin hidrolizatında sıvılaştırma için optimum atık ekmeğin, su ve enzim oranının bulunması sağlanmıştır. İkinci konu, hidroliz sırasında atık ekmeğin-su eriyiklerinin reolojik davranışlarıdır.

Substrat miktarının artmasının enzim aktivitesine karşı bir takım engeller oluşturarak glikoz verimini önemli derecede düşürdüğü görülmüştür. Sakkarifikasyon aşamasında glukoamilaz miktarının artırılması glikoz dönüşüm verimini pozitif yönde etkilemiştir. Bu durum, bütün disakkarit ve polisakkarit moleküllerinin glikoz molekülüne dönüşümü için daha yüksek enzim gerekliliğinden kaynaklanmaktadır. Bununla beraber sonuçlar çarpıcı bir şekilde α -amilaz konsantrasyonunun glikoz verimi üzerinde önemli etkisinin olmadığını göstermektedir.

Bir taraftan, sonuçlar α -amilaz ve atık ekmeğin miktarının pozitif interaksiyon etkisinin olduğunu göstermekte bu da sıvılaştırma fazında yüksek konsantrasyonlarda biyokütle hidrolize edildiğinde, α -amilaz miktarının artması gerektiği manasına gelmektedir. Diğer taraftan, kullanılan iki enzim kombinasyonunda negatif bir etki gözlemlenmiştir. Yani, iki enzimin aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda kullanılması etkinliklerini inhibe etmiş böylece dönüşüm verimliliği azalmıştır. Bütün bu sonuçlar, glukoamilazın substrata karşı etkinliği hususunda en iyi şartların sağlanması için biyokütle karışım viskozitesinin incelenmesi gereken bir parametre olduğunu ve çok az da olsa α -amilaz kullanımının kaçınılmaz olduğunu ortaya çıkarmaktadır.

6.KAYNAKLAR

- Acanski M, Pastor K, Razmovski R, Vucurovic V, Psodorov D (2014). Bioethanol production from waste bread samples made from mixtures of wheat and buckwheat flours. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 18(1): 40-45.
- Aissa MFB, Monteau JY, Perronnet A, Roelens G, Bail AL (2010). Volume change of bread and bread crumb during cooling, chilling and freezing, and the impact of baking. *Journal of Cereal Science*, 51: 115–119.
- Altinel B (2008). Ekmek Üretiminde Kullanılan Enzimler ve Ürün Kalitesine Etkilerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Anonim (2013). Türkiye’de ekmek israfı araştırması. <http://www.ekmekisrafetme.com>. (erişim tarihi, 18.06.2017).
- Anonim (2014). İsrafin Ekonomik Boyutu. <http://www.cekud.org.tr/index.php/israfin-ekonomik-boyutu>. (erişim tarihi, 18.06.2017).
- Arslan P, Yüksel A (1986). Toplu Beslenme Yapılan Kurumlarda Ekmek Tüketimi, Atımı ve İsrafin Önlenmesi Konusunda Alınacak Önlemlerle İlgili Bir Çalışma. *Gıda Dergisi*, 11(6): 59-62.
- Aslanzadeh S, Ishola MM, Richards T, Taherzadeh MJ (2014). An overview of existing individual unit operations. *Biorefineries*, Ed: Verte`s A, Qureshi N, Hodge D. Elsevier, Amsterdam, 3-36.
- Ayodeji AO, Bamidele OS, Kolawole AO, Ajele JO (2017). Physicochemical and kinetic properties of a high salt tolerant *Aspergillus flavus* glucoamylase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9: 35–40.
- Baks T, Kappen FHJ, Janssen AEM, Booma RM (2008). Towards an optimal process for gelatinisation and hydrolysis of highly concentrated starch–water mixtures with alpha-amylase from *B.licheniformis*. *Journal of Cereal Science*, 47: 214–225.
- Balat M (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conserv. Manag*, 52: 858-875.
- Besbes E, Jury V, Monteau JY, Bail AL (2014). Effect of baking conditions and storage with crust on the moisture profile, local textural properties and staling kinetics of pan bread. *Food Science and Technology*, 58: 658-666.
- Bhattacharya M, Erazo-Castrejón SV, Douglas C, Doehlert DC, McMullen MS (2002). Staling of Bread as Affected by Waxy Wheat Flour Blends. *Cereal Chemistry*, 79(2): 178–182.
- Bialas W, Szymanowska D, Grajek W (2010). Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling. *Bioresource Technology*, 101: 3126–3131.

- Bilgin B, Dağlıoğlu O, Konyalı M (2006). Functionality of Bread Made with Pasteurized Whey and/or Buttermilk. *Journal of Food Science*, 18: 277-286.
- Binod P, Kuttiraja M, Archana M, Janu KU, Sindhu R, Sukumaran RK, Pandey A (2012). High temperature pretreatment and hydrolysis of cotton stalk for producing sugars for bioethanol production. *Fuel*, 92: 340–345.
- Birer S (1982). Toplu Beslenme Yapılan Kurumlarda Ekmek İsrافی, İsrافیın Boyutları. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 11: 92-104.
- Blaszczak W, Sadowska J, Rosell CM, Fornal J (2004). Structural changes in the wheat dough and bread with the addition of alpha-amylases *Eur Food Res Technology*, 219:348–354.
- Boz H (2008). Farklı Doğal Bitkisel Katkıların Ekmek Üretiminde Kullanılması ve Kalite Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Erzurum.
- CABI O (1992). Ekmek yapımında kullanılan katkı maddelerinin gelişimi ve ekmek kalitesine etkileri. *Un Mamülleri Dünyası Dergisi*, 1(5): 16-19.
- Can A, Özçelik B, Karaali A (2003). Demir eksikliğine bağlı hastalıklara yönelik zenginleştirilmiş gıdalar. *Gıda Teknolojisi Dergisi*, 11: 44-48.
- Carson GR, Edwards NM (2009). Criteria of wheat and flour quality. *Wheat chemistry and Technology*: 108
- Chen P, Xie F, Zhao L, Qiao Q, Liu X (2017). Effect of acid hydrolysis on the multi-scale structure change of starch with different amylose content. *Food Hydrocolloids*, 69: 359-368.
- Cinelli BA, Castilho LR, Freire DMG, Castro AM (2015). A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. *Fuel*, 150: 721–729.
- Coşkun Y, Karababa E, Ercan R (1999). Düz Ekmeklerin Üretim Teknolojisi. *Gıda Dergisi*, 24(2): 89-97.
- Çağlıyan Bİ (2008). İzmir Piyasasında Satılan Bazı Ekmek Çeşitlerinin Nitelikleri ve Yapım Teknikleri. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Çelik E (2008). Ekmek Yapımında Kullanılan Bazı Katkı Maddelerinin Ekmek Kalitesi ve Bayatlama Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Çelik S, Sivri D, Köksel H (2001). Bazı Katkı Maddelerinin Ekmek Özellikleri Üzerine Etkisi. *Gıda Dergisi*, 26(1): 3-8.
- Daigle P, Gelinas P, Leblanc D, Morin A (1999). Production of aroma compounds by *Geotrichum candidum* on waste bread crumb. *Food Microbiology*, 16: 517-522.

- Dávila JA, Hernández V, Castro E, Cardona CA (2014). Economic and environmental assessment of syrup production. Colombian case. *Bioresource Technology*, 161: 84-90.
- De Cordt S, Hendrickx M, Maesmans G, Tobback P (1994). The influence of polyalcohols and carbohydrates on the thermostability of α -amylase. *Biotechnol Bioeng*, 43:107-114.
- Decock P, Cappelle S (2005). Bread technology and sourdough technology *Food Science and Technology*, 16: 113–120.
- Demir MK, Elgün A, Argun MŞ (2009). Sütçülük Yan Ürünlerinden Peynir Altı, Yayık Altı ve Süzme Yoğurt Suları Katkılarının Bazı Ekmek Özelliklerine Etkileri Üzerine Bir Araştırma. *Gıda Dergisi*, 34 (2): 99-106.
- Dewettinck K, Van Bockstaele F, Kuhne B, Van de Welle D, Courtens TM, Gellynck X (2008). Nutritional value of bread: influence of processing, food interaction and consumer perception. *J Cereal Science*, 48: 243–57.
- Dizlek H (2011). Gluten Oluşumu ve Bunu Sınırlayan Engelleyen Etmenler. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 6(2): 14-22.
- Doğan S, Ünal SS (1990) Un Fabrikalarında Değişik Pasajlardan Alınan Unların Zedelenmiş Nişasta Miktarının Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Yöntemle Belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 8: 7-35.
- Donovan JW (1979). Phase transition of the starch–water system. *Biopolymers*, 18: 263–275.
- Dölekoğlu CÖ, Gün S, Giray FH (2014). Yoksulluk ve Gıda İsrafi Sarmalı. 11. Tarım Ekonomisi Kongresi.
- Dunaway KW, Dasari RK, Bennett NG, Eric BR (2010). Characterization of changes in viscosity and insoluble solids content during enzymatic saccharification of pretreated corn stover slurries. *Bioresource Technology*, 101: 3575-3582.
- Ebrahimia F, Khanahmadib M, Roodpeymaa S, Taherzadeh MJ (2008). Ethanol production from bread residues. *Biomass and Bioenergy*, 32: 333-337.
- Elgün A, Ertugay Z (2011). Tahıl İşleme Teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No. 297, 411s, Erzurum.
- Elgün A, Köksel H, Özkaya H, Boyacıoğlu H, Hayta M, Babaoğlu M, Türker S, Ünal SS, Başman A, Solmaz B, Zeyneloğlu S, Uslu İ (2014). Ekmek Tüketimiyle İlgili Tutum ve Davranışlar ile Ekmek İsrafi ve İsfraf Üzerinde Etkili Olan Faktörler Araştırması, TMO Genel Müdürlüğü.
- Ercan R, Ekşi A (1992). Değişik Randımanlı Unlarda Tiyamin, Riboflavin ve Demir Miktarı. *Gıda Dergisi*, 17(5): 287-289.
- Erginkaya Z, Ünal Turhan E, Özer EA (2016). Nohut Mayalı Ekmek Üretimi ve Hakim Mikroflora. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 30(1): 89-99.

- Erkmen O (2011). Gıda Mikrobiyolojisi. Efil Yayınevi, 550s, Ankara.
- Ertürk A, Arslantaş N, Sarıca D, Demircan V (2015). Isparta İli Kentsel Alanda Ailelerin Ekmek Tüketimi ve İsrافی. Akademik Gıda Dergisi, 13(4): 291-298.
- FAO—Food and Agricultural Organisation of the United Nations, 2015. (<http://faostat.fao.org>).
- Fleet GH (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. Current Opinion in Biotechnology, 18:170–175.
- Fleming ID (1968). Amyloglucosidase: a-1,4-glucans glucohydrolase. Starch and Its Derivatives. Ed: J. A. Radley, Chapman Hall Ltd., London, 498p.
- Fujii M, Kawamura Y (1985). Synergistic Action of α -Amylase and Glucoamylase on Hydrolysis of Starch. Biotechnology and Bioengineering, 27: 260-265.
- Gibreel A, Sandercock JR, Lan J, Goonewardene LA, Zijlstra RT, Curtis JM, Bressler DC (2009). Fermentation of Barley by Using *Saccharomyces cerevisiae*: Examination of Barley as a Feedstock for Bioethanol Production and Value-Added Products. Applied and Environmental Microbiology, 75(5): 1363-1372.
- Göçmen D (1993). Un ve katkı maddelerinin ekmek kalite ve bayatlamasına etkileri. Gıda Dergisi, 18(5): 325-331.
- Göçmen D (1996). Hamur Hazırlanmasında Şerbetçi Otu ve Laktik Starter Kullanımının Hamur ve Ekmeğin Özelliklerine Etkisi, Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Gray JA, Bemiller JN (2003). Bread Staling: Molecular Basis and Control. Food Science and Food Safety, 2: 1-21.
- Gustavsson, J (2010). The climate change impact of retail waste from horticultural products, Degree Project for Master of Science in Environmental Sciences, Department of Plant and Environmental Sciences, University of Gothenburg, Sweden.
- Gül A, Isık H, Bal T, Özer S (2003). Bread Consumption and Waste of Households in Urban Area of Adana Province. Food Science and Technology, 6(2).
- Harper JM (1989). Food extruders and their applications, Extrusion Cooking. Ed: Mercier C, Linko P and Harper JM. American Association of Cereal Chemistry, 1–15.
- Heitmann M, Zannini E, Arendt EK (2015). Impact of different beer yeasts on wheat dough and bread quality parameters. Journal of Cereal Science, 63: 49-56.
- Hellman NN, Fairchild B, Senti FR (1954). The bread staling problem: Molecular organization of starch upon aging of concentrated starch gels at various moisture levels. Cereal Chemistry, 31:495.
- Hill GA, Macdonald DG, X. Lang (1997). Amylase inhibition and inactivation in barley malt using cold starch hydrolysis, Biotechnology Lett, 19: 1139–1141.

- Hruskova M, Svec I, Kučerova I(2003). Effect of malt flour addition on the rheological properties of wheat fermented dough. *Czech Journal Food Science*, 21: 210–218.
- Hudečková H, Šupinová P, Babak L (2017). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Waste Bread Before Fermentation. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65(1): 35-40.
- Hug-Iten S, Escher F, Conde-Petit B (2003). Staling of Bread: Role of Amylose and Amylopectin and Influence of Starch-Degrading Enzymes. *Cereal Chemistry*, 80(6): 654–661.
- Hug-Iten S, Handschin S, Conde-Petit B, Escher F (1999). Changes in Starch Microstructure on Baking and Staling of Wheat Bread. *Lebensm.-Wiss.-Technologie*, 00(5): 255-260.
- Jiang S, Liu C, Han Z, Xiong L, Sun Q (2016). Evaluation of rheological behavior of starch nanocrystals by acid hydrolysis and starch nanoparticles by self-assembly: A comparative study *Food Hydrocolloids*, 52: 914-922.
- Jiang S, Liu C, Han Z, Xiong L, Sun Q (2016). Evaluation of rheological behavior of starch nanocrystals by acid hydrolysis and starch nanoparticles by self-assembly: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 52: 914-922.
- Jones TW (2007). Using contemporary archaeology and applied anthropology to understand food loss in the American food system. Available at: Communitycompost.com.
- Jorgensen H, Kristensen JB, Felby C (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioprod. Bioref*, 1: 119–134.
- Kaack K, Pedersen L, Laerke HN, Meyer (2006). A New potato fibre for improvement of texture and colour of wheat bread. *Eur Food Res Technology*, 224: 199–207.
- Kantor LS, Lipton K, Manchester A, Oliveira V (1997). Estimating and addressing America's food losses. *Food Rev*, 20: 2 -12.
- Karaoğlu M, Kotancılar G (2005). Ekmek içi yumuşaklık üzerine kısmi pişirme yöntemi ve depolama şartlarının etkisi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 30(2): 117-122.
- Karaoğlu MM (2006). *Cephalaria syriaca* addition to wheat flour dough and effect on rheological properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 37-46.
- Kawa-Rygielska J, Pietrzak W, Czubaszek A (2012). Characterization of fermentation of waste wheat-rye bread mashes with the addition of complex enzymatic preparations, *Biomass Bioenergy*, 44: 17–22.
- Kaya E (2007). Ekmek Üretiminde Kimyasal Oksidanlar Yerine Enzim Sistemlerinin Kullanımının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Kent NL, Evers AD (1994). *Technology of Cereals*. Pergamon Company, 316p, USA.
- Kılıçarslan A (2000). Konya’da Toplu Beslenme Yapılan Kurumlarda Ekmek Tüketimi İsrافی ve Nedenleri. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Konya.
- Kiran EU, Liu Y (2015). Bioethanol production from mixed food waste by an effective enzymaticpretreatment. *Fuel*, 159: 463–469.
- Klibanov AM (1983). Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advances in Applied Microbiology*, 29: 1-28.
- Kolcuoğlu N (2002). Ticari Şartlarda Ekmekte Soya Unu ve Peynir Altı Suyunun Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Kotancılar G, Çelik İ, Erturgay Z (1995). Ekmeğin Besin Değeri ve Beslenmedeki Önemi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 26 (3): 431-441.
- Kunamneni A, Singh S (2005). Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochemical Engineering Journal* 27: 179–190.
- Kurter M (2011). İnsan ve Ekmek. Kuter Yayıncılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., 173s, Bursa.
- Kuttiraja M, Sindhu R, Varghese PE, Sandhya SV, Binod P, Vani S, Pandey A, Sukumaran RK (2013). Bioethanol production from bamboo (*Dendrocalamus sp.*) process waste. *Biomass and Bioenergy*, 59: 149-150.
- Leung CCJ, Cheung ASY, Zhang AYZ, Lam KF, Lin CSK (2012). Utilisation of waste bread for fermentative succinic acid production. *Biochem. Eng. J.* In Press.
- Leung CCJ, Cheunga ASY, Zhanga AYZ, Lamb KF, Lin CSK (2012). Utilisation of waste bread for fermentative succinic acid production. *Biochemical Engineering Journal*, 65: 10– 15.
- Li C, Fangb D, Lia Z, Gua Z, Yang Q, Chenga L, Hong Y (2016). An improved two-step saccharification of high-concentration cornstarch slurries by granular starch hydrolyzing enzyme. *Industrial Crops and Products*, 94: 259–265.
- Li P, Zeng Y, Xie Y, Li X, Kang Y, Wang Y, Xie T, Zhang Y (2017). Effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of kitchen waste for xanthan production. *Bioresource Technology*, 223: 84–90.
- Li Z, Liu W, Gu Z, Li C, Hong Y, Cheng L (2015). The effect of starchconcentration on the gelatinization and liquefaction of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 48: 189–196.
- Linko P (1989). Extrusion cooking in bioconversion. *Extrusion Cooking*. Ed: Mercier C, Linko P and Harper JM. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, 235–245.

- Linko P Hakulin S, Linko YY (1983). Extrusion cooking of barley starch for the production of glucose syrup and ethanol. *J Cereal Sci*, 1:275–284
- Linko YY, Javanainen P, Linko S (1997). Biotechnology of bread baking. *Trends in Food Science & Technology*, 8: 339-344.
- Magyar M, Sousa LC, Jayanthi S, Balan V (2017). Pie waste – A component of food waste and a renewable substrate for producing ethanol. *Waste Management*.
- Majia CC, Gutierrez AJ, El Halwagi M(2012). A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Saf. Environ. Prot*, 90: 189–202.
- Marcotte M, Taheriana A, Triguia M, Ramaswamy S (2001). Evaluation of rheological properties of selected salt enriched food hydrocolloids. *Journal of Food Engineering*, 48: 157-167.
- Medda S, Chandra AK (1980). New Strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing Thermostable α -Amylase Active at Alkaline pH. *Journal of Applied Bacteriology*, 48: 47-58.
- Melikoglu M, Lin CSK, Webb C (2013). Stepwise optimisation of enzyme production in solid state fermentation of waste bread pieces. *Food and Bioproducts Processing* 91: 638–646.
- Melikoglu M, Webb C (2013). Use of Waste Bread to Produce Fermentation Products. *Food Industry wastes: Assessment and Recuperation of Commodities*, Kosseva M, Webb C. Academic Press, San Diego, 63-76.
- Mena C, Adenso-Diaz B, Yurt O (2011). The causes of food waste in the supplier-retailer interface: Evidences from the UK and Spain. *Resour. Conserv. Recy*, 55: 648-658.
- Miles MJ, Morris VJ, Orford PD, Ring SG(1985). The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydr. Res.*, 135:257-269.
- Montesinos T, Navarro JM (2000). Production of alcohol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technology*, 27: 362-370.
- Mou H, Wu S (2016). Comparison of organosolv and hydrotropic pretreatments of eucalyptus for enhancing enzymatic saccharification *Bioresource Technology*, 220: 637–640.
- Mukthama R, Balla AS, Bhargavaa SK, Bankupallib S (2016). Bioethanol production from non-edible de-oiled *Pongamia pinnata* seed residue-optimization of acid hydrolysis followed by fermentation. *Industrial Crops and Products*, 94: 490–497.
- Myat L, Ryu GH (2013). Effect of thermostable α -amylase injection on mechanical and physiochemical properties for saccharification of extruded corn starch *Journal of Sci Food Agricultural*, 94: 288–295.

- Norouzian D, Akbarzaden A, Scharer JM, Moo Young M (2006). Fungal glucoamylases. *Biotechnology Adv*, 24: 80–85.
- Ötleş S, Akçiçek E(2002). Patatesin beslenme ve sağlık yönünden önemi. III. Ulusal Patates Kongresi, 1-12, İzmir.
- Özkaya H, Özkaya B(1994). Ekmek hatalarını önlemede katkı maddelerinin rolü, *Unlu Mamuller Dünyası Dergisi*, 16-20.
- Pala A (2012). Farklı Yöntemlerle Kurutularak Elde Edilen Boza Tozunun Hamur Reolojik ve Ekmek Kalitesi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Parry A (2007). *Food Waste Reduction: How Can Technology Help Waste & Resources Action Programme*.
- Pasina TM, Benassia VM, Heinen PR, Damasiob ARL, Cereiac M, Jorgec JA, Polizeli MLTM (2017). Purification and functional properties of a novel glucoamylase activated by manganese and lead produced by *Aspergillus japonicus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 779–788.
- Patel H, Chapla D, Shah A (2017). Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse using enzymatic and acid followed by enzymatic hydrolysis approaches for bioethanol production. *Renewable Energy*, 109: 323-331.
- Peng B, Li Y, Ding S, Yang J (2017). Characterization of textural, rheological, thermal, microstructural, and water mobility in wheat flour dough and bread affected by trehalose. *Food Chemistry*. 233: 369-377.
- Peng H, Zheng Y, Chen M, Wang Y, Xiao Y, Gao Y (2014). A starch-binding domain identified in α -amylase (AmyP) represents a new family of carbohydrate-binding modules that contribute to enzymatic hydrolysis of soluble starch. *FEBS Letters*, 588: 1161–1167.
- Pereira L, Pereira L, Sposina Sobral Teixeira R, Pinto da Silva Bon E, Pereira Freitas S (2011). Sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis: rheological data as criteria for impeller selection. *J. Ind. Microb. Biotechnol*, 38: 901-907.
- Piazza L, Masi P(1995). Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties. *Cereal Chemistry*, 72:320-325.
- Pietrzak W, Kawa-Rygielska J (2014). Ethanol fermentation of waste bread using granular starch hydrolyzing enzyme: Effect of raw material pretreatment. *Fuel*, 134: 250–256.
- Pietrzak W, Kawa-Rygielska J (2015). Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of waste wheat-rye bread at very high solids loading: Effect of enzymatic liquefaction conditions. *Fuel*, 147: 236–242.
- Pyler EJ (1988). *Baking Science and Technology*. Sosland Publishing Co. USA, 23: 1345.

- Riaz M, Perveen R, Javed, MR, Nadeem H, Rashid MH (2007). Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp.. *Enzym Micro Technology*, 41: 558–564.
- Ribotta PD, Le Bail A (2007). Thermo-physical assessment of bread during staling. *LWT Food Sci Technol*,40: 879-84.
- Robertson GH, Wong DW, Lee CC, Wagschal K, Smith, MR, Orts WJ (2006).Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. *J. Agric. Food Chemistry*, 54: 353–365.
- Rogers DE, Zeleznak KJ, Lai CS, Hosney RC(1988). Effect of native lipids, shortening, and bread moisture on bread firming. *Cereal Chemistry*, 65:398-401.
- Ruiz MI, Sanchez CI, Torresa RG, Molina DR (2011). Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch for Production of Bioethanol with a Colombian Wild Yeast Strain. *J. Braz. Chem. Soc.*, 22(12): 2337-2343.
- Rusendi D, Sheppard JD (1995). Hydrolysis of Potato Processing Waste for the Production of Poly- β -Hydroxybutyrate. *Bioresource Technology* 54: 191-196.
- Saha BC, Zeikus, JG(1989). Microbial glucoamylases: biochemical and biotechnological features. *Starch/Stärke*, 41: 57–64.
- Saha K, Ra UM, Sikdera J, Chakraborty S, Silvac SS, Santos JC (2017). Membranes as a tool to support biorefineries: Applications in enzymatic hydrolysis, fermentation and dehydration for bioethanol production *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 74: 873–890.
- Sánchez C, Serrano L, Llano-Ponte R, Labidi J (2014). Bread residues conversion into lactic acid by alkaline hydrothermal treatments. *Chemical Engineering Journal*, 250: 326–330.
- Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37: 19-27.
- Scholl AL, Menegol D, Pitarello AP, Fontana RC, Filho AZ, Ramos LP, Dillon AJP, Marli Camassola M (2015). Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. *Bioresource Technology*, 192: 228–237.
- Seçkin R(1979). Ekmeklik una patates unu katılması. *Gıda Dergisi*, 2: 69-70. TMO 2004 Yılı Haşhaş Raporu.
- Shigematsua T, Furukawaa N, Takaokaa R, Hayashia M, Sasaob S, Uenob S, Nakajimaa K, Kidoa M, Nomuraa K, Iguchi A (2017). Effect of high pressure on the saccharification of starch in the tuberous root of sweet potato (*Ipomoea batatas*) *Biophysical Chemistry*.

- Sindhu R, Kuttiraja M, Binod P, Janu KU, Sukumaran RK, Pandey A (2011). Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 102: 10915–10921.
- Song, W, Janaswamy S, Yao Y (2010). Structure and in vitro digestibility of normal corn Starch: Effect of acid treatment, autoclaving, and α -amylolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17): 9753-9758.
- Soni SK, Kaur A, Gupta JK (2003). A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. *Process Biochemistry*, 39: 185-192.
- Souza JPM, P.O. Magalhães PO (2010). Application of microbial α -amylase in industry. *Rev. Braz. J. Microbiology*, 41: 850–861.
- Souza PM, Magalhães PO (2010). Application of Microbial α -Amylase in Industry- A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 850-861.
- Stauffer CE (1983). Dough conditioners. *Cereal Foods World*, 28: 729-730
- Struyf N, Verspreet J, Verstrepen KJ, Courtin CM (2017). Investigating the impact of α -amylase, α -glucosidase and glucoamylase action on yeast-mediated bread dough fermentation and bread sugar levels. *Journal of Cereal Science*, 75: 35-44.
- Şahin M, Göçmen Akçacık A, Aydoğan S, Demir B, Önmez H, Taner S (2013). Ekmeklik Buğday Ununda Ekmek Hacmi ile Bazı Fizikokimyasal ve Reolojik Özellikler Arasındaki İlişkilerin Tespiti. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 22 (1): 13-19.
- Taherzadeh MJ, Karimi K (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review, *Bio Resour.* 2: 472-499.
- Tayal A, Kelly RM, Khan SA (1997). Viscosity Reduction Of Hydraulic Fracturing Fluids Through Enzymatic Hydrolysis. *SPE Journal*, 2: 204-212.
- Tharanathan RN, Paramahans SV, Tareen JAK (1983). In vitro digestibility of native starch granules of samsi and sanwa, *Starch/Starke*, 35: 235–236.
- Thomas KC, Ingledew WM (1990). Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Appl Environ Microbiology*, 56: 2046–2050.
- Tomasika P, Horton D (2012). Enzymatic Conversion of Starch, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Ed: Tomasiko P and Horton D. Ohio, USA, 59-426.
- Ünal SS, Boyacıoğlu MH (1984). Hamurun Reolojik Özellikleri. *Gıda Dergisi*, 9(1): 13-19.
- Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H and Dijkhuizen L (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol* 94: 137–155.

- Vavouraki AI, Angelis EM, Kornaros M (2013). Optimization of thermo-chemical hydrolysis of kitchen wastes. *Waste Management*, 33: 740–745.
- Viamajala S, McMillan JD, Schell DJ, Elander RT (2009). Rheology of corn stover slurries at high solids concentrations – Effects of saccharification and particle size. *Bioresour Technology*, 100: 925-934.
- Vuyst LD, Neysens P (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Food Science & Technology*, 16: 43–56.
- Wang P, Singh V, Xu L, Johnston, DB, Rausch KD, Tumbleson M(2005). Comparison of enzymatic and conventional dry-grind corn processes using a granular starch hydrolyzing enzyme. *Cereal Chemistry*, 82: 734–738.
- Wang P, Singh V, Xue H, Johnston DB, Rausch KD, Tumbleson M (2007). Comparison of raw starch hydrolyzing enzyme with conventional liquefaction and saccharification enzymes in dry-grind corn processing. *Cereal Chemistry*, 84: 10–14.
- Wang WJ, Powell AD, Oates CG (1996). Sago Starch as a Biomass Source: Raw Sago Starch Hydrolysis by Commercial Enzymes. *Bioresour Tecnology*, 55: 55-61.
- Wang YJ, Truong VD, Wang L (2003). Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 52(3): 327-333.
- Wild GM (1954). Action patterns of starch enzymes, *Iowa State Coll. J. Sci*, 28: 419–420.
- Yılmaz İ (1983). İzmir İli Bornova İlçesinin Sosyo Ekonomik ve Kültürel Düzeyleri Farklı Olan Ailelerinde Ekmek Tüketimi Atımı ve Artan Ekmeklerin Değerlendirme Durumları Üzerine Bir Araştırma. Hacettepe Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Ankara.
- Zavareze, EDR, Dias, ARG (2011). Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 83(2): 317-328.
- Zobel HF, Kulp K (1996). The staling mechanism. *Baked Goods Freshness: Technology, Evaluation and Inhibition of Staling*, Ed: Marcel Dekker. New York, 1-64.
- Zobel HF, Senti FR (1959). The bread staling problem: X-ray diffraction studies on breads containing a cross-linked starch and a heat-stable amylase. *Cereal Chem*, 36: 441-451.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Tekirdağ'da doğdu. İlköğrenimi Namık Kemal İlköğretim Okulu, lise öğrenimi de Tekirdağ Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini, 2013 yılında bitirdi. 2014 Kasımdan itibaren 3 sene boyunca TÜBİTAK projesinde bursiyer olarak görev yaptı. 2017 Eylül'de Koc Catering'de gıda mühendisi olarak başladığı görevine halen devam etmektedir.